

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
10 juin 2010 (10.06.2010)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/063977 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 8/97 (2006.01) *A61K 36/752* (2006.01)
A61K 8/99 (2006.01) *A61K 36/42* (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01) *A61K 36/185* (2006.01)
A61K 36/04 (2006.01) *A61K 36/062* (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2009/052410

(22) Date de dépôt international :

4 décembre 2009 (04.12.2009)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

0858308 5 décembre 2008 (05.12.2008) FR

(71) *Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :*
**SOCIÉTÉ INDUSTRIELLE LIMOUSINE
D'APPLICATION BIOLOGIQUE, DITE SILAB** [FR/
FR]; Lieu dit Madrias, F-19130 Objat (FR).

(72) Inventeur; et

(75) *Inventeur/Déposant (pour US seulement) :* **PAUFIQUE,
Jean** [FR/FR]; Lieu dit Madrias, F-19130 Objat (FR).

(74) *Mandataire :* **CENATIEMPO, Julie; AQUINOV**, Allée
de la Forestière, F-33750 Beychac et Caillau (FR).

(81) *États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) :* AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,

CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) *États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) :* ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

- *relative au droit du déposant de revendiquer la priorité
de la demande antérieure (règle 4.17.iii)*
- *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)*

Publiée :

- *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*
- *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues (règle 48.2.h)*

(54) **Title :** COSMETIC USE OF SKIN CELL AUTOPHAGY ACTIVATORS

(54) **Titre :** UTILISATION COSMETIQUE D'ACTIVATEURS DE L'AUTOPHAGIE DES CELLULES CUTANÉES

(57) **Abstract :** The invention relates to the use, in a cosmetic composition, of an effective amount of at least one skin cell autophagy activator as a cosmetic active principle. The invention also relates to cosmetic compositions containing at least one skin cell autophagy activator as a cosmetic active principle 5 and to a cosmetic method for detoxifying the skin and/or for preventing or fighting skin aging.

(57) **Abrégé :** L'objet de l'invention est l'utilisation dans une composition cosmétique d'une quantité efficace d'au moins un activateur de l'autophagie des cellules cutanées comme principe actif cosmétique. L'invention concerne également des compositions cosmétiques comprenant d'au moins un activateur de l'autophagie des cellules cutanées comme principe actif 5 cosmétique, et un procédé cosmétique pour détoxifier la peau et/ou pour prévenir ou lutter contre le vieillissement cutané.



WO 2010/063977 A1

UTILISATION COSMETIQUE

D'ACTIVATEURS DE L'AUTOPHAGIE DES CELLULES CUTANÉES

La présente invention concerne l'utilisation dans une composition cosmétique, d'un activateur de l'autophagie des cellules de la peau comme principe actif cosmétique.

L'invention vise également des compositions cosmétiques comprenant au moins un
5 activateur de l'autophagie des cellules de la peau comme principe actif cosmétique ainsi qu'un procédé cosmétique pour détoxifier la peau et/ou pour prévenir ou lutter contre le vieillissement cutané, comprenant l'application topique sur la peau de telles compositions.

La peau, organe de contact avec l'environnement, est constamment soumise à des
10 agressions, tant externes qu'internes, qui menacent son équilibre et modifient son aspect.

On sait par exemple que l'exposition excessive aux rayons ultraviolets (UV) se traduit par diverses manifestations cutanées, comme des érythèmes actiniques, de l'élastose solaire ou encore l'apparition prématurée des effets du
15 vieillissement cutané : la peau devient lâche, profondément ridée, rugueuse, sèche, parsemée de taches hypopigmentées ou hyperpigmentées et de vaisseaux dilatés. Ces manifestations, qui reflètent de profonds changements structuraux dans le tissu cutané, sont inesthétiques et disgracieuses et beaucoup de gens ont tendance à vouloir les estomper.

20 C'est pourquoi l'objectif de la présente invention est de proposer un moyen efficace pour protéger la peau contre les agressions susceptibles d'altérer son bon fonctionnement et son aspect, et pour lutter contre les manifestations qui en découlent.

Pour y répondre, la présente invention propose d'utiliser comme principe actif cosmétique dans une composition cosmétique au moins un activateur de l'autophagie des cellules de la peau, en particulier des kératinocytes et des fibroblastes.

- 5 En effet, l'utilisation d'au moins un activateur de l'autophagie des cellules cutanées permet de lutter contre l'accumulation de molécules délétères dans les cellules cutanées produites en cas de stress et ainsi lutter contre les manifestations qui en découlent.

En particulier, l'invention vise l'utilisation dans une composition cosmétique d'au
10 moins un activateur de l'autophagie des cellules de la peau, en particulier des kératinocytes et/ou des fibroblastes, comme principe actif, pour détoxifier les cellules cutanées, lutter contre le vieillissement de la peau, restructurer la peau, hydrater et protéger la couche cornée, augmenter le renouvellement cellulaire, protéger les cellules des effets néfastes des radiations UVA et UVB et limiter
15 les phénomènes d'inflammation.

Préférentiellement, l'invention vise l'utilisation dans une composition cosmétique d'au moins un activateur de l'autophagie des cellules de la peau, comme principe actif destiné à détoxifier les cellules de la peau et/ou lutter contre le vieillissement cutané.

- 20 Avantageusement, en augmentant le mécanisme d'autophagie dans les cellules cutanées, l'utilisation selon l'invention permet d'augmenter l'élimination des molécules endommagées, de détoxifier la peau et de limiter le vieillissement cutané.

En effet, dans certaines conditions, en particulier avec l'âge et la surexposition
25 au soleil, les cellules de la peau ne sont plus en état d'évacuer les molécules endommagées par les radiations et les stress divers. Les cellules sont engorgées par ces molécules endommagées et par des radicaux libres. L'utilisation cosmétique d'activateurs de l'autophagie des cellules cutanées selon l'invention

permet de limiter cet engorgement cellulaire et de débarrasser les cellules d'éléments délétères et inutiles qui entravent son fonctionnement optimal en s'accumulant.

L'invention vise également une composition cosmétique pour application topique sur la peau comprenant dans un milieu physiologiquement acceptable, une quantité efficace d'au moins un activateur de l'autophagie des cellules cutanées choisi parmi des principes actifs issus de *Lithothamnium calcareum*, *Melilotus officinalis*, *Citrus limonum*, *Candida saitoana*, *Lens culinaris*, *Averrhoa carambola*, *Momordica charantia*, *Yarrowia lipolytica* et au moins un adjuvant cosmétique.

Préférentiellement l'activateur de l'autophagie des cellules cutanées est présent en une quantité comprise entre 0,1 et 15% en poids par rapport au poids total de la composition.

Enfin l'invention a également pour objet un procédé cosmétique pour détoxifier la peau et/ou pour prévenir ou lutter contre le vieillissement cutané, comprenant l'application topique sur la peau d'une composition comprenant au moins un activateur de l'autophagie des cellules de la peau.

L'invention est maintenant décrite en détail.

La présente invention vise donc l'utilisation dans une composition cosmétique d'un activateur de l'autophagie, en tant que principe actif cosmétique.

L'autophagie est un mécanisme de recyclage et de détoxification des constituants et des organites cellulaires. L'autophagie permet notamment de réguler, réparer et éliminer les protéines de longue durée de vie dans les cellules, assurant ainsi un contrôle au cours de la différenciation et du vieillissement de la peau humaine.

