

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 970 868

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

②① N° d'enregistrement national :

11 50739

⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 8/97** (2012.01), A 61 K 36/185, A 61 Q 19/08,
A 61 P 17/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 31.01.11.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 03.08.12 Bulletin 12/31.

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

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *SEDERMA Société par actions simpli-
fiée — FR.*

⑦② Inventeur(s) : FURNIAL ARNAUD, GRIZAUD
CLAIRE-MARIE, MONDON PHILIPPE et LE MOIGNE
CAROLINE.

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

⑦④ Mandataire(s) : *SEDERMA.*

⑤④ **EXTRAIT D'ORIGINE VÉGÉTALE, COMPOSITION LE CONTENANT, PROCÉDE D'OBTENTION PAR CULTURE VÉGÉTALE ET UTILISATIONS DANS LES DOMAINES COSMÉTIQUE, PHARMACEUTIQUE ET COSMÉCEUTIQUE.**

⑤⑦ L'extrait d'origine végétale est caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir d'une plante du genre *Globularia*, de préférence l'espèce *Globularia Cordifolia*.

L'extrait selon l'invention peut être obtenu par culture végétale *in vitro* de cellules indifférenciées. Il peut être utilisé comme agent actif dans une composition pour prévenir et/ou traiter le vieillissement cutané en stimulant les réactions de détoxification et la régénération cellulaire grâce à une réponse de type hormétique. Une telle composition permet notamment l'amélioration de l'aspect visuel de la peau, éclat et transparence du teint.

FR 2 970 868 - A1



DESCRIPTION

La présente invention se rapporte à un nouvel extrait d'origine végétale, à une composition le contenant, à un procédé d'obtention préférentiel de cet extrait par culture végétale *in vitro* et à des utilisations topiques dans le domaine des cosmétiques et des produits d'hygiène et de soins personnels.

La présente invention concerne plus généralement les industries cosmétique, pharmaceutique et cosméceutique, qui produisent et/ou utilisent des extraits d'origine végétale destinés à prévenir et/ou traiter les désordres et pathologies de la peau, du cuir chevelu, des muqueuses et des phanères (tels que poils, cils, sourcils, ongles, cheveux) de mammifères, animaux ou humains.

- 10 En cosmétique, il existe de nombreuses façons d'améliorer l'état général de la peau et des phanères notamment donner ou redonner de l'éclat, hydrater, pigmenter ou dépigmenter, protéger contre les agressions extérieures, comme les UV ou le froid, calmer les irritations, les rougeurs, l'acné, diminuer les micro-oedèmes (comme les poches sous les yeux), diminuer les cernes, les signes de vieillissement, comme les rides, les ridules, les pigmentations, redonner de la souplesse et de
- 15 l'élasticité, traiter les chutes de cheveux, agir sur les tissus adipeux, donner du volume, de la densité, améliorer la texture, etc.

Par extrait d'origine végétale, on entend selon l'invention un extrait pouvant être obtenu directement à partir d'une plante ou par culture végétale.

- Le règne végétal est depuis longtemps et dans toutes les régions du monde une source abondante et
- 20 largement utilisée de substances actives sur le plan biologique, dans les domaines pharmaceutique et cosmétique notamment. Les possibilités sont infinies.

La présente invention a pour but de proposer un nouvel extrait d'origine végétale pour l'industrie des cosmétiques et de la dermopharmacie toujours en demande de nouveaux ingrédients actifs.

- A cet effet, elle propose un extrait d'origine végétale caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir
- 25 d'une plante du genre *Globularia*.

- La peau est soumise à de nombreuses agressions externes : UV, ondes électromagnétiques, oxydants, pollutions, agents biologiques. Ces stress induisent entre autre effets délétères des phénomènes micro-inflammatoires plus ou moins chroniques et la formation de produits toxiques dans les cellules de l'épiderme ou à leur périphérie. Parmi ces produits, on trouve les médiateurs
- 30 pré-inflammatoires et certains facteurs de croissance qui provoquent une sur-densification locale des terminaisons nerveuses épidermiques associée à une hyperréactivité aux stimuli externes. Ceci a pour conséquence d'abaisser le seuil de tolérance de la peau vis-à-vis de ces stimuli. Elle devient très sensible, ce qui génère un inconfort mais aussi le plus souvent des rougeurs passagères.

