

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

3 016 521

②1 N° d'enregistrement national : **14 50565**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 38/14 (2013.01), A 61 Q 19/08**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 23.01.14.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la demande : 24.07.15 Bulletin 15/30.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : SOCIETE INDUSTRIELLE LIMOUSINE D'APPLICATION BIOLOGIQUE Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : PAUFIQUE JEAN.

⑦③ Titulaire(s) : SOCIETE INDUSTRIELLE LIMOUSINE D'APPLICATION BIOLOGIQUE Société anonyme.

⑦④ Mandataire(s) : AQUINOV.

⑫④ PRINCIPE ACTIF OBTENU A PARTIR DE PICHIA ANOMALA ET UTILISATION POUR LUTTER CONTRE LE PHENOMENE D'INFLAMMATION CHRONIQUE DE LA PEAU.

⑫⑤ L'objet de l'invention est un hydrolysate de Pichia anomala pour son application comme principe actif destiné à lutter contre le phénomène d'inflammation chronique de la peau, en particulier un hydrolysate de Pichia anomala comprenant au moins 30% de biopeptides et moins de 10% de sucres en poids par rapport au poids total de matières sèches, dont une partie des biopeptides sont des biopeptides de masses moléculaires inférieures à 5000Da. L'invention se rapporte également aux compositions cosmétiques incluant ce principe actif.

FR 3 016 521 - A1



PRINCIPE ACTIF OBTENU A PARTIR DE *PICHIA ANOMALA*
ET UTILISATION POUR LUTTER CONTRE LE PHENOMENE D'INFLAMMATION CHRONIQUE DE LA PEAU

La présente invention se rapporte à un hydrolysate de *Pichia anomala* et à son utilisation comme principe actif pour lutter contre le phénomène d'inflammation chronique de la peau. L'invention concerne également les compositions cosmétiques incluant un tel principe actif. L'inflammation, est un phénomène qui permet à l'organisme de se protéger contre les

5 diverses agressions et stress qui le menacent au quotidien. En effet, que la source de stress soit intrinsèque (manque de sommeil, alimentation déséquilibrée, etc.) ou bien extrinsèque (rayons UV, pollution, microorganismes pathogènes, etc.), le corps humain y répond en déclenchant une cascade de réactions locales : le processus inflammatoire. Celui-ci se caractérise par quatre manifestations : rougeur, douleur, tuméfaction et chaleur, et permet

10 la reconnaissance, la destruction et l'élimination des substances étrangères, avant de réparer le tissu lésé.

Lorsqu'il est bien contrôlé, ce phénomène constitue une véritable arme qui offre à l'organisme un moyen de défense efficace, mais avec l'âge le corps perd sa capacité à moduler et réguler parfaitement la réponse inflammatoire qui devient excessive par rapport

15 aux besoins réels de défense. La cascade inflammatoire est alors déclenchée sans être la réponse à une agression et une inflammation latente s'installe progressivement de manière silencieuse et non visible. Ceci se traduit par une augmentation de la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que, par exemple, les interleukines 6 et 8 et l'établissement d'un niveau qui peut être faible mais chronique d'inflammation. Ce

20 phénomène, nommé « inflammaging », peut avoir plusieurs origines telles que l'accumulation de dommages tissulaires, la défaillance du système immunitaire ou bien encore l'accumulation de cellules sénescentes et leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires. En effet, suite à un stress, les cellules peuvent entrer en sénescence. Or, les cellules sénescentes, par l'intermédiaire de leurs sécrétions, exercent une grande variété

25 d'effets délétères sur leur environnement et engendrent une inflammation qui se propage

dans le tissu conduisant à la modification de l'environnement cellulaire et matriciel et consécutivement à l'accélération du vieillissement cutané.

L'objectif de la présente invention est de proposer un principe actif qui permette de limiter les effets délétères de l'inflammaging sur la peau, en particulier en modulant la communication entre les cellules sénescentes et leur environnement.

Pour y répondre, l'invention vise l'utilisation d'un hydrolysate de *Pichia anomala*.

En agissant sur la communication entre les cellules et leur environnement, le principe actif selon l'invention limite les échanges pro-inflammatoires entre l'épiderme et le derme et préserve ainsi la fonctionnalité du tissu. Il limite les dommages induits par le phénomène d'inflammation chronique et permet ainsi à la peau de paraître plus jeune.

Pichia anomala est une levure de la famille des Saccharomycètes. Son utilisation en cosmétique pour le traitement de la peau a déjà été décrite mais jamais pour lutter contre le phénomène d'inflammaging.

L'invention vise un hydrolysate de *Pichia anomala* pour son application comme principe actif pour lutter contre le phénomène d'inflammation chronique de la peau, l'utilisation d'un hydrolysate de *Pichia anomala* comme principe actif cosmétique pour lutter contre le phénomène d'inflammation chronique de la peau.

L'invention a également pour objet un hydrolysate de *Pichia anomala* particulier à savoir un hydrolysate de *Pichia anomala* comprenant au moins 30% de biopeptides et moins de 10% de sucres en poids par rapport au poids total de matières sèches, au moins une partie des biopeptides étant des biopeptides de masses moléculaires inférieures à 5000Da.

L'invention concerne également un procédé d'obtention de cet hydrolysate et des compositions l'incluant.

La présente invention est maintenant décrite en détail.

Selon un premier aspect, l'invention vise donc un hydrolysate de *Pichia anomala* pour son application comme principe actif pour lutter contre le phénomène d'inflammation chronique de la peau, en particulier l'utilisation d'un hydrolysate de *Pichia anomala* comme principe actif cosmétique dans une composition cosmétique destinée à une application topique, pour lutter contre le phénomène d'inflammation chronique de la peau.

La sénescence des kératinocytes exerce des effets directs sur la différenciation kératinocytaire mais également des effets indirects sur la jonction dermo-épidermique et le derme par l'intermédiaire des médiateurs pro-inflammatoires. En effet, la fabrication de

peaux reconstruites (voir résultats d'essais point II.A.1) avec des kératinocytes sénescents et inflammés conduit à l'obtention de peaux modifiées présentant un épiderme affiné ainsi qu'une jonction épidermique et un derme modifiés.

L'utilisation d'un hydrolysate de *Pichia anomala* sur la peau comme principe actif permet en particulier :

- de normaliser le secrétome produit par la peau en état d'inflammation chronique, notamment en limitant le relargage des interleukines 6 et des interleukines 8 ;
- de protéger l'environnement tissulaire de l'inflammation chronique,

- notamment :
 - o d'assurer le maintien d'une fonction barrière efficace en favorisant la construction de l'épiderme : en particulier en augmentant l'épaisseur de l'épiderme et en activant la synthèse de fillagrine,
 - o de garantir une bonne cohésion épiderme-derme en augmentant la synthèse de collagène VII,
 - o de préserver le compartiment dermique grâce à la synthèse de procollagène I, de l'acide hyaluronique et l'expression de la tropoélastine.

Le principe actif selon l'invention appliqué sur la peau, en limitant les échanges pro-inflammatoires néfastes, contrôle le langage établi entre les cellules sénescents et leur environnement et préserve la fonctionnalité du tissu.

Il peut être utilisé comme principe actif, notamment comme principe actif cosmétique pour :

- favoriser la restructuration de la matrice dermique
- améliorer l'élasticité et la tonicité de la peau
- lisser le microrelief cutané de la patte d'oie en réduisant la rugosité de la peau, et atténuer les rides.

Il peut être utilisé notamment pour permettre à la peau de paraître plus jeune.

Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, l'invention vise l'utilisation d'un principe actif obtenu à partir de *Pichia anomala* , tel que décrit en suivant.