Sur le plan cellulaire, le mécanisme d'autophagie, comprend quatre étapes : l'initiation, la formation d'une vacuole initiale, nommée autophagosome, qui séquestre le matériel cytoplasmique, la maturation de l'autophagosome en vacuole

dégradative et la fusion avec le lysosome, jusqu'à la dégradation du matériel séquestré.

Selon un premier aspect, un activateur de l'autophagie des cellules cutanées utile selon l'invention peut être un principe actif présentant une activité stimulatrice de l'expression des MAP-LC3 (« microtubule-associated membrane protein » protéines membranaires associées aux microtubules) et/ou des ATG5-12 (« Autophagy-related genes », gènes de l'autophagie) des cellules de la peau.

En effet, la formation de l'autophagosome, étape essentielle dans le mécanisme de l'autophagie, implique deux systèmes de conjugaison : le complexe ATG5-12 et les MAP-LC3.

La première étape de l'autophagie est la formation d'une structure multimembranaire, appelée phagophore, dont l'origine reste inconnue. Cette structure s'étend pour former l'autophagosome qui séquestre du matériel cytoplasmique. L'autophagosome fusionne avec le lysosome et son contenu est ensuite dégradé par les enzymes lysosomales. Au cours de la formation de l'autophagosome, des protéines ATG sont recrutées à partir du cytoplasme et s'associent transitoirement avec la membrane autophagosomale.

Ce processus fait intervenir principalement trois complexes protéiques : la PI(3)K de classe III associée à la protéine Bécline 1 et deux systèmes de conjugaison. L'évènement précoce dans l'induction de la formation de l'autophagosome est la production de phosphatidyl inositol 3-phosphate par le complexe Bécline 1-PI(3)K de classe III qui permet le recrutement du premier système de conjugaison ATG12-ATG5, noté aussi ATG5-12. Ce dernier, permet, à son tour, la conjugaison de la phosphatidyl éthanolamine (PE) à la protéine MAP-LC3 pour former le conjugué MAP-LC3 - PE, qui est alors recruté à la membrane autophagosomale.

Les gènes ATG sont donc impliqués dans la formation de l'autophagosome et l'ATG5-12 est précurseur de la conjugaison MAP-LC3 et phosphatidyl éthanolamine (PE).

Les Map-LC3 sont des protéines de 15kDa présentes chez les mammifères. Elles
5 sont mises en jeu au moment de la formation des membranes des autophagosomes. Il en existe deux formes : une forme cystolique les LC3-I et une forme liée à la membrane LC3-II.

Les Map-LC3 sont dans un premier temps clivées, directement après leur synthèse, au niveau de leur partie C-terminale afin de donner la forme cystolique
10 LC3-I. Au cours de l'autophagie, LC3-I est converti en LC3-II, et les protéines s'associent aux vacuoles autophagiques.

Ainsi, l'utilisation d'un principe actif présentant une activité stimulatrice de l'expression des MAP-LC3 et/ou des ATG5-12 des cellules de la peau, permet de stimuler la formation de l'autophagosome et donc de stimuler l'autophagie des
15 cellules de la peau.

Selon un deuxième aspect, un activateur de l'autophagie des cellules cutanées utile selon l'invention peut être un principe actif inhibant l'activation de mTOR phosphorylée.

Le complexe mTOR (« mammalian Target Of Rapamycine" ou cible de la
20 rapamycine des mammifières) est une molécule intervenant dans l'initiation de la formation de l'autophagosome. Il joue un rôle de senseur de l'ATP et des acides aminés régulant l'équilibre entre la disponibilité des nutriments et la croissance cellulaire.

Lorsque la quantité de nutriments est suffisante, mTOR est phosphorylée sur la
25 sérine 2448 et transmet un signal positif activant la croissance cellulaire et inhibant l'autophagie.

Dans le cas contraire, c'est-à-dire en conditions de privation nutritionnelle ou starvation, cette phosphorylation disparaît au profit d'une phosphorylation de la thréonine 2446, ce qui permet la levée de l'inhibition de l'autophagie.

Le mécanisme de l'autophagie est donc initié lorsqu'il y a déphosphorylation de mTOR sur la sérine 2448.

Ainsi, l'utilisation cosmétique d'un actif inhibiteur de l'activité de mTOR dans les cellules de la peau permet de favoriser l'initiation de l'autophagie, de mobiliser la formation des autophagosomes et donc de stimuler l'autophagie des cellules de la peau.

Selon un dernier aspect, un stimulateur de l'activité autophagique des cellules cutanées utile selon l'invention peut être un principe actif présentant une activité stimulatrice de l'expression de la protéine p53, de l'AMPK et/ou de DRAM.

La protéine p53 est une protéine majeure du stress, capable notamment :

- d'activer la protéine DRAM (« Damage Regulated Autophagy Modulator » modulateur des dommages régulés par autophagie), une protéine directement impliquée dans l'initiation du mécanisme de l'autophagie, et
- d'inhiber mTOR par le biais de l'activation d'une protéine kinase, l'AMPK.

L'activation de DRAM et/ou de l'AMPK, soit directement, soit par le biais de la p53 permet donc de stimuler l'autophagie.

Ainsi, l'utilisation cosmétique d'un principe actif présentant une activité stimulatrice de l'expression de la protéine p53 phosphorylée, de DRAM et/ou de l'AMPK des cellules de la peau, permet de favoriser l'initiation de l'autophagie, de mobiliser la formation des autophagosomes et donc de stimuler l'autophagie des cellules de la peau.

La conséquence cellulaire d'une activation du mécanisme de l'autophagie par un principe actif présentant une activité stimulatrice de l'expression des MAP-LC3, des ATG5-12, de la protéine p53 phosphorylée, de DRAM et/ou de l'AMPK et/ou

présentant une activité inhibitrice de mTOR phosphorylée, est une meilleure détoxification des cellules, c'est-à-dire une diminution des espèces oxygénées réactives et des macromolécules dégénérées bloquées dans les cellules cutanées.

Préférentiellement le stimulateur de l'activité autophagique des cellules cutanées utile selon l'invention est un principe actif issu d'au moins une plante, une algue ou une levure.

De façon préférée, l'activateur de l'autophagie est un principe actif issu d'au moins une algue du genre *Lithothamnium calcareum*, ou d'une plante choisie parmi *Melilotus officinalis*, *Citrus limonum*, *Lens culinaris*, *Averrhoa carambola*, *Momordica charantia* ou d'une levure choisie parmi *Candida saitoana* et *Yarrowia lipolytica*.

Selon un aspect de l'invention, l'activateur de l'autophagie des cellules cutanées est susceptible d'être sélectionné par un test réalisé sur des cultures de cellules cutanées comprenant les étapes suivantes :

- 15 - culture de cellules cutanées, kératinocytes ou fibroblastes, dans un milieu de culture adapté,
- retrait du milieu de culture et remplacement par un milieu de culture comprenant un agent stressant induisant un stress nutritif et/ou oxydatif,
- 20 - ajout d'un principe actif issu de plante, d'algue ou de levure à tester dans le milieu de culture,
- retrait de l'agent oxydant et remplacement du milieu de culture par un milieu de culture comprenant le principe actif, et
- analyse de l'expression de MAP-LC3, d'ATG5-12, de mTOR phosphorylée, de la protéine p53 phosphorylée, de l'expression de la protéine DRAM et/ou de l'AMPK par lesdites cellules, et comparaison des résultats avec
- 25 ceux obtenus sur des cultures de cellules cutanées non traitées avec l'extrait à tester.