- Par ailleurs, la peau accumule progressivement des débris d'origines variées, composés de
- 35 protéines, glucides et lipides altérés. Ces composants (protéines carbonylées, lipoperoxydes, lipofuscine,...) se comportent aussi comme des produits toxiques qui perturbent la physiologie et

l'homéostasie cellulaire et modifient des équilibres métaboliques fragiles. Au fil du temps, ils altèrent la respiration mitochondriale, l'intégrité membranaire, l'activité enzymatique et les mécanismes de détoxification comme le protéasome. De telles modifications peuvent provoquer le changement de comportement de certaines cellules comme les cellules souches. En effet, ces dernières se trouvent dans un environnement particulier dont la modification peut conduire à l'affaiblissement de leur caractère et de leur phénotype progéniteur (taille cellulaire plus importante, réduction des capacités multiplicatrices...), ce qui les rend moins aptes à tenir leur rôle dans le renouvellement des kératinocytes.

Des données expérimentales montrent que les stress doux reçus précocément peuvent retarder la dégradation cutanée et donc le vieillissement, en aidant ultérieurement l'organisme à faire face à des stress plus sévères (agressions externes). Ce phénomène a pour nom hormesis. Il repose sur l'activation de mécanismes de détoxification et de défense cellulaire, en réponse à un stress doux ou en réponse à des substances dont on dit qu'elles ont un effet hormétique (molécules appelées hormétines). L'hormesis va ainsi contribuer à une meilleure adaptation de la cellule et donc de l'organisme face aux stress ultérieurs, en lui permettant de lutter plus efficacement contre les effets délétères mentionnés ci-dessus.

Il est ainsi très intéressant d'un point de vue cosmétique, dermo-pharmaceutique et cosméceutique, de pouvoir mimer les effets de l'hormesis afin d'améliorer la physiologie de la peau et lui permettre de mieux lutter contre les futures agressions et ainsi contre le vieillissement. Pour une meilleure compréhension de cet effet hormétique, on peut parler de vaccin anti-âge. Cependant l'effet hormétique, s'il se traduit sur un temps long (anti-âge), permettra également d'améliorer rapidement l'état de la peau (sur le cours-terme) en lui conférant une moindre sensibilité aux agressions extérieures et en lui donnant plus de transparence et d'éclat.

C'est cet ensemble de propriétés inattendues et originales qui a été notamment démontré pour l'extrait suivant l'invention au travers d'une série de tests qui seront développés par la suite.

Ainsi, la description détaillée donnée plus loin, montre qu'un tel extrait présente des propriétés *in vivo* tout à fait inattendues et originales dans les domaines techniques ciblés, notamment une amélioration de la transparence de la peau et de la réactivité cutanée produisant un effet remarquable sur la qualité visuelle de la peau : éclat, clarté, pureté et homogénéité du teint, aspect lisse, etc. grâce notamment à une stimulation des défenses hormétiques de la peau.

Le genre *Globularia* appartient à la famille des Globulariacées et comprend plusieurs espèces, dont celles connues : *Globularia alypum*, *Globularia bisnagarica*, *Globularia cordifolia*, *Globularia nudicaulis*, *Globularia vulgaris*, *Globularia gracilis*, *Globularia repens* et *Globularia valentina*. La Demanderesse s'est plus particulièrement intéressée à l'espèce *Globularia cordifolia*.

La présente invention propose donc un extrait d'origine végétale de la plante *Globularia*, préférentiellement *Globularia cordifolia*, pour une utilisation comme ingrédient actif cosmétique

afin d'améliorer l'état général de la peau et des phanères, notamment plus particulièrement pour une utilisation comme ingrédient actif cosmétique pour prévenir et/ou traiter le vieillissement cutané en stimulant les réactions de détoxification et la régénération cellulaire grâce à une réponse de type hormétique. Des exemples sont donnés plus loin montrant que l'extrait de *Globularia* selon

5 l'invention est efficace pour une utilisation comme ingrédient actif notamment pour améliorer l'éclat et/ou la transparence du teint, pour prévenir et/ou traiter les peaux sensibles et/ou réactives, pour prévenir et/ou traiter les rougeurs, pour prévenir la glycation des protéines.

L'extrait selon l'invention peut être utilisé pur ou dilué dans un excipient ou matrice physiologiquement acceptable.