Le principe actif utile selon l'invention est préférentiellement un hydrolysate de *Pichia anomala*, comprenant des biopeptides de masses moléculaires inférieures à 5000Da.

Par « biopeptide » au sens de l'invention on entend un peptide, c'est-à-dire un fragment de protéine, qui est biologiquement actif. Les peptides du principe actif selon l'invention sont

des biopeptides et on utilisera dans la présente demande indifféremment les termes peptides et biopeptides.

En particulier l'invention vise un hydrolysate de *Pichia anomala* comprenant moins de 10% de sucres et au moins 30% de biopeptides en poids par rapport au poids total de matière sèche, une partie des biopeptides étant des biopeptides de masses moléculaires inférieures à 5000 Da.

Préférentiellement au moins 50% des biopeptides sont des biopeptides de masses moléculaires inférieures à 5000 Da, et encore plus préférentiellement au moins 85% des biopeptides sont des biopeptides de masses moléculaires inférieures à 5000 Da.

10 Selon un mode de réalisation adapté, l'hydrolysate de *Pichia anomala* selon l'invention comprend au moins 50% de biopeptides en poids de matières sèches.

Par "hydrolysate" au sens de l'invention on entend tout extrait obtenu à partir de *Pichia anomala*, comprenant au moins une étape d'hydrolyse de *Pichia anomala*.

Préférentiellement, il s'agit d'un hydrolysate enzymatique de *Pichia anomala*. Par "hydrolysate enzymatique" on entend tout extrait obtenu à partir de *Pichia anomala*, comprenant au moins une étape d'hydrolyse enzymatique de *Pichia anomala*.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'hydrolysate de *Pichia anomala* est obtenu par un procédé comprenant au moins une hydrolyse basique et au moins une hydrolyse enzymatique des protéines.

20 Le principe actif présente préférentiellement une couleur jaune.

Il peut se présenter sous forme liquide limpide et peut être défini par au moins une des caractéristiques exposées ci-après, préférentiellement toutes.

Matières sèches :

Le taux de matières sèches d'un principe actif selon l'invention (mesuré par passage à l'étuve à 105°C en présence de sable d'un échantillon de poids initial donné jusqu'à obtention d'un poids constant) peut être compris entre 5 et 50 g/l, préférentiellement entre 10 et 18 g/l.

Mesure du pH :

Le pH (mesuré par la méthode potentiométrique à température ambiante) peut être compris entre 5,5 et 8, préférentiellement entre 6,5 et 7,5.

30 Teneur en protéines (peptides) :

La teneur en protéines d'un principe actif selon l'invention peut être déterminée par la méthode de KJELDHAL (référence : Official method of analysis of the A.O.C. 1975, 12th ed. W

Horwitz, E.D., New York, p 15-60), et exprimée en pourcentage de poids par rapport au poids total de la matière sèche du principe actif.

Le principe actif selon l'invention comprend de façon préférée 3 à 36g/l de protéines, notamment entre 6 et 13g/L.

- 5 La teneur en protéines (peptides) est donc préférentiellement supérieure à 30% encore plus préférentiellement supérieure à 50% en poids de matière sèche.

La majorité des protéines sont préférentiellement des peptides de masse molaire inférieure à 5000 Da. Préférentiellement au moins 85% des peptides (protéines) sont des peptides de masse molaire inférieure à 5000 Da.

10 Teneur en cendres brutes :

La teneur en cendres brutes est déterminée par la pesée des résidus issus de l'incinération à 550°C dans un four à moufle électrique (VULCAN®).

- 15 La teneur en cendres brutes est déterminée en pourcentage de poids par rapport au poids total de la matière sèche du principe actif. Elle est comprise entre 10 et 25% en poids de matière sèche.

Teneur en carbohydrates

On utilise la méthode de DUBOIS. En présence d'acide sulfurique concentré et de phénol, les sucres réducteurs donnent un composé jaune orangé. A partir d'une gamme étalon, on peut déterminer le taux de carbohydrates d'un principe actif selon l'invention.

- 20 Le taux de carbohydrates d'un principe actif selon l'invention mesuré par la méthode de DUBOIS est préférentiellement inférieur à 10% en poids de matières sèches, encore plus préférentiellement inférieur à 6%.

Caractérisation des carbohydrates

- 25 L'analyse par HPLC d'un principe actif selon l'invention permet de déterminer la répartition des poids moléculaires de la fraction glucidique.

La caractérisation par chromatographie en phase gazeuse (CPG) de la fraction glucidique du principe actif selon l'invention montre qu'il se caractérise par une fraction carbohydrates composée majoritairement d'oligosaccharides de degré de polymérisation compris entre 2 et 40, ces oligosaccharides étant principalement composés de glucose et de galactose.

30 Identification de la fraction active

Afin de déterminer la fraction active, les espèces moléculaires du principe actif selon l'invention ont été fractionnées :

- une fraction A purifiée en sucres
- une fraction B purifiée en peptides
- une fraction C contenant les cendres du principe actif.

La fraction B présente une efficacité comparable à celle du principe actif selon l'invention (efficacité évaluée selon les tests du point II). La fraction peptidique joue donc un rôle primordial dans l'efficacité du principe actif.

Cette fraction peptidique comprend préférentiellement au moins 50% et encore plus préférentiellement au moins 85% de peptides de masses molaires inférieures à 5000Da.

A titre d'exemple, la fraction peptidique (fraction B) d'un principe actif de l'exemple 1 a été analysée par filtration moléculaire FPLC avec une détection UV. Les résultats obtenus sont présentés ci-après :

- fraction 1 (masse moléculaire supérieur à 5000 Da) : 13% (1,45g/l)
- fraction 2 (masse moléculaire comprise entre 2000 et 5000 Da) : 38,4% (4,29g/l)
- fraction 3 (masse moléculaire comprise entre 243 et 2000 Da) : 46,3% (5,17g/l)
- fraction 1 (masse moléculaire comprise entre 0 et 243 Da) : 2,3% (0,26 g/l).

Dans cet exemple, la fraction peptidique du principe actif selon l'invention comprend 87% de peptides de masse molaire inférieure à 5000 Da.

Le principe actif selon l'invention est obtenu par un procédé permettant de concentrer l'actif en termes de biopeptides, en particulier de biopeptides de masse moléculaire inférieure à 5000Da.

Il est préférentiellement obtenu par un procédé comprenant au moins une hydrolyse basique et au moins une hydrolyse enzymatique des protéines.

Un procédé particulièrement adapté comprend au moins la succession des étapes suivantes :

- solubilisation de *Pichia anomala* dans l'eau, préférentiellement à raison de 20g/l
- hydrolyse basique de la solution de *Pichia anomala*,
- séparation des phases soluble et insoluble, par exemple par filtration, centrifugation ou décantation,
- récupération de la phase soluble
- filtration et purification pour récupérer les molécules

- hydrolyse enzymatique des protéines, préférentiellement au moyen d'une protéase,

- filtration et purification pour récupérer les biopeptides de taille inférieure à 5000Da.

5 Des étapes supplémentaires de filtration et filtration stérilisante peuvent être envisagées. Des étapes de désodorisation et de décoloration ou de concentration peuvent être ajoutées. Les paramètres des différentes étapes doivent être ajustés afin d'obtenir des principes actifs présentant les caractéristiques de l'invention.

Ces étapes sont usuelles dans le domaine des extractions d'actifs à partir de plantes ou de levures et l'homme du métier est à même d'en ajuster les paramètres réactionnels sur la base de ses connaissances générales.