Si on constate une augmentation de l'expression de MAP-LC3, d'ATG5-12, de la protéine p53 phosphorylée, de la protéine DRAM et/ou de l'AMPK, et/ou une diminution de mTOR phosphorylée, alors le principe actif testé peut être utilisé dans une composition cosmétique en tant qu'activateur de l'autophagie des cellules de la peau.

Pour illustrer l'invention, plusieurs principe actifs ont été testés pour étudier leur capacité à augmenter l'autophagie des cellules cutanées.

Tout d'abord il a été vérifié que l'induction d'un stress au niveau des cellules de la peau entraînait bien une augmentation de l'autophagie.

Il a ensuite été comparé le niveau d'autophagie de cellules jeunes et âgées soumises aux mêmes stress oxydatifs et nutritifs.

Enfin des principes actifs ont été sélectionnés par la mise en œuvre du procédé test selon l'invention.

1/ Visualisation de l'autophagie des cellules cutanées après un stress nutritif

Le protocole réalisé consiste à soumettre des cultures de kératinocytes type HaCaT ou kératinocytes humains normaux à un stress nutritif, c'est-à-dire à une absence de facteurs de croissance, pendant un certain temps et à évaluer l'expression de plusieurs marqueurs de l'autophagie au cours de la récupération cellulaire.

Le protocole est le suivant :

- cultures de cellules de la peau pendant 24 heures en milieu de culture complet (avec facteurs de croissance)
- retrait du milieu de culture complet et remplacement par un milieu de culture non nutritif (sans facteur de croissance). Les cellules sont cultivées pendant plusieurs temps (de 0,5h à 24h) en état de stress nutritif,

- après ces temps de cultures en état de stress nutritif, retrait du milieu de culture non nutritif et remplacement par du milieu de culture complet, et enfin
- évaluation de l'état d'autophagie des cellules cutanées par évaluation de l'expression de MAP-LC3, du complexe ATG5-12, de mTOR phosphorylée, de p53 phosphorylée, de DRAM et de AMPK phosphorylée après récupération cellulaire.

1.1/ Evaluation de l'expression de MAP-LC3 après un stress nutritif

- 10 Il est possible d'évaluer l'autophagie des cellules cutanées en visualisant l'expression de la protéine MAP-LC3 par marquage immunofluorescent.

L'expression de MAP-LC3 a été évaluée sur des cultures de cellules cutanées de lignées HaCaT et sur des kératinocytes humains normaux après différents temps de contact du stress nutritif. Les résultats d'immunomarquage étant qualitatif, il

- 15 a été défini plusieurs niveaux d'expression des MAP-LC3 :

- très faible détection d'immunoréactivité -
- faible détection d'immunoréactivité ±
- moyenne détection d'immunoréactivité +
- forte détection d'immunoréactivité ++

- 20 Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Temps de culture en état de stress nutritif (heures)	Expression MAP-LC3
0	-
0,5	-
1	-
2	+
3	+
4	++
8	+
24	-

Lors de la culture des kératinocytes HaCaT en état de stress nutritif, on observe l'apparition nette d'un marquage ponctiforme MAP-LC3 au niveau du cytoplasme des cellules. Ce marquage traduit la formation d'autophagosomes dans les kératinocytes soumis au stress nutritif.

- 5 Ce marquage est observable dès 2 heures de starvation et atteint un maximum après 4 heures de starvation.

Ces conditions de stress nutritif permettent donc d'induire la formation d'autophagosomes et par conséquent une autophagie, visualisée par l'expression de MAP-LC3.

10

1.2/ Evaluation de l'expression du complexe ATG5-12 après un stress nutritif

Il est aussi possible d'évaluer l'autophagie des cellules cutanées en visualisant l'expression du complexe ATG5-12 par marquage immunofluorescence.

- 15 L'évaluation de l'expression du complexe ATG5-12 a été réalisée sur des cultures de cellules cutanées de lignées HaCaT et sur des kératinocytes humains normaux après différents temps de culture en état de stress nutritif. Les résultats d'immunomarquage étant qualitatif, il a été défini plusieurs niveaux d'expression des ATG5-12 :

20	- très faible détection d'immunoréactivité	-
	- faible détection d'immunoréactivité	±
	- moyenne détection d'immunoréactivité	+
	- forte détection d'immunoréactivité	++
	- très forte détection d'immunoréactivité	+++

- 25 Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Temps de culture en état de stress nutritif (heures)	Expression ATG5-12
0	±
1	++
2	++
3	++
4	+

Lors de la culture des kératinocytes HaCaT en état de stress nutritif, on observe l'apparition nette d'un marquage ponctiforme ATG5-12 au niveau du cytoplasme des cellules. Ce marquage traduit la formation d'autophagosomes dans les kératinocytes soumis à un stress nutritif.

Ce marquage est observable dès 1 heure et jusqu'à 3 heures de starvation.

Les conditions de stress nutritif permettent donc d'induire un phénomène de type autophagique, visualisé par l'expression ATG5-12.

10

1.3/ Evaluation de l'expression de mTOR phosphorylée après un stress nutritif

Il est aussi possible d'évaluer l'autophagie des cellules cutanées en visualisant l'expression de mTOR phosphorylée par Western Blott.

15 L'évaluation de l'expression de mTOR phosphorylée a été évaluée sur des cultures de cellules cutanées de lignées HaCaT et sur des kératinocytes humains normaux après différents temps de culture en état de stress nutritif. L'expression de mTOR phosphorylée est présentée dans le tableau ci-après en pourcentage par rapport au témoin (sans stress nutritif).

Temps de culture en état de stress nutritif (heures)	Expression mTOR phosphorylée (%)
0	100
2	118
4	122
8	78
12	64
24	58

Cette expérience a montré une nette diminution de la protéine mTOR phosphorylée visible dès 8 heures de privation, dans des cultures de cellules cutanées soumises à une starvation.

Lorsque la protéine mTOR phosphorylée diminue, il y a levée de l'inhibition de l'autophagie.

Les conditions de stress nutritif permettent donc d'induire l'autophagie sur des cultures de cellules cutanées, visualisée par la diminution de l'expression de mTOR phosphorylée.

1.4/ Evaluation de l'expression de p53 phosphorylée après un stress nutritif

Il est aussi possible d'évaluer l'autophagie des cellules cutanées en visualisant l'expression de la protéine p53 phosphorylée par Western Blott.

L'évaluation de l'expression de la protéine p53 phosphorylée a été évaluée sur des cultures de cellules cutanées de lignées HaCaT et sur des kératinocytes humains normaux après différents temps de culture en état de stress nutritif. L'expression de p53 phosphorylée est présentée dans le tableau ci-après en pourcentage par rapport au témoin (sans stress nutritif).

Temps de culture en état de stress nutritif (heures)	Expression p53 phosphorylée (%)
0	100
0,5	140
1	170
1,5	168
2	161

Cette expérience a montré une nette augmentation de l'expression de la protéine p53 phosphorylée visible dès 1 heure, dans des cultures de cellules soumises à une starvation.