- 10 D'autres applications sont envisageables, blanchissantes, hydratantes, anti-rides, raffermissantes, amincissantes, pour augmenter le volume de derme et/ou de l'épiderme, anti-acné, anti-inflammatoire, etc.

En cosmétique notamment, des applications peuvent être proposées notamment dans les gammes hydratantes, démaquillantes, nettoyantes, anti-âge, anti-oxydantes, protectrices, réparatrices (mains,

15 pieds, lèvres), contours (visage, yeux, cou, lèvres), les maquillages-soins pour la peau et pour les phanères, notamment les cils, les produits à lèvres, produits solaires, remodelant, repulpant, remodelant, gonflant (par exemple au niveau des mains, du buste, des seins), capillaires, etc.

Selon d'autres caractéristiques, l'extrait selon l'invention est obtenu de préférence par culture végétale *in vitro*, de manière plus particulière par culture cellulaire végétale ou par culture de tissu

20 à partir de lignées cellulaires ou tissulaires issues de différents organes de la plante.

L'invention couvre également les extraits obtenus à partir de la plante entière ou de parties spécifiques de cette plante. L'extrait est caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir de feuilles.

L'obtention par culture *in vitro* d'extraits d'origine végétale possède de nombreux avantages sur la voie agro-industrielle (culture de plantes en plein champ et extraction ultérieure en usine). Les

25 extraits obtenus sont exempts de substances toxiques (herbicides, pesticides, engrais, métaux lourds et autres contaminants, comme ceux pouvant provenir de parasites des végétaux). Par ailleurs, le strict contrôle des conditions de culture *in vitro* réduit le risque de variation spontanée de la souche et garantit un profil reproductible de métabolites secondaires qui correspondent aux molécules d'intérêt recherchées, contrairement à la culture en plein champ où se pose le problème de la

30 variabilité, liée aux conditions météorologiques et géographiques. Par ailleurs encore, cette technologie s'affranchit d'obstacles tels que le cycle biologique naturel de la plante et la saisonnalité de production des métabolites secondaires, permettant une meilleure sécurité et rapidité d'approvisionnement. De plus, l'impact environnemental est minimal évitant une consommation de terres arables et la pollution des sols. En outre, la biodiversité est préservée,

35 puisqu'il suffit d'un plant ou même d'une graine, pour initier une culture *in vitro*. Enfin, cette technologie offre la possibilité d'orienter le métabolisme cellulaire vers la production des

molécules d'intérêt (élicitation des cultures) et de réaliser des protocoles contrôlés et relativement rapides en vue d'optimiser les rendements.

Parmi les techniques existantes à ce jour dans le domaine de la culture *in vitro* des végétaux, on peut utiliser selon l'invention :

- 5 La culture de cellules indifférenciées. Ce type de méthode comprend d'abord la création de lignées cellulaires fortement prolifératives en milieu gélosé. Ces lignées sont ensuite cultivées en milieu liquide de façon à augmenter substantiellement la biomasse. A la fin du cycle de croissance et dans des conditions de milieu à définir et optimiser (recherche du bon milieu d'élicitation), la biomasse cellulaire va synthétiser les molécules d'intérêt. La culture est ensuite stoppée et soumise à une
10 extraction au moment optimal de façon à obtenir un extrait dit d'origine végétale contenant une quantité maximale de molécules d'intérêt. On peut aussi au départ utiliser des lignées cellulaires existantes déjà disponibles.

- 15 La culture de tissu ou d'organe. Ce type de culture peut concerner la partie racinaire (« root culture » en anglais), la partie aérienne (« shoot culture ») ou les embryons somatiques (« somatic embryo »). Dans ce type de méthode, on distingue les cultures ayant fait l'objet d'une transformation génomique par les bactéries *Agrobacterium rhizogens* (racines) ou *Agrobacterium tumefaciens* (tiges). Les cultures ainsi transformées de racines ou de parties aériennes ont un taux de croissance élevée et sont génétiquement très stables. Elles sont utilisées pour synthétiser les molécules d'intérêt après optimisation des paramètres d'élicitation. Ces molécules sont ensuite
20 extraites par les voies classiques.

- 25 La micropropagation *in vitro* par embryogenèse somatique ou par multiplication végétative. La première étape pour ces deux techniques consiste à sélectionner une plante mère ayant des caractéristiques