La présente invention couvre aussi les compositions cosmétiques incluant un hydrolysate de *Pichia anomala* selon l'invention, dans différentes formes galéniques, adaptées à l'administration par voie topique cutanée.

15 Ces compositions peuvent se présenter notamment sous forme d'émulsions huile-dans-eau, émulsions eau-dans-huile, émulsions multiples (Eau/Huile/Eau ou Huile/Eau/Huile) qui peuvent être éventuellement des microémulsions ou des nanoémulsions, ou sous forme de solutions, suspensions, hydrodispersions, gels aqueux ou poudres. Elles peuvent être plus ou moins fluides et avoir l'aspect d'une crème, d'une lotion, d'un lait, d'un sérum, d'une pommade, d'un gel, d'une pâte ou d'une mousse, ou sous forme solide.

Il peut s'agir de compositions comprenant entre 0,1 et 3% de principe(s) actif(s) obtenu(s) à partir de *Pichia anomala* selon la présente invention.

Ces compositions comprennent, outre l'actif, un milieu physiologiquement acceptable et de préférence cosmétiquement acceptable, c'est-à-dire qui ne provoque pas de sensations d'inconfort inacceptables pour l'utilisateur telles que des rougeurs, tiraillements ou picotements.

Les compositions selon l'invention peuvent contenir comme adjuvant au moins un composé choisi parmi :

- les huiles, qui peuvent être choisies notamment parmi les huiles de silicone, linéaires ou cycliques, volatiles ou non volatiles ;

- les cires, telles que l'ozokérite, la cire de polyéthylène, la cire d'abeille ou la cire de carnauba ;

- les élastomères de silicone,
- les tensioactifs, de préférence émulsionnants, qu'ils soient non ioniques, anioniques, cationiques ou amphotères ;
- les co-tensioactifs, tels que les alcools gras linéaires ;
- 5 - les épaississants et/ou gélifiants,
- les humectants, tels que les polyols comme la glycérine ;
- les filtres organiques,
- les filtres inorganiques,
- les colorants, les conservateurs, les charges,
- 10 - les tenseurs,
- les séquestrants,
- les parfums,
- et leurs mélanges, sans que cette liste soit limitative.

Des exemples de tels adjuvants sont cités notamment dans le Dictionnaire CTFA
15 (International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook publié par le Personal Care Product Council).

Bien entendu, l'homme du métier veillera à choisir les éventuels composés complémentaires, actifs ou non-actifs, et leur quantité, de telle sorte que les propriétés avantageuses du mélange ne soient pas, ou sensiblement pas, altérées par l'adjonction
20 envisagée.

Ces compositions sont notamment destinées à lutter contre le phénomène d'inflammaging en particulier à limiter les dommages cutanés induits par le phénomène d'inflammation chronique. Elles peuvent être utilisées en particulier pour favoriser la restructuration de la matrice dermique, améliorer l'élasticité de la peau, lisser le microrelief de la patte d'oie en
25 réduisant la rugosité et atténuer les rides. Elles peuvent donc être utilisées pour lutter contre le phénomène d'inflammation chronique en particulier pour permettre à la peau de paraître plus jeune.

Afin d'illustrer les effets cosmétiques d'un hydrolysate de *Pichia anomala* selon l'invention, les exemples suivants avec leurs résultats d'essais sont présentés incluant des résultats
30 comparatifs avec d'autres principes actifs obtenus à partir de *Pichia anomala*, ne présentant pas les caractéristiques de l'invention.

I. EXEMPLES

I.1 Exemple 1 : Principe actif selon l'invention

Un exemple de procédé d'obtention d'un principe actif selon l'invention, comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 5 - solubilisation de 20g de biomasse de *Pichia anomala* dans 1l d'eau,
 - hydrolyse basique de la solution de *Pichia anomala*, au moyen de soude pendant au moins 30 minutes,
 - séparation des phases soluble et insoluble, par exemple par centrifugation,
 - récupération de la phase soluble,
- 10 - filtration pour récupérer les molécules par ultrafiltration,
 - hydrolyse enzymatique des protéines, préférentiellement au moyen d'une protéase, en particulier au moyen d'une protéase pendant 1h,
 - filtration pour récupérer les biopeptides de taille inférieure à 5000Da,
 - filtration stérilisante sur filtre 0.22μ.
- 15 Le principe actif obtenu présente les caractéristiques suivantes :
- aspect : solution aqueuse limpide
 - couleur : jaune claire
 - teneur en matières sèches : 12,7g/l
 - teneur en protéines de 7,2 g/l, soit 57%, dont 86% sont des biopeptides de masse
- 20 moléculaire inférieure à 5000 Da,
 - teneur en carbohydrates inférieure à 10%,
 - pH : 7,4

I.2 Exemple 2 : Principe actif obtenu à partir de *Pichia anomala* en dehors de l'invention

Le principe actif de l'exemple 2 correspond à l'extrait A de la demande FR2897266.

- 25 Il est obtenu par un procédé comprenant la mise en œuvre des étapes suivantes :
- culture de levures de *Pichia anomala* dans un milieu adapté à leur développement
 - centrifugation pour récupérer la biomasse
 - solubilisation de la biomasse
 - hydrolyse enzymatique à pH basique
- 30 - séparation des phases solubles et insolubles
 - traitement thermique
 - filtration, et

- filtration stérilisante.

Le principe actif obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- teneur en matières sèches : entre 48 et 84g/l
- pH entre 4 et 9
- 5 - teneur en protéines entre 22 et 100% en poids de matières sèches
- teneur en sucres supérieure à 10% (entre 12 et 87% préférentiellement entre 20 et 50%) en poids de matières sèches.

I.3 Exemple 3 : Principe actif obtenu à partir de *Pichia anomala* en dehors de l'invention

Le principe actif de l'exemple 3 correspond à l'extrait B de la demande FR2897266.

10 Il est obtenu par un procédé comprenant la mise en œuvre des étapes suivantes :

- culture de levures de *Pichia anomala* dans un milieu adapté à leur développement
- centrifugation pour récupérer la biomasse
- solubilisation de la biomasse
- hydrolyse enzymatique à pH acide
- 15 - séparation des phases solubles et insolubles
- traitement thermique
- filtration, et
- filtration stérilisante.

Le principe actif obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- 20 - teneur en matières sèches : entre 58 et 95g/l
- pH entre 4 et 9
- teneur en protéines entre 24 et 93% en poids de matières sèches,
- teneur en sucres supérieure à 10% (entre 12 et 55% préférentiellement entre 20 et 34%) en poids de matières sèches.

25

I.4 Exemple 4 : Principe actif obtenu à partir de *Pichia anomala* en dehors de l'invention

Le principe actif de l'exemple 4 correspond à l'extrait C de la demande FR2897266.

Il est obtenu par un procédé comprenant la mise en œuvre des étapes suivantes :

- culture de levures de *Pichia anomala* dans un milieu adapté à leur développement
- 30 - centrifugation pour récupérer la biomasse
- solubilisation de la biomasse

- hydrolyses enzymatiques successives en milieu basique,
 - séparation des phases solubles et insolubles
 - traitement thermique
 - filtration, et
- 5 - filtration stérilisante.

Le principe actif obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- teneur en matières sèches : entre 91 et 195g/l
 - pH entre 4 et 9
 - teneur en protéines entre 18 et 100% en poids de matières sèches,
- 10 - teneur en sucres préférentiellement comprise entre 19 et 33% en poids de matières sèches.