- 5 Les conditions de stress nutritif permettent donc d'induire un phénomène de type autophagique sur des cultures de cellules cutanées, visualisé par l'augmentation de l'expression de la protéine p53 phosphorylée.

1.5/ Evaluation de l'expression de la protéine DRAM après un stress nutritif

10

Il est aussi possible d'évaluer l'autophagie des cellules cutanées en visualisant l'expression de la protéine DRAM, par Western Blott, sur des cultures de cellules cutanées de lignées HaCaT et sur des kératinocytes humains normaux après différents temps de culture en état de stress nutritif. L'expression de

- 15 DRAM est présentée dans le tableau ci-après en pourcentage par rapport au témoin (sans stress nutritif).

Temps de culture en état de stress nutritif (heures)	Expression de la protéine DRAM (%)
0	100
0,5	260
1	220
1,5	330
2	95

Cette expérience a montré une nette augmentation de l'expression de la protéine DRAM après 0,5 heure de culture en état de stress nutritif. L'expression de la protéine DRAM devient maximale après 1,5 heure de culture en état de stress nutritif. Ceci coïncide avec la cinétique d'expression de la protéine p53 qui atteint son maximum après une heure de stress nutritif.

Les conditions de stress nutritif permettent donc d'induire un phénomène de type autophagique sur des cultures de cellules cutanées, visualisé par l'augmentation de l'expression de la protéine DRAM.

1.6/ Evaluation de l'expression de la protéine AMPK phosphorylée après un stress nutritif

Il est aussi possible d'évaluer l'autophagie des cellules cutanées en visualisant l'expression de la protéine AMPK phosphorylée, par Western Blott, sur des cultures de cellules cutanées de lignées HaCaT et sur des kératinocytes humains normaux après différents temps de culture en état de stress nutritif. L'expression de DRAM est présentée dans le tableau ci-après en pourcentage par rapport au témoin (sans stress nutritif).

Temps de culture en état de stress nutritif (heures)	Expression AMPK phosphorylée (%)
0	98
0,5	155
1	170
1,5	172
2	130

Cette expérience a montré que l'expression de AMPK phosphorylée est augmentée dès 0,5 heure de culture en état de stress nutritif et est maximale à 1,5 heure. Ceci coïncide avec la cinétique d'expression de la protéine p53 qui atteint son maximum après une heure de stress nutritif.

Les conditions de stress nutritif permettent donc d'induire un phénomène de type autophagique sur des cultures de cellules cutanées, visualisé par l'augmentation de l'expression de la protéine AMPK phosphorylée.

Ces études ont donc permis de montrer que le mécanisme d'autophagie peut être indifféremment visualisé sur des cultures de cellules cutanées stressées par l'évaluation de l'expression de différentes protéines comme MAP-LC3, le complexe ATG5-12, de mTOR phosphorylée, la protéine p53 phosphorylée, la protéine DRAM ou la protéine AMPK phosphorylée.

10 2/ Visualisation de l'autophagie des cellules cutanées après un stress nutritif et oxydatif

La visualisation de l'autophagie est possible, comme dans le cas du stress nutritif, par l'évaluation de différentes protéines telles que MAP-LC3, le complexe ATG5-12, la protéine mTOR phosphorylée, la protéine p53 phosphorylée, la protéine DRAM ou la protéine AMPK phosphorylée. Dans cette expérience, l'expression de l'autophagie des cellules cutanées a été étudiée en analysant l'expression de MAP-LC3, de la protéine p53 phosphorylée et de la protéine DRAM dans les cultures de cellules cutanées stressées.

Le protocole opératoire est le suivant :

- 20 - cultures de cellules pendant 24 heures en milieu de culture complet
- retrait du milieu de culture et remplacement avec du milieu de culture non nutritif contenant l'agent oxydant H_2O_2 pendant 3h (différentes doses de H_2O_2 - 125 μ M et/ou 250 μ M - ont été testées).
- retrait de l'agent oxydant et du milieu de culture non nutritif, remplacement par du milieu de culture complet sans oxydant.
- 25 - Evaluation de l'expression de MAP-LC3, de la protéine p53 phosphorylée ou de la protéine DRAM après récupération cellulaire. Plusieurs temps de

récupération ont été choisis (0,5 heure, 1 heure, 1,5 heure ou 2 heures de récupération).

2.1/ Evaluation de l'expression MAP-LC3 après un stress nutritif et oxydatif

Il est possible d'évaluer l'autophagie des cellules cutanées stressées en visualisant l'expression de la protéine MAP-LC3, par marquage immunofluorescent.

L'évaluation de l'expression MAP-LC3 a été analysée dans ces conditions de stress modéré (125 μ M et 250 μ M de peroxyde d'hydrogène H₂O₂) sur des cultures de kératinocytes HaCaT et sur des kératinocytes humains normaux. Les résultats d'immunomarquage étant qualitatifs, il a été défini plusieurs niveaux d'expression des ATG5-12 :

- très faible détection d'immunoréactivité -
- faible détection d'immunoréactivité $\pm$
- moyenne détection d'immunoréactivité +
- forte détection d'immunoréactivité ++
- très forte détection d'immunoréactivité +++

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

	Temps de récupération (heures)	Expression MAP-LC3
Sans stress	2	+
H ₂ O ₂ 125 μ M	0,5	++
	1	++
	1,5	+++
	2	++
H ₂ O ₂ 250 μ M	0,5	++
	1	+++
	1,5	++
	2	+

Pour la dose 125 μ M de stress oxydatif, on observe le marquage ponctiforme de MAP-LC3 au niveau du cytoplasme des cellules dès 0,5 heure de récupération qui devient maximum après 1,5 heure, puis s'atténue à partir de 2 heures de récupération.

- 5 Pour la dose de 250 μ M, on constate que ce marquage apparaît dès 0,5 heure, atteint un maximum à 1 heure et s'affaiblit dès 1,5 heure de récupération.

Les conditions de stress nutritif et oxydatif permettent donc d'induire un phénomène de type autophagique, visualisé par l'augmentation de l'expression de MAP-LC3 dans les cellules cutanées.

10

2.3/ Evaluation de l'expression de la protéine p53 phosphorylée après stress nutritif et oxydatif

Il est aussi possible d'évaluer l'autophagie des cellules cutanées stressées en visualisant l'expression de la protéine p53 phosphorylée par Western Blott.

- 15 L'évaluation de l'expression de la protéine p53 phosphorylée a donc été analysée dans ces conditions de stress modéré avec 125 μ M de H₂O₂, sur des cultures de kératinocytes HaCaT et sur des kératinocytes humains normaux. L'expression de p53 phosphorylée est présentée dans le tableau suivant en pourcentage par rapport au témoin (sans stress).

20

	Temps de récupération (heures)	Expression p53 phosphorylée (%)
Sans stress	2	100
H ₂ O ₂ 125 μ M	0,5	221
	1	140
	2	128

25

Pour la dose 125 μ M de stress nutritif et oxydatif, on observe que le marquage de la protéine p53 phosphorylée est à son maximum après 0,5 heure de récupération, puis s'atténue progressivement.

Les conditions de stress oxydatif permettent donc d'induire un phénomène de type autophagique, visualisé par l'augmentation de l'expression de la protéine p53 phosphorylée.

5 2.4/ Evaluation de l'expression de la protéine DRAM après stress nutritif et oxydatif

Il est aussi possible d'évaluer l'autophagie des cellules cutanées stressées en visualisant l'expression de la protéine DRAM par Western Blott.

10 L'évaluation de l'expression de DRAM a donc été analysée dans ces conditions de stress modéré avec 125 μM de H_2O_2 , sur des cultures de kératinocytes HaCaT et sur des kératinocytes humains normaux. L'expression de DRAM est présentée dans le tableau suivant en pourcentage par rapport au témoin (sans stress).

	Temps de récupération (heures)	Expression DRAM (%)
Sans stress	2	100
H_2O_2 125 μM	0,5	120
	1	180
	1,5	390
	2	200

15 On constate qu'un stress nutritif et oxydatif sur les cultures de cellules cutanées augmentent l'expression de la protéine DRAM.

Pour la dose 125 μM de stress oxydatif, on observe que le marquage de la protéine DRAM est à son maximum après 1,5 heure de récupération, puis s'atténue à partir de 2 heures.

20 Les conditions de stress nutritif et oxydatif permettent donc d'induire un phénomène de type autophagique.

Ces études ont donc permis de montrer que le mécanisme d'autophagie peut être visualisé sur des cultures de cellules cutanées stressées par l'évaluation de

l'expression de différentes protéines comme MAP-LC3, la protéine p53 phosphorylée ou la protéine DRAM.

3/ Comparaison de l'autophagie dans des cellules jeunes ou âgées

- 5 Cette étude a pour objectif de comparer le niveau d'autophagie de cellules jeunes (de donneurs d'âge moyen 26 ans) et âgées (de donneurs d'âge moyen 70 ans) soumises aux mêmes stress oxydatifs et nutritifs.

L'évaluation du niveau d'autophagie a été envisagée par l'analyse de l'expression de la protéine MAP-LC3 par Western Blott.

- 10 Le protocole mis en place est le suivant :

- cultures de cellules dites jeunes ou âgées pendant 24 heures en milieu de culture complet.
- retrait du milieu de culture complet, remplacement avec du milieu de culture non nutritif contenant l'agent oxydant H_2O_2 pendant 3h à
- 15 différentes doses
- retrait de l'agent oxydant, remplacement par du milieu de culture complet sans oxydant,
- Evaluation de l'expression de MAP-LC3 après récupération cellulaire.

Les résultats sont décrits dans le tableau ci-dessous en pourcentage par rapport

- 20 au témoin (sans stress).

	Expression MAP-LC3	
	sur cellules jeunes	sur cellules âgées
Sans stress	100	100
H_2O_2 125 μ M	172	138
H_2O_2 250 μ M	322	187
H_2O_2 400 μ M	168	135
H_2O_2 600 μ M	143	96
H_2O_2 1000 μ M	117	92

Dans les conditions de cette étude, les cellules cutanées dites jeunes montrent une augmentation de l'expression MAP-LC3 lorsqu'elles sont soumises à un stress oxydatif modéré (125, 250, voir 400 μ M). Lorsqu'elles sont soumis à un stress oxydatif important (600 et 1000 μ M), elles se placent en apoptose.

- 5 Les cellules cutanées dites âgées ne présentent pas la même augmentation de l'expression MAP-LC3 lorsqu'elles sont soumises au même stress oxydatif modéré.

Cette différence de mise en autophagie des cellules âgées par rapport aux cellules jeunes est significative.

- 10 Cette étude montre donc que des cellules âgées ne sont plus capables de se protéger et de se détoxifier lors d'un stress nutritif et oxydatif modéré.

4/ Criblage de principes actifs augmentant l'autophagie des cellules cutanées

- 15 Le criblage est réalisé selon le protocole de stress nutritif et oxydatif présenté en point 2.1, à partir de principes actifs issus de végétaux, d'algues ou de levures. L'évaluation de l'effet de principes actifs sur l'autophagie des cellules cutanées a été effectuée en analysant l'expression de la protéine MAP-LC3 dans des cultures de cellules cutanées soumises à un stress nutritif et oxydatif.

Le protocole de test est le suivant :

- 20 - cultures de cellules pendant 24 heures en milieu de culture complet,
- retrait du milieu de culture complet, remplacement avec du milieu de culture non nutritif contenant l'agent oxydant H₂O₂ pendant 3h en présence ou non des principes actifs,
- retrait de l'agent oxydant et du milieu de culture non nutritif,
25 remplacement par du milieu de culture complet en présence ou non des principes actifs,

- Evaluation de l'expression de MAP-LC3 après récupération cellulaire par marquage immunofluorescent.

Les principes actifs testés ont été produits selon le protocole suivant :

- solubilisation de poudre de plante, algue ou levures dans l'eau à raison de 50g/l (m/v),
- hydrolyse enzymatique,
- séparation des phases soluble et insoluble,
- filtration et filtration stérilisante.

Les principaux principes actifs sont :

Principe actif	Plantes ou levures utilisées
Principe actif issu de Lithothamnium	Lithothamnium calcareum
Principe actif issu de Mélilot	Melilotus officinalis
Principe actif issu de Citron	Citrus limonum
Principe actif issu de Candida saitoana	Candida saitoana
Principe actif issu de lentilles	Lens culinaris
Principe actif issu de Ortie piquante	Urtica dioica
Principe actif issu de carambole	Averrhoa carambola
Principe actif issu de momordica	Momordica charantia
Principe actif issu de Yarrowia lipolytica	Yarrowia lipolytica

10

Les résultats des principes actifs les plus efficaces sélectionnés et testés en triplicate sont décrits dans le tableau suivant :

	Expression de MAP-LC3
Sans principe actif	±
Principe actif issu de Lithothamnium	+++
Principe actif issu de Mélilot	++
Principe actif issu de Citron	++
Principe actif issu de Candida saitoana	++
Principe actif issu de lentilles	+
Principe actif issu de Ortie piquante	+
Principe actif issu de carambole	+
Principe actif issu de momordica	+
Principe actif issu de Yarrowia lipolytica	+

Ces principes actifs permettent donc d'augmenter l'autophagie des cellules cutanées soumises à un stress nutritif et oxydatif modéré, et ainsi détoxifier la peau et prévenir ou lutter contre le vieillissement cutané.

Ces principes actifs peuvent être incorporés dans des compositions cosmétiques.

5

5. Exemples de compositions cosmétiques contenant un principe actif agissant sur l'autophagie des cellules cutanées

L'invention couvre aussi les compositions cosmétiques incluant au moins un principe actif agissant sur l'autophagie des cellules cutanées dans différentes formes galéniques, adaptées à l'administration par voie topique cutanée.

10

Ces compositions peuvent se présenter notamment sous forme de crèmes, émulsions huile-dans-eau, émulsions eau-dans-huile, émulsions multiples, solutions, suspensions 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.

15

Ces compositions contiennent entre 0,01 et 15% en poids de principe(s) actif(s) agissant sur l'autophagie des cellules cutanées selon la présente invention, préférentiellement entre 1% et 4%.