I.5 Exemple 5 : Principe actif obtenu à partir de *Pichia anomala* en dehors de l'invention

Le principe actif de l'exemple 5 correspond à l'extrait D de la demande FR2897266. Il est obtenu par un procédé comprenant la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 15 - culture de levures de *Pichia anomala* dans un milieu adapté à leur développement
- centrifugation pour récupérer la biomasse
 - solubilisation de la biomasse
 - hydrolyses enzymatiques simultanées d'au moins deux enzymes à pH acide,
 - séparation des phases solubles et insolubles
- 20 - traitement thermique
- filtration, et
 - filtration stérilisante.

Le principe actif obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- teneur en matières sèches : entre 5 et 53g/l
- 25 - pH entre 4 et 9
- teneur en protéines entre 4 et 100% en poids de matières sèches,
 - teneur en sucres préférentiellement comprise entre 20 et 34% en poids de matières sèches.

I.6 Exemple 6 : Principe actif obtenu à partir de *Pichia anomala* en dehors de l'invention

- 30 Le principe actif de l'exemple 6 correspond à l'extrait E de la demande FR2897266. Il est obtenu par un procédé comprenant la mise en œuvre des étapes suivantes :

12

- culture de levures de *Pichia anomala* dans un milieu adapté à leur développement
- centrifugation pour récupérer la biomasse
- solubilisation de la biomasse dans un milieu hydroglycolique,
- hydrolyses enzymatiques simultanées d'au moins deux enzymes à pH acide,

- 5
- séparation des phases solubles et insolubles
 - traitement thermique
 - filtration, et
 - filtration stérilisante.

Le principe actif obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- 10
- teneur en matières sèches : entre 172 et 300g/l
 - pH entre 4 et 9
 - teneur en protéines entre 23 et 57% en poids de matières sèches,
 - teneur en sucres comprise entre 11 et 58%, préférentiellement entre 19 et 33% en poids de matières sèches.

15 I.7 Exemple 7 : Principe actif obtenu à partir de *Pichia anomala* en dehors de l'invention

Le principe actif de l'exemple 7 correspond un principe actif selon la demande FR2938768.

Il est obtenu par un procédé comprenant la mise en œuvre des étapes suivantes :

- solubilisation de *Pichia anomala* dans l'eau
 - hydrolyse enzymatique pour couper les protéines et obtenir une fraction protéique de
- 20
- masse moléculaire inférieure à 5000 Da,
 - inactivation enzymatique par traitement thermique
 - séparation des phases soluble et insoluble
 - élimination de la fraction protéique de masse moléculaire inférieure à 5000 Da par ultrafiltration
- 25
- filtrations.

Le principe actif obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- teneur en matières sèches : entre 26 et 40 g/l
 - pH entre 6 et 7
 - teneur en protéines inférieure à 45%, préférentiellement inférieure à 30%, constitués de
- 30
- peptides de masse moléculaire supérieure à 5000 Da,
 - teneur en sucres supérieure à 30%, préférentiellement supérieure 50%.

I.8 Exemple 8 : Utilisation d'un principe actif selon l'invention dans une crème

	Phase A.	Eau	QSP 100%
		Glycérine	3%
	Phase B.	Lanol 99 (Seppic)	5%
5		DUB ZENOATE (Stéarinerie DUBOIS)	6%
		DUB MCT5545 (Stéarinerie DUBOIS)	5%
		DUB RGAE (Stéarinerie DUBOIS)	2%
		DUB SC15P (Stéarinerie DUBOIS)	5%
		Cire de Lanol (Seppic)	3%
10	Phase C.	Conservateur	0,7 %
		Principe actif selon l'invention (exemple 1)	3%
	Phase D.	Oxyde de fer (CI 77491, CI77492, CI 77499)	0,06%
		Kaolin et oxydes de fer (CI Y43)	0,1%
		Kaolin et oxydes de fer (CI R102)	0,4%
15		TiO ₂	3,8%

Les quantités indiquées sont données en pourcentage de poids.

Cette émulsion ocre rosé claire, onctueuse et brillante, sans odeur présente un pH de 5,5.

En application topique, elle présente une application aisée et douce, un étalement souple et glissant, une pénétration très rapide, un fini doux et sec, une bonne couvrance et un effet "bonne mine".

Elle peut être obtenue par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- chauffer A au bain-marie à 80°C sous agitation magnétique,
 - mélanger B, chauffer au bain-marie à 80°C sous agitation magnétique,
 - émulsionner B dans A sous rotor sator à 1200 tours/min,
 - 25 - A 30°C, ajouter C, dans l'ordre indiqué, sous rotor stator à 1500 tours/minute,
 - laisser refroidir et ajouter un à un les colorants de la phase D et laisser agiter jusqu'à
- complète homogénéisation.

I.9 Exemple 9 Utilisation d'un principe actif selon l'invention dans un sérum sublimateur

	Phase A.	Eau	QSP 100%
30		Carbopol Aqua SF1 (Novéon)	3%
	Phase B.	DC345 (Dow Corning)	3%
		DC5200 (Dow Corning)	3%

14

Phase C.	Conservateur	0,7%
	Principe actif selon l'invention (exemple 1)	3%
Phase D.	Mica et oxyde de fer (CI 77019, CI77491)	0,5%
Phase E.	NaOH	QSP pH6

5 Les quantités indiquées sont données en pourcentage de poids.

Ce gel cuivré et brillant, fluide avec une odeur légère présente un pH de 6.

En application topique, il présente une préhension facile, un étalement glissant et soyeux, une pénétration immédiate, une sensation fraîche, un fini doux et sec et un effet anti-imperfection immédiat.

10 Il peut être obtenu par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- mélanger A, B et C
- agiter sous pale mécanique à 1000 tr/min
- ajouter D, petit à petit, toujours sous agitation
- ajuster le pH avec E et laisser agiter jusqu'à complète homogénéisation.

15 I.10 Exemple 10 : Utilisation d'un principe actif selon l'invention dans une crème légère

Phase A.	Eau	QSP 100%
	Glycérine	6%
	Carbopol Ultrez 10 (Novéon)	0,6%
	Montanox 60 (Seppic)	3,5%
20 Phase B.	DC5200 (Dow Corning)	4%
	DUB Heliocrystal (Stearinerie Dubois)	10%
Phase C.	Conservateur	0,7%
	Principe actif selon l'invention (exemple 1)	3%
Phase D.	NaOH	QSP pH5,2

25 Les quantités indiquées sont données en pourcentage de poids.

Ce gel émulsionné, blanc, onctueux et brillant, sans odeur présente un pH de 5,2.

En application topique, il présente une application souple et légère, un étalement doux et glissant, une pénétration rapide et un fini doux et sec.

Il peut être obtenu par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 30
- mélanger A et chauffer au bain-marie à 60°C sous agitation magnétique,
 - mélanger B et chauffer au bain-marie à 60°C sous agitation magnétique,
 - émulsionner B dans A sous rotor sator à 1800 tours/min,

15

- à 30°C, ajouter C, dans l'ordre indiqué, sous rotor stator à 1500 tours/minute,
- ajuster le pH avec E et laisser refroidir sous agitation en vérifiant l'homogénéisation.

I.11 Exemple 11 : Utilisation d'un principe actif selon l'invention dans un baume douceur

	Phase A.	Eau	QSP 100%
5		Blanose 7M31CF (Herculès)	1,5%
		Viscogum BE (Degussa)	1,5%
	Phase B.	Sterol CC5595 (Cesalpinia)	6%
		Sorbitol L (Cesalpinia)	3%
		Phytowax 12L44 (Sophim)	3%
10		Phytowax 18L57 (Sophim)	3%
		DUB GMS AE (Stéarinerie Dubois)	2%
	Phase C.	Conservateur	0,7%
		Principe actif selon l'invention (exemple 1)	3%

Les quantités indiquées sont données en pourcentage de poids.