5.1. Crème experte

Un exemple de crème comprenant un principe actif extrait de citron tel que présenté au point 4., peut avoir la composition suivante :

	A.	Eau	QSP 100%
5		Glycerol (Univar)	3.33%
		EDTA	0.13 %
		Satialgine (Degussa)	0.66 %
		Talc (Luzenac)	1%
	B.	Miglyol 812 (Condea Chemie)	3.33 %
10		Ritaphyl ICS (Rita)	1.33 %
		Ritachol SS (Rita)	1.33 %
		Ipm (Univar)	3.33 %
		Ritalan C (Rita)	1.33 %
		Montanov 14 (Seppic)	1.33 %
15		Lanol 14M (Seppic)	1.33 %
		Brij 72 (Uniquema)	1 %
		Brij 721 (Uniquema)	0.33 %
	C.	Phénoxyéthanol (Sigma)	0,9%
		Ethylhexylglycérine (Seppic)	0,1%
20	D .	Principe actif issu de Citron selon l'invention	4%

La crème est obtenue par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- chauffer A et B à 80°C, sous agitation mécanique,
- émulsionner B dans A sous agitation,
- à 30°C additionner C dans l'ordre, et
- 25 - continuer l'homogénéisation jusqu'à ce que la crème soit uniforme.

5.2. Crème anti-rides

Un exemple de crème comprenant un principe actif extrait de Lithothamnium tel que présenté au point 4., peut avoir la composition suivante :

	A.	Eau	QSP 100%
5		Butylène glycol (Univar)	3%
	B.	Isohexadecane (Laserson)	5%
		Rita IPP (Rita)	2%
		Montanov 202 (Seppic)	3%
		Arlacel 161 (Uniquema)	1%
10		Ritox 59 (Rita)	1%
		Lanette O (Cognis)	1%
	C.	Phénoxyéthanol (Sigma)	0,9%
		Ethylhexylglycérine (Seppic)	0,1%
		DC 200 (Dow Corning)	0.5%
15		Principe actif issu de Lithothamnium selon l'invention	4%
	D.	Sepigel 305 (Seppic)	4%

La crème est obtenue par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- mélanger A, mélanger B et chauffer A et B à 80°C, sous agitation mécanique,
- 20 - émulsionner B dans A sous agitation,
- à 30°C additionner C dans l'ordre, et
- continuer l'homogénéisation jusqu'à ce que la crème soit uniforme.

5.3. Crème de Nuit

- 25 Un exemple de crème comprenant un principe actif extrait de Melilothus tel que présenté au point 4., peut avoir la composition suivante :

	A.	Eau	QSP 100%
		Carbopol ETD 2020 (Noveon)	0.4%
5	B.	alcool cethylique (Stéarinerie Dubois)	3%
		Alcool stearylique (Stéarinerie Dubois)	3%
		DUB MCT 5545 (Stéarinerie Dubois)	4.5%
		DC 345 (Dow Corning)	7.5%
		Monomuls 900 18 (Henkel)	3%
	C.	Phénoxyéthanol (Sigma)	0,9%
		Ethylhexylglycérine (Seppic)	0,1%
10		Principe actif issu Melilotus selon l'invention	4%
	D.	NaOH	qsp pH 4.5

La crème est obtenue par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- mélanger A, bien disperser le gel et mélanger B,
- chauffer A et B à 80°C,
- 15 - émulsionner B dans A sous agitation,
- à 40°C additionner C dans l'ordre,
- continuer l'homogénéisation jusqu'à ce que la crème soit uniforme,
- ajuster le pH avec D, et
- laisser refroidir sous agitation jusqu'à 30°C.

20 5.4. Crème peaux matures

Un exemple de crème comprenant un principe actif extrait de *Candida saitoana* tel que présenté au point 4., peut avoir la composition suivante :

25	A.	Eau	QSP 100%
		Glycerol (Univar)	1.75%
		Propylene glycol (Univar)	6.5%
		Aculyne 33A (ISP)	2.5%
		Carbopol EDT 2020 (Goodrich)	0.5 %

	B.	Cetiol SN (Cognis)	3%
		Eumulgin B1 (Cognis)	1.75%
		Ritaphyl ICS (Rita)	3%
		Patlac IL (Rita)	3%
5		Isopropyl myristate (Univar)	3%
		Montane 80 (Seppic)	1.5%
		Montanox 60 (Seppic)	1.5%
		DC 345 (Dow Corning)	3%
	C.	Phénoxyéthanol (Sigma)	0,9%
10		Ethylhexylglycérine (Seppic)	0,1%
	D.	Principe actif issu de <i>Candida saitoana</i>	4%
		NaOH	QSP pH 5.5

La crème est obtenue par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- mélanger A, mélanger B, et chauffer A et B à 80°C,
- 15 - émulsionner B dans A sous agitation,
- à 30°C additionner C et D,
- ajuster à pH 5.5 avec NaOH, et
- continuer l'homogénéisation jusqu'à ce que la crème soit uniforme.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation dans une composition cosmétique d'une quantité efficace d'au moins un activateur de l'autophagie des cellules cutanées comme principe actif cosmétique.

2. Utilisation cosmétique selon la revendication 1, comme principe actif
5 cosmétique destiné à détoxifier la peau et/ou destiné à prévenir ou lutter contre le vieillissement cutané.

3. Utilisation cosmétique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit activateur de l'autophagie des cellules cutanées est un principe actif présentant une activité stimulatrice de l'expression des MAP-LC3.

10 4. Utilisation cosmétique selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que ledit activateur de l'autophagie des cellules cutanées est un principe actif présentant une activité stimulatrice de l'expression des ATG5-12 des cellules de la peau.

15 5. Utilisation cosmétique selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que ledit activateur de l'autophagie des cellules cutanées est un principe actif présentant une activité stimulatrice de l'expression de la protéine p53 phosphorylée.

20 6. Utilisation cosmétique selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que ledit activateur de l'autophagie des cellules cutanées est un principe actif présentant une activité stimulatrice de l'expression de DRAM.

7. Utilisation cosmétique selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que ledit activateur de l'autophagie des cellules cutanées est un principe actif présentant une activité stimulatrice de l'expression de l'AMPK.

8. Utilisation cosmétique selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que ledit activateur de l'autophagie des cellules cutanées est un principe actif inhibiteur de l'activation de mTOR phosphorylée.

5 9. Utilisation cosmétique selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que ledit activateur de l'autophagie agit sur l'activité autophagique des kératinocytes et/ou des fibroblastes.

10 10. Utilisation cosmétique selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que ledit activateur de l'autophagie des cellules cutanées est un principe actif issu d'au moins une plante, une algue ou une levure.

11. Utilisation cosmétique selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que ledit activateur de l'autophagie des cellules cutanées est un principe actif issu d'au moins une algue du genre *Lithothamnium calcareum*, ou d'une plante choisie parmi *Melilotus officinalis*, *Citrus limonum*, *Lens culinaris*, *Averrhoa carambola*, *Momordica charantia* ou d'une levure choisie parmi *Candida saitoana* et *Yarrowia lipolytica*.

12. Composition cosmétique pour application topique sur la peau comprenant dans un milieu physiologiquement acceptable, une quantité efficace d'au moins un activateur de l'autophagie des cellules cutanées choisi parmi des principes actifs issus de *Lithothamnium calcareum*, *Melilotus officinalis*, *Citrus limonum*, *Candida saitoana*, *Lens culinaris*, *Averrhoa carambola*, *Momordica charantia*, *Yarrowia lipolytica* et au moins un adjuvant cosmétique.

13. Composition cosmétique selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit activateur de l'autophagie des cellules cutanées est présent en une quantité comprise entre 0,1 et 15% en poids par rapport au poids total de la composition.

14. Procédé cosmétique pour détoxifier la peau et/ou pour prévenir et/ou lutter contre le vieillissement cutané, comprenant l'application topique sur la

peau d'une composition comprenant au moins activateur de l'autophagie des cellules de la peau.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2009/052410

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K8/97 A61K8/99 A61Q19/08 A61K36/04 A61K36/48
A61K36/752 A61K36/42 A61K36/185 A61K36/062 A61P17/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/119227 A (THE GILLETTE COMPANY ET AL.) 25 October 2007 (2007-10-25) page 13, paragraph 2 page 14, paragraph 3 claim 1; example 1	1-14
X	FR 2 674 126 A (SOCIETE D'ENGRAIS COMPOSES MINERAUX ET AMENDEMENTS S.E.C.M.A) 25 September 1992 (1992-09-25) page 1, line 30 - line 33 page 2, line 5 - line 12 page 3, line 15 - line 22 claims 5-7	1-14
	----- -/--	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2010

Date of mailing of the international search report

26/04/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alvarez Alvarez, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/052410

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Week 199610 Thomson Scientific, London, GB; AN 1996-087929 XP002541208 & BR 9 402 197 A (BAILLY F. E.) 9 January 1996 (1996-01-09) abstract	1-14
X	US 2005/058672 A1 (GUPTA) 17 March 2005 (2005-03-17) claims 1,8	1-14
X	US 2005/048008 A1 (GUPTA) 3 March 2005 (2005-03-03) paragraphs [0013], [0051] claim 10	1-14
X	DATABASE WPI Week 199134 Thomson Scientific, London, GB; AN 1991-248668 XP002541209 & JP 03 161412 A (KANEBO LTD.) 11 July 1991 (1991-07-11) abstract	1-14
X	DATABASE WPI Week 200572 Thomson Scientific, London, GB; AN 2005-695495 XP002541210 & JP 2005 281205 A (NARISU KESHOHIN KK) 13 October 2005 (2005-10-13) abstract	1-14
X	FR 2 815 852 A (LABORATOIRES SEPORGA S.A.) 3 May 2002 (2002-05-03) page 5, line 26 - page 6, line 23 page 7, line 2 - line 5	1-14
X	EP 1 992 322 A (DR. SCHELLER COSMETICS AG) 19 November 2008 (2008-11-19) paragraph [0036] - paragraph [0038] claims 1,9,11	1-14
X	DATABASE WPI Week 200609 Thomson Scientific, London, GB; AN 2006-083003 XP002541211 & JP 2006 008571 A (MARUZEN SEIYAKU KK) 12 January 2006 (2006-01-12) abstract	1-14
X	US 2005/191267 A1 (OMBOON LUANRATANA) 1 September 2005 (2005-09-01) claims 1,7,11,14,15	1-14
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/052410

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Week 200330 Thomson Scientific, London, GB; AN 2003-303834 XP002541212 & JP 2002 226323 A (MARUZEN SEIYAKU KK) 14 August 2002 (2002-08-14) abstract	1-14
X	DATABASE WPI Week 200868 Thomson Scientific, London, GB; AN 2008-L60763 XP002541213 & JP 2008 184440 A (SONY CP LAB KK) 14 August 2008 (2008-08-14) abstract	1-14
X	DATABASE WPI Week 199838 Thomson Scientific, London, GB; AN 1998-440184 XP002541214 & HU 9 700 451 A (BINDICS F.) 28 May 1998 (1998-05-28) abstract	1-14
X	DATABASE WPI Week 200403 Thomson Scientific, London, GB; AN 2004-028788 XP002541215 & JP 2003 342119 A (EIKODO HONTEN KK) 3 December 2003 (2003-12-03) abstract	1-14
X	DATABASE WPI Week 199411 Thomson Scientific, London, GB; AN 1994-089259 XP002541216 & JP 06 040882 A (FUJISAWA PHARM CO. LTD.) 15 February 1994 (1994-02-15) abstract	1-14
X	DATABASE WPI Week 200868 Thomson Scientific, London, GB; AN 2008-L60762 XP002541217 & JP 2008 184439 A (SONY CP LAB KK) 14 August 2008 (2008-08-14) abstract	1-14
X	DATABASE WPI Week 200281 Thomson Scientific, London, GB; AN 2002-744220 XP002541218 & JP 2002 212050 A (EIKODO HONTEN KK) 31 July 2002 (2002-07-31) abstract	1-14
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/052410

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 343 330 A (MILES INC.) 29 November 1989 (1989-11-29) page 2 - page 3	1-14
A	US 5 591 429 A (WILSON ET AL.) 7 January 1997 (1997-01-07) column 2, line 1 - line 16	1-14
A	DATABASE WPI Week 200755 Thomson Scientific, London, GB; AN 2007-564235 XP002541219 & JP 2007 143452 A (NIPPON APRICOT KK) 14 June 2007 (2007-06-14) abstract	1-14
A	CODOGNO ET AL.: "Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death" CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, vol. 12, 2005, pages 1509-1518, XP002541242 page 1509, column 2, last paragraph page 1510, column 2, paragraph 2 page 1511, column 2, paragraph 3 page 1512; figure 1	1-14
A	DONATI: "The involvement of macroautophagy in aging and anti-aging interventions" MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE, vol. 27, 2006, pages 455-470, XP005681057 page 462 - page 465	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2009/052410

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007119227 A	25-10-2007	US 2007248563 A1	25-10-2007
FR 2674126 A	25-09-1992	NONE	
BR 9402197 A	09-01-1996	NONE	
US 2005058672 A1	17-03-2005	NONE	
US 2005048008 A1	03-03-2005	NONE	
JP 3161412 A	11-07-1991	NONE	
JP 2005281205 A	13-10-2005	NONE	
FR 2815852 A	03-05-2002	NONE	
EP 1992322 A	19-11-2008	NONE	
JP 2006008571 A	12-01-2006	NONE	
US 2005191267 A1	01-09-2005	AU 2005200460 A1 CA 2495839 A1 JP 2005239715 A	18-08-2005 04-08-2005 08-09-2005
JP 2002226323 A	14-08-2002	NONE	
JP 2008184440 A	14-08-2008	NONE	
HU 9700451 A	28-05-1998	NONE	
JP 2003342119 A	03-12-2003	NONE	
JP 6040882 A	15-02-1994	NONE	
JP 2008184439 A	14-08-2008	NONE	
JP 2002212050 A	31-07-2002	NONE	
EP 0343330 A	29-11-1989	JP 1277495 A US 4877728 A	07-11-1989 31-10-1989
US 5591429 A	07-01-1997	AT 206010 T AU 681179 B2 AU 7407094 A BR 9407025 A CA 2167802 A1	15-10-2001 21-08-1997 20-02-1995 10-09-1996 02-02-1995
US 5591429 A		DE 69428448 D1 DE 69428448 T2 EP 0712279 A1 JP 2863008 B2 JP 8511433 T NZ 269717 A WO 9502964 A1	31-10-2001 13-06-2002 22-05-1996 03-03-1999 03-12-1996 24-11-1997 02-02-1995
JP 2007143452 A	14-06-2007	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/052410