15 Cette émulsion-gel, blanche, épaisse et onctueuse, avec une légère odeur de pyrazine, présente un pH de 6,3.

En application topique, il présente une application légère, un étalement aisé et glissant, une pénétration assez rapide, un effet frais, une sensation ultra douce, et un fini sec et mat.

Il peut être obtenu par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 20
- mélanger A en veillant à bien disperser le gel sous agitation mécanique
 - chauffer A au bain-marie à 80°C sous agitation mécanique,
 - mélanger B et chauffer au bain-marie à 70°C sous agitation magnétique,
 - émulsionner B dans A sous rotor sator à 1600 tours/min,
 - à 30°C, ajouter C, dans l'ordre indiqué, sous rotor stator à 1000 tours/minute,
- 25
- laisser refroidir en abaissant régulièrement la vitesse d'agitation jusqu'à complète homogénéisation.

II. EVALUATION DE L'EFFICACITE COSMETIQUE D'UN PRINCIPE ACTIF SELON L'INVENTION

II. A. Tests in vitro

II. A.1 – Caractérisation du phénotype inflammatoire chronique

30 L'objectif est de modéliser :

- dans un premier temps : l'effet d'irradiations solaires (UVB) répétées sur l'induction de la sénescence des kératinocytes et consécutivement sur la production de leur sécrétome inflammatoire

- dans un second temps : la construction d'une peau à partir de kératinocytes sénescents et inflammés (SASP – phénotype sécrétoire associé à la sénescence)

La caractérisation de la sénescence des kératinocytes a été réalisée par mesure de l'activité β -galactosidase et de la prolifération (Ki-67).

Parallèlement, l'analyse du profil inflammatoire a été faite à l'aide de dosages ELISA : Interleukine-6 et Interleukine-8, médiateurs impliqués dans le SASP.

10 La caractérisation des peaux reconstruites a été réalisée par l'étude :

- des modifications morphologiques par coloration HES,

- du sécrétome par dosage ELISA des IL-6 et IL-8,

- des modifications du compartiment épidermique par marquage immunohistologique de la filaggrine,

15 - des modifications de la jonction dermo-épidermique par marquage immunohistologique du collagène VII,

- des modifications des marqueurs de la matrice dermique par marquage immunohistologique du procollagène I ou de l'acide hyaluronique et par l'étude de l'expression de la tropoélastine par PCR quantitative.

20 a. Caractérisation du phénotype SASP des kératinocytes

Pour la caractérisation du phénotype SASP des kératinocytes, le protocole opératoire est le suivant :

- A J0, les kératinocytes humains sontensemencés et incubés à 37°C ,

- Pendant plusieurs jours, on active la sénescence par irradiations répétées :

25 ○ Les irradiations (UVB) sont réalisées à l'aide d'une lampe UV « Bio-Sun » (Vilber-Lourmat, France).

○ Après 6h d'incubation,

▪ les sécrétomes de kératinocytes sont récupérés et congelés en attente de la caractérisation de leur profil inflammatoire par dosage ELISA des IL-6 (BioLegend) et IL-8 (R&D Systems).

30

▪ les kératinocytes sont trypsinés etensemencés afin de caractériser leur état de sénescence (Ki-67 / Activité β -galactosidase).

- Le dernier jour :

- La visualisation de l'activité β -galactosidase est réalisée à l'aide du kit : « Senescence cells histochemical staining » (Sigma).

L'activité β -galactosidase est visualisée sur microscope couplé à un système d'analyse d'images.

Son activité est proportionnelle à l'intensité de coloration bleue présente dans le cytoplasme cellulaire. Plus la couleur bleue est intense, plus l'activité β -galactosidase est importante.

De plus, une analyse quantitative des images a été réalisée à l'aide d'un logiciel. Cette quantification est exprimée en Unité Arbitraire (UA).

- La prolifération cellulaire est visualisée et quantifiée par marquage immunocytologique du Ki-67.

Réalisation du marquage immunocytologique puis visualisation réalisée sur microscope couplé à un système d'analyse d'images.

Les noyaux des cellules apparaissent colorés en bleu. Le marquage Ki-67 est visualisé par une fluorescence jaune présente au niveau des noyaux cellulaires.

Une analyse quantitative des images a été réalisée à l'aide d'un logiciel, permettant de déterminer un pourcentage de cellules Ki-67 positives.

Les irradiations répétées sur les kératinocytes entraînent l'acquisition d'un phénotype SASP caractérisé par :

- une augmentation de 156% de l'activité β -galactosidase
- une diminution de la prolifération cellulaire
- une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : de 135% d'interleukine-6 et de 93% de l'interleukine-8.

b. Caractérisation des peaux reconstruites SASP

Pour la caractérisation des peaux reconstruites, le protocole opératoire est le suivant :

- A J0, les kératinocytes humains normaux et SASP sont trypsinés et ensemencés sur une lattice de collagène contenant des fibroblastes humains normaux pour réaliser la construction d'une peau respectivement normale et SASP

- Le dernier jour :

- les sous-nageants tissulaires sont récupérés et congelés à -80°C avant dosage
- les peaux reconstruites sont récupérées :
 - pour les études histologiques, les peaux reconstruites sont :
 - * soit incluses en Tissue-Tek[®] puis congelées. Des coupes (4µm) sont ensuite réalisées à l'aide d'un cryostat

5

- * soit fixées, déshydratées et incluses en paraffine. Des coupes (4µm) sont réalisées à l'aide d'un microtome

Pour les études en PCR quantitative, les peaux reconstruites sont récupérées et les ARN totaux extraits.

- 10 L'analyse des peaux reconstruites est réalisée par coloration Hématoxyline Eosine Safran (HES). La visualisation est réalisée sur microscope couplé à un système d'analyse d'images. L'épaisseur des épidermes (couches cellulaires vivantes) a été mesurée sur les coupes histologiques après la coloration HES.

L'analyse du sécrétome est réalisé par dosage ELISA des IL-6 et IL-8 à l'aide de kits dédiés.

- 15 L'analyse des modifications des différents compartiments par immunohistologie, se fait à l'aide de :

- l'immunomarquage :

- de la filaggrine pour le compartiment épidermique
- du collagène VII pour la jonction dermo-épidermique

20

- du pro-collagène I et de l'acide hyaluronique pour le compartiment dermique

- la visualisation réalisée sur microscope couplé à un système d'analyse d'images, et

- l'analyse quantitative des images est réalisée à l'aide d'un logiciel.

La synthèse des différents marqueurs étudiés est proportionnelle à l'intensité de la fluorescence (couleur verte) présente sur les coupes de peaux reconstruites

- 25 L'étude de l'expression de la tropoélastine par PCR quantitative est réalisée parallèlement. Les ARN sont reverse-transcrits et les ADN complémentaires obtenus sont analysés par la technique de PCR quantitative. Les ARNm de la protéine ribosomale S27, témoin interne de référence, sont également réalisés en parallèle des ARNm de la tropoélastine.

la quantification de l'incorporation de fluorescence est mesurée en continu à l'aide d'un

30

thermocycleur et l'analyse des Ct (quantification relative) est réalisée à l'aide d'un logiciel.