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. A61K8/97 A61K8/99 A61Q19/08 A61K36/04 A61K36/48
 A61K36/752 A61K36/42 A61K36/185 A61K36/062 A61P17/00
 ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

A61K A61Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2007/119227 A (THE GILLETTE COMPANY ET AL.) 25 octobre 2007 (2007-10-25) page 13, alinéa 2 page 14, alinéa 3 revendication 1; exemple 1	1-14
X	FR 2 674 126 A (SOCIETE D'ENGRAIS COMPOSES MINERAUX ET AMENDEMENTS S.E.C.M.A) 25 septembre 1992 (1992-09-25) page 1, ligne 30 - ligne 33 page 2, ligne 5 - ligne 12 page 3, ligne 15 - ligne 22 revendications 5-7	1-14
	----- -/-	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 avril 2010

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/04/2010

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Alvarez Alvarez, C

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE WPI Week 199610 Thomson Scientific, London, GB; AN 1996-087929 XP002541208 & BR 9 402 197 A (BAILLY F. E.) 9 janvier 1996 (1996-01-09) abrégé	1-14
X	US 2005/058672 A1 (GUPTA) 17 mars 2005 (2005-03-17) revendications 1,8	1-14
X	US 2005/048008 A1 (GUPTA) 3 mars 2005 (2005-03-03) alinéas [0013], [0051] revendication 10	1-14
X	DATABASE WPI Week 199134 Thomson Scientific, London, GB; AN 1991-248668 XP002541209 & JP 03 161412 A (KANEBO LTD.) 11 juillet 1991 (1991-07-11) abrégé	1-14
X	DATABASE WPI Week 200572 Thomson Scientific, London, GB; AN 2005-695495 XP002541210 & JP 2005 281205 A (NARISU KESHOHIN KK) 13 octobre 2005 (2005-10-13) abrégé	1-14
X	FR 2 815 852 A (LABORATOIRES SEPORGA S.A.) 3 mai 2002 (2002-05-03) page 5, ligne 26 - page 6, ligne 23 page 7, ligne 2 - ligne 5	1-14
X	EP 1 992 322 A (DR. SCHELLER COSMETICS AG) 19 novembre 2008 (2008-11-19) alinéa [0036] - alinéa [0038] revendications 1,9,11	1-14
X	DATABASE WPI Week 200609 Thomson Scientific, London, GB; AN 2006-083003 XP002541211 & JP 2006 008571 A (MARUZEN SEIYAKU KK) 12 janvier 2006 (2006-01-12) abrégé	1-14
X	US 2005/191267 A1 (OMBOON LUANRATANA) 1 septembre 2005 (2005-09-01) revendications 1,7,11,14,15	1-14
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/052410

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE WPI Week 200330 Thomson Scientific, London, GB; AN 2003-303834 XP002541212 & JP 2002 226323 A (MARUZEN SEIYAKU KK) 14 août 2002 (2002-08-14) abrégé -----	1-14
X	DATABASE WPI Week 200868 Thomson Scientific, London, GB; AN 2008-L60763 XP002541213 & JP 2008 184440 A (SONY CP LAB KK) 14 août 2008 (2008-08-14) abrégé -----	1-14
X	DATABASE WPI Week 199838 Thomson Scientific, London, GB; AN 1998-440184 XP002541214 & HU 9 700 451 A (BINDICS F.) 28 mai 1998 (1998-05-28) abrégé -----	1-14
X	DATABASE WPI Week 200403 Thomson Scientific, London, GB; AN 2004-028788 XP002541215 & JP 2003 342119 A (EIKODO HONTEN KK) 3 décembre 2003 (2003-12-03) abrégé -----	1-14
X	DATABASE WPI Week 199411 Thomson Scientific, London, GB; AN 1994-089259 XP002541216 & JP 06 040882 A (FUJISAWA PHARM CO. LTD.) 15 février 1994 (1994-02-15) abrégé -----	1-14
X	DATABASE WPI Week 200868 Thomson Scientific, London, GB; AN 2008-L60762 XP002541217 & JP 2008 184439 A (SONY CP LAB KK) 14 août 2008 (2008-08-14) abrégé -----	1-14
X	DATABASE WPI Week 200281 Thomson Scientific, London, GB; AN 2002-744220 XP002541218 & JP 2002 212050 A (EIKODO HONTEN KK) 31 juillet 2002 (2002-07-31) abrégé -----	1-14
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°

PCT/FR2009/052410

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 343 330 A (MILES INC.) 29 novembre 1989 (1989-11-29) page 2 - page 3 -----	1-14
A	US 5 591 429 A (WILSON ET AL.) 7 janvier 1997 (1997-01-07) colonne 2, ligne 1 - ligne 16 -----	1-14
A	DATABASE WPI Week 200755 Thomson Scientific, London, GB; AN 2007-564235 XP002541219 & JP 2007 143452 A (NIPPON APRICOT KK) 14 juin 2007 (2007-06-14) abrégé -----	1-14
A	CODOGNO ET AL.: "Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death" CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, vol. 12, 2005, pages 1509-1518, XP002541242 page 1509, colonne 2, dernier alinéa page 1510, colonne 2, alinéa 2 page 1511, colonne 2, alinéa 3 page 1512; figure 1 -----	1-14
A	DONATI: "The involvement of macroautophagy in aging and anti-aging interventions" MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE, vol. 27, 2006, pages 455-470, XP005681057 page 462 - page 465 -----	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/052410

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2007119227 A	25-10-2007	US 2007248563 A1	25-10-2007
FR 2674126 A	25-09-1992	AUCUN	
BR 9402197 A	09-01-1996	AUCUN	
US 2005058672 A1	17-03-2005	AUCUN	
US 2005048008 A1	03-03-2005	AUCUN	
JP 3161412 A	11-07-1991	AUCUN	
JP 2005281205 A	13-10-2005	AUCUN	
FR 2815852 A	03-05-2002	AUCUN	
EP 1992322 A	19-11-2008	AUCUN	
JP 2006008571 A	12-01-2006	AUCUN	
US 2005191267 A1	01-09-2005	AU 2005200460 A1 CA 2495839 A1 JP 2005239715 A	18-08-2005 04-08-2005 08-09-2005
JP 2002226323 A	14-08-2002	AUCUN	
JP 2008184440 A	14-08-2008	AUCUN	
HU 9700451 A	28-05-1998	AUCUN	
JP 2003342119 A	03-12-2003	AUCUN	
JP 6040882 A	15-02-1994	AUCUN	
JP 2008184439 A	14-08-2008	AUCUN	
JP 2002212050 A	31-07-2002	AUCUN	
EP 0343330 A	29-11-1989	JP 1277495 A US 4877728 A	07-11-1989 31-10-1989
US 5591429 A	07-01-1997	AT 206010 T AU 681179 B2 AU 7407094 A BR 9407025 A CA 2167802 A1	15-10-2001 21-08-1997 20-02-1995 10-09-1996 02-02-1995
US 5591429 A		DE 69428448 D1 DE 69428448 T2 EP 0712279 A1 JP 2863008 B2 JP 8511433 T NZ 269717 A WO 9502964 A1	31-10-2001 13-06-2002 22-05-1996 03-03-1999 03-12-1996 24-11-1997 02-02-1995
JP 2007143452 A	14-06-2007	AUCUN	