Les résultats montrent qu'en réponse aux irradiations répétées, les kératinocytes humains acquièrent un phénotype SASP caractérisé par un état de sénescence cellulaire et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

Intégrés dans une peau reconstruite, ces derniers permettent l'obtention d'un modèle
5 modifié avec :

- un niveau inflammatoire caractérisé par une augmentation de 39% des interleukines IL-6 et de 47% des interleukines IL-8,
- au niveau épidermique une diminution de 52% de l'épaisseur de l'épiderme et de la synthèse de filaggrine
- 10 - au niveau de la jonction épidermique une diminution de 51% de la synthèse de collagène VII
- au niveau du derme, une diminution de 14% de la synthèse de procollagène I, une forte diminution de la synthèse d'acide hyaluronique et une diminution de 75% de la transcription de la tropoélastine.

15 II. A.2 Efficacité du principe actif selon l'invention sur l'inflammation chronique

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet d'un principe actif selon l'invention sur sa capacité à limiter l'inflammation chronique tissulaire et comparer cet effet à d'autres principes actifs issus de *Pichia anomala*.

Pour cela, l'étude a porté sur :

- 20 - les modifications morphologiques des peaux reconstruites par coloration HES,
- le sécrétome des peaux reconstruites par dosage ELISA des IL-6 et IL-8,
- les modifications du compartiment épidermique par marquage immunohistologique de la filaggrine,
- 25 - les modifications de la jonction dermo-épidermique par marquage immunohistologique de collagène VII,
- les modifications de la matrice dermique par marquage immunohistologique de procollagène I et de l'acide hyaluronique, et par l'étude de l'expression génique de la tropoélastine par PCR quantitative.

30 Le protocole opératoire est décrit en suivant.

A J0, les kératinocytes humains normaux et SASP sont trypsinés et ensemencés sur une lattice de collagène contenant des fibroblastes humains normaux pour réaliser la construction d'une peau respectivement normale et SASP.

Pendant plusieurs jours, les peaux reconstruites normales et SASP sont traitées avec le principe actif selon l'invention de l'exemple 1 à 0,25% (V/V) ou avec le principe actif de l'exemple 7 à 0,25% (V/V).

Le dernier jour :

- les sous-nageants tissulaires sont récupérés et congelés à -80°C avant dosage
- pour les études histologiques : les peaux reconstruites sont :
 - 10 * soit incluses en Tissue-Tek[®] puis congelées. Des coupes (4µm) sont ensuite réalisées à l'aide d'un cryostat.
 - * soit fixées, déshydratées et incluses en paraffine. Des coupes (4µm) sont réalisées à l'aide d'un microtome.
- Pour les études de biologie moléculaire : les peaux reconstruites sont récupérées et les ARN totaux extraits.

Les protocoles pour l'étude des peaux reconstruites sont ceux décrits au point II.A.1.

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux ci-après :

	Mesure de l'épaisseur de l'épiderme (µm)	Efficacité/ PR SASP témoin (%)
Peaux reconstruites normales		
Témoin	154	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	152	
Peaux reconstruites SASP		
Témoin	74	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	109	+47%
Principe actif de l'exemple 7 à 0,25%	78	+5%

Tableau 1 : analyse morphologique des peaux reconstruites par coloration HES

Ces résultats montrent que testé à 0,25% sur peaux reconstruites fabriquées à partir de kératinocytes humains SASP, le principe actif selon l'invention permet d'augmenter

l'épaisseur de 47%. En outre, on constate que des extraits de *Pichia anomala* ne présentant pas les caractéristiques du principe actif selon l'invention n'ont pas cette efficacité.

	Taux de IL-6 (pg / ml)	Efficacité / PR SASP témoin (%)
Peaux reconstruites normales		
Témoin	508	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	436	
Peaux reconstruites SASP		
Témoin	708	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	469	-34%
Principe actif de l'exemple 7 à 0,25%	1034	+46%

Tableau 2 : analyse du sécrétome par dosage ELISA – IL-6

	Taux de IL-8 (pg / ml)	Efficacité / PR SASP témoin (%)
Peaux reconstruites normales		
Témoin	797	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	922	
Peaux reconstruites SASP		
Témoin	1171	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	790	-33%
Principe actif de l'exemple 7 à 0,25%	1869	+60%

Tableau 3 : analyse du sécrétome par dosage ELISA – IL-8

- 5 Ces résultats montrent que testé à 0,25% sur peaux reconstruites fabriquées à partir de kératinocytes humains SASP, le principe actif selon l'invention permet de réduire la synthèse des IL-6 de 34% et des IL-8 de 33%, limitant ainsi le phénomène d'inflammation. En outre, on constate que des extraits de *Pichia anomala* ne présentant pas les caractéristiques du principe actif selon l'invention n'ont pas cette efficacité.

22

	Moyenne d'intensité du marquage de filaggrine (x 10 ⁴ UA)	Efficacité/ PR SASP témoin (%)
Peaux reconstruites normales		
Témoin	1 750	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	1 946	
Peaux reconstruites SASP		
Témoin	264	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	505	+91%

Tableau 4 : analyse des modifications du compartiment épidermique

Ces résultats montrent que testé à 0,25% sur peaux reconstruites fabriquées à partir de kératinocytes humains SASP, le principe actif selon l'invention permet d'augmenter la

5 synthèse de filaggrine de 91%.

	Moyenne d'intensité du marquage de collagène VII (x 10 ⁶ UA)	Efficacité/ PR SASP témoin (%)
Peaux reconstruites normales		
Témoin	391	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	572	
Peaux reconstruites SASP		
Témoin	191	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	304	+59%

Tableau 5 : analyse des modifications de la jonction dermo-épidermique

Ces résultats montrent que testé à 0,25% sur peaux reconstruites fabriquées à partir de kératinocytes humains SASP, le principe actif selon l'invention permet d'augmenter la synthèse de collagène VII de 59%.

	Moyenne d'intensité du marquage de procollagène I (x 10 ⁵ UA)	Efficacité/ PR SASP témoin (%)
Peaux reconstruites normales		
Témoin	316	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	331	
Peaux reconstruites SASP		
Témoin	271	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	307	+13%

Tableau 6 : analyse des modifications de la matrice dermique par marquage du procollagène

Les résultats du marquage immunohistologique de l'acide hyaluronique étant qualitatifs, il a été défini 3 niveaux de marquage fluorescent :

- Faible détection (couleur verte faible) -
- 5 - Moyenne détection (couleur verte moyenne) ++
- Forte détection (couleur verte intense) +++

	Intensité du marquage de l'acide hyaluronique
Peaux reconstruites normales	
Témoin	+++
Peaux reconstruites SASP	
Témoin	-
Principe actif de l'exemple 1 0,25%	++

Tableau 7 : analyse des modifications de la matrice dermique par marquage de l'acide hyaluronique

- Ces résultats montrent que testé à 0,25% sur peaux reconstruites fabriquées à partir de
- 10 kératinocytes humains SASP, le principe actif selon l'invention permet d'augmenter la synthèse d'acide hyaluronique.

	Expression de la tropoélastine	Efficacité/ PR SASP témoin (%)
Peaux reconstruites normales		
Témoin	100	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	96	
Peaux reconstruites SASP		
Témoin	25	
Principe actif de l'exemple 1 à 0,25%	39	+56%

Tableau 8 : analyse des modifications de la matrice dermique par étude de l'expression de la tropoélastine par PCR quantitative

Ces résultats montrent que testé à 0,25% sur peaux reconstruites fabriquées à partir de kératinocytes humains SASP, le principe actif selon l'invention permet d'augmenter la
 5 synthèse de procollagène I de 10%, la synthèse de l'acide hyaluronique et l'expression de la tropoélastine de 56%.

Le principe actif selon l'invention permet donc bien de limiter l'inflammation chronique tissulaire en particulier en :

- 10 - limitant l'inflammation via IL-6 et IL-8
- augmentant l'épaisseur de l'épiderme
- maintenant fonctionnel le compartiment épidermique via la synthèse de filaggrine
- maintenant fonctionnel la jonction dermo-épidermique via la synthèse de collagène VII
- 15 - maintenant fonctionnel le compartiment dermique via la synthèse de procollagène I, de l'acide hyaluronique et de l'expression de la tropoélastine.

En outre, on constate que ces efficacités sont liées à la spécificité du principe actif selon l'invention, puisque les essais comparatifs montrent qu'avec un autre extrait de *Pichia anomala*, les mêmes effets ne sont pas obtenus.

20 II. B. Tests in vivo

L'objectif de ces essais est d'évaluer l'effet d'un principe actif selon l'invention (exemple 1) formulé à 3% en émulsion après 28 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison à un placebo.

La composition de l'émulsion utilisée est la suivante :

	Isonyl isononoate (Lanol 99, Seppic)	5,0%
	Principe actif de l'exemple 1	3,0%
	Behenyl alcohol/arachidyl glucoside/Arachidyl alcohol (Montanov 202, Seppic)	3,0%
5	Cetearyl alcohol/cetearyl glucoside (Montanov 68, Seppic)	2,0%
	Phenoxyethanol/methylparaben/ethylparaben/propylparaben (Phenonip XB, Clariant)	0,7%
	Polyacrylamide/C13-14 isoparaffin/laureth7 (Sepigel 305, Seppic)	0,3%
	Eau	qsp 100%

10 L'étude a été menée sur 22 volontaires sains de sexe féminin, d'âge compris entre 56 et 71 ans. Les caractéristiques cutanées suivantes ont été étudiées :

- l'organisation des fibres de la matrice dermique
- les propriétés biomécaniques de la peau
- le relief cutané au niveau de la patte d'oie

15 II. B.1 – Modélisation du phénotype inflammatoire chronique

Les volontaires participant à cette étude ont été sélectionnés en croisant différents critères :

- l'âge moyen des volontaires est supérieur à 55 ans, car avec l'âge le système immunitaire devient moins efficace et le niveau circulant de cytokines inflammatoires augmente
- 20 - les volontaires doivent avoir été photoexposés au cours de leur vie car la photoexposition favorise l'inflammaging et la perte de collagène
- les volontaires ont un niveau d'IL-1 α élevé, car l'IL-1 α est un régulateur important du phénotype SASP.

II. B.2 – Effet du principe actif selon l'invention sur la matrice dermique

25 L'objectif de l'étude est d'évaluer, *in vivo*, la capacité d'un principe actif selon l'invention formulé à 3% en émulsion, à favoriser la restructuration de la matrice dermique désorganisée avec l'âge et les phénomènes inflammatoires chroniques. Cette étude a été réalisée contre placebo, au niveau des joues, par microscopie confocale.

30 Dans cette étude, des acquisitions du réseau des fibres ont été réalisées par microscopie confocale (Vivascope 1500 trislaser) avant et après 28 jours de traitement biquotidien.

Pour l'observation du derme papillaire et l'évaluation des fibres de collagènes, la longueur d'onde de 785 nm a été choisie. Des coupes horizontales ont été réalisées juste sous les papilles dermiques afin de déterminer 2 zones représentatives de cette coupe horizontale. Puis, sur chacune de ces 2 zones, une série de coupes horizontales de l'image a été réalisée

5 afin de balayer le derme, en descendant pas à pas jusqu'à une profondeur relative de 60µm. Les images situées à une profondeur relative de 40µm ont été retenues pour l'analyse visuelle réalisée à l'aide d'une échelle de score comprenant 4 stades par un jury entraîné, composé de 3 experts.

Lors de son évaluation, le jury prend en compte à la fois l'aspect de la matrice dermique et

10 celui des fibres : lorsque la matrice dermique n'est pas altérée comme dans le cas d'une peau jeune ou sur des zones protégées, le collagène apparaît sous forme de structures fibrillaires brillantes et allongées disposées à la façon d'une toile d'araignée. L'observation d'une peau âgée ou de zones photoexposées montrent, à l'inverse, un collagène composé de fibres épaisses, grossièrement disposées, recroquevillées et fragmentées, présentant un

15 aspect spongieux.

L'échelle suivante permet de visualiser la classification utilisée par le jury :

	Aspect de la matrice		Aspect des fibres	
	Réseau en toile d'araignée	Réseau grossier et spongieux	Réseau en toile d'araignée	Réseau grossier et spongieux
Stade 4	++	-	++	-
Stade 3	+	+/-	+	+/-
Stade 2	+/-	+	+/-	+
Stade 1	-	++	-	++

Altération du derme ↓

Le protocole opératoire de l'étude est le suivant :

Entre J-14 et J0, les volontaires s'appliquent deux fois par jour une crème placebo sur l'ensemble du visage.

20 A J0, on détermine deux zones cutanées symétriques au niveau des joues et on réalise des acquisitions par microscopie confocale au niveau de ces deux zones.

Entre J0 et J27, le placebo et l'émulsion contenant le principe actif selon l'invention sont appliqués en héli-visage.

25 A J28, on réalise de nouvelles acquisitions par microscopie confocale au niveau des deux zones.

Dans les conditions de cette étude, après 28 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison au placebo, l'évaluation réalisée sur échelle de grade par un jury d'experts a montré une amélioration de l'aspect de la matrice dermique de 35,4% avec le principe actif selon l'invention formulé à 3%.

En particulier, l'utilisation du principe actif selon l'invention permet :

- de réduire le stade d'organisation de la matrice dermique
- de passer d'un morphotype peau âgé (stade 1 à 2) à un morphotype se rapprochant de celui d'une peau jeune (stade 3 à 4).

L'utilisation du principe actif selon l'invention permet donc d'améliorer l'organisation de la matrice dermique et ainsi de minimiser les méfaits induits par les phénomènes inflammatoires chroniques.

II. B.3 – Effet du principe actif selon l'invention sur les propriétés biomécaniques de la peau

L'objectif de l'étude est d'évaluer, *in vivo*, l'effet d'un principe actif selon l'invention formulé à 3% en émulsion contre placebo, sur l'amélioration des propriétés biomécaniques de la peau. En effet, le phénomène d'inflammaging engendre le déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des fibres de collagène, rendant la peau moins élastique et plus relâchée.

Dans cette étude, l'analyse des propriétés biomécaniques de la peau est réalisée à l'aide d'un cutomètre au niveau des joues avant et après 28 jours d'applications biquotidiennes.

La peau est aspirée dans l'orifice d'une sonde de diamètre 6 mm par une dépression constante pendant une durée constante. Plusieurs aspirations successives sont effectuées. La profondeur de pénétration de la peau dans la sonde est mesurée par le biais de deux prismes optiques placés à l'ouverture de la sonde. A partir des courbes obtenues il est possible de calculer divers paramètres caractéristiques des propriétés biomécaniques de la peau.

Parmi tous les paramètres calculés à partir des courbes obtenues, les paramètres suivants sont retenus pour quantifier l'évolution des propriétés biomécaniques au niveau des joues :

- L'élasticité de la peau est appréciée par le paramètre R5 : Elasticité nette

28

Si R5 augmente, l'élasticité de la peau augmente.

- La tonicité de la peau est appréciée par le paramètre X : tonicité ou rétractation élastique

$$X = (U_f - U_r) = R_0 (1 - R_7)$$

5 Si 1/X ou -X augmente, la tonicité augmente.

Le protocole opératoire de l'étude est le suivant :

Entre J-14 et J0, les volontaires s'appliquent deux fois par jour une crème placebo sur l'ensemble du visage.

10 A J0, on détermine deux zones cutanées symétriques au niveau des joues et on réalise des au cutomètre au niveau de ces deux zones.

Entre J0 et J27, le placebo et l'émulsion contenant le principe actif selon l'invention sont appliqués en héli-visage.

A J28, on réalise de nouvelles mesures au cutomètre au niveau des deux zones.

Les résultats obtenus montrent une variation à J28 entre principe actif et placebo :

- 15
- de 8,6% pour le paramètre R5
 - de 8,0% pour le paramètre -X.

Dans les conditions de cette étude, après 28 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison au placebo, le principe actif selon l'invention formulé à 3% en émulsion augmente donc :

- 20
- l'élasticité de la peau de 8,6%
 - la tonicité de la peau de 8,0%.

En améliorant l'élasticité de la peau, le principe actif selon l'invention permet ainsi de lutter contre les manifestations cutanées engendrées par le phénomène d'inflammaging.

II. B.4 – Effet du principe actif selon l'invention sur le relief cutané

25 Les rides qui apparaissent notamment au coin de l'œil sont le résultat d'une perte de collagène due à l'âge accentuée par des phénomènes tel que l'inflammation chronique.

Ainsi, l'objectif de l'étude est d'évaluer in vivo l'effet anti-rides d'un principe actif selon l'invention formulé à 3% contre placebo.

30 Dans cette étude, l'analyse du relief cutané est réalisée à l'aide d'un appareil à projection de franges au niveau des pattes d'oie avant et après 28 jours d'applications biquotidiennes.

L'appareil à projection de franges comprend un capteur de mesure associant un projecteur de franges lumineuses et une caméra CCD haute résolution reliée à un logiciel d'acquisition. Un système de repositionnement de la tête du volontaire selon les 3 axes de déplacement permet de retrouver la même zone de mesure aux différents temps de l'étude.

- 5 L'effet du produit est mesuré sur une région d'intérêt de 18X18mm découpée automatiquement sur l'acquisition originale.

Le microrelief de la peau est étudié par deux paramètres de rugosité en 3D

- Sq : moyenne quadratique de rugosité de surface.
- Sa : moyenne arithmétique de rugosité de surface.

- 10 Le volume de la ride est étudié par un paramètre de volume

- volume négatif : volume inférieur à la surface de la peau.

Une diminution de ces différents paramètres est caractéristique d'un lissage du relief de la surface étudiée et d'une diminution des rides.

Le protocole opératoire de l'étude est le suivant :

- 15 Entre J-14 et J0, les volontaires s'appliquent deux fois par jour une crème placebo sur l'ensemble du visage.

A J0, on détermine deux zones cutanées symétriques au niveau des pattes d'oie et on réalise des mesures de projection de franges au niveau de ces deux zones.

- 20 Entre J0 et J27, le placebo et l'émulsion contenant le principe actif selon l'invention sont appliqués en hémi-visage.

A J28, on réalise de nouvelles mesures de projection de franges au niveau des deux zones.

Dans les conditions de cette étude, après 28 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison au placebo, le principe actif selon l'invention formulé à 3% en émulsion:

- 25
- lisse le relief cutané au niveau des pattes d'oie, en diminuant les paramètres de la rugosité : -6,8% pour le paramètre Sa et -6,7% pour le paramètre Sq
 - réduit les rides en diminuant le paramètre volume négatif (-14,8%)

Le principe actif selon l'invention permet ainsi de lutter contre les manifestations sur le relief cutané, engendrées par le phénomène d'inflammaging.

- 30 Ces différents essais montrent donc bien les effets cosmétiques d'un principe actif obtenu à partir de *Pichia anomala* selon l'invention et d'une composition cosmétique l'incluant, sur le phénomène d'inflammaging.

REVENDICATIONS

1. Hydrolysats de *Pichia anomala* comprenant au moins 30% de biopeptides et moins de 10% de sucres en poids par rapport au poids total de matières sèches, caractérisé en ce qu'au moins une partie des biopeptides sont des biopeptides de masses moléculaires inférieures à 5000Da.
- 5 2. Hydrolysats de *Pichia anomala* selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'au moins 50% des biopeptides sont des biopeptides de masses moléculaires inférieures à 5000Da.
3. Hydrolysats de *Pichia anomala* selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'au moins 85% des biopeptides sont des biopeptides de masses moléculaires inférieures à 5000Da.
- 10 4. Hydrolysats de *Pichia anomala* selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 50% de biopeptides en poids de matières sèches.
5. Hydrolysats de *Pichia anomala* selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé comprenant au moins une hydrolyse basique et au moins une hydrolyse enzymatique des protéines.
- 15 6. Hydrolysats de *Pichia anomala* comprenant des biopeptides de masses moléculaires inférieures à 5000Da, pour son application comme principe actif destiné à lutter contre le phénomène d'inflammation chronique de la peau.
7. Hydrolysats de *Pichia anomala* selon l'une des revendications 1 à 5, pour son application comme principe actif destiné à lutter contre le phénomène d'inflammation
20 chronique de la peau.
8. Hydrolysats de *Pichia anomala* selon l'une des précédentes revendications, pour son application comme principe actif destiné à limiter les échanges pro-inflammatoires entre l'épiderme et le derme.
9. Hydrolysats de *Pichia anomala* selon l'une des précédentes revendications, pour son
25 application comme principe actif destiné à moduler la communication entre les cellules sénescentes cutanées et leur environnement.
10. Composition cosmétique pour application topique, caractérisée en ce qu'elle comprend un principe actif selon l'une des revendications 1 à 9, présent entre 0,1 et 3% en poids total de la composition.

11. Procédé d'obtention d'un hydrolysate de *Pichia anomala* selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend au moins la succession des étapes suivantes :

- solubilisation de *Pichia anomala* dans l'eau
- 5 - hydrolyse basique de la solution de *Pichia anomala*
- séparation des phases soluble et insoluble
- récupération de la phase soluble
- filtration et purification pour récupérer les macromolécules
- hydrolyse enzymatique des protéines
- 10 - filtration et purification pour récupérer les peptides de taille inférieure à 5000Da



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement
national

FA 791682
FR 1450565

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,D	FR 2 897 266 A1 (LIMOUSINE D APPLIC BIOLOG DITE [FR]) 17 août 2007 (2007-08-17) * le document en entier *	1-11	A61K38/14 A61Q19/08
Y,D	FR 2 938 768 A1 (LIMOUSINE D APPLIC BIOLOG DITE [FR] LIMOUSINE D APPLIC BIOLOG DITESILA) 28 mai 2010 (2010-05-28) * le document en entier *	1-11	
X	WO 2009/101503 A2 (LESAFFRE & CIE [FR]; JUSTEN PETER [FR]; BORREILL DOMINIQUE MARIE NOELL) 20 août 2009 (2009-08-20)	1-5,10	
Y	* voir revendications, page 10 et exemples 1-4 *	1-11	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			A61Q A61K A61P
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
11 septembre 2014		Merckling-Ruiz, V	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1450565 FA 791682**

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 **11-09-2014**

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 2897266	A1	17-08-2007	AUCUN	

FR 2938768	A1	28-05-2010	AUCUN	

WO 2009101503	A2	20-08-2009	AU 2009213799 A1	20-08-2009
			EP 2252258 A2	24-11-2010
			FR 2927254 A1	14-08-2009
			JP 2011514320 A	06-05-2011
			KR 20100121477 A	17-11-2010
			RU 2010133507 A	20-03-2012
			US 2011052514 A1	03-03-2011
			US 2013287715 A1	31-10-2013
			WO 2009101503 A2	20-08-2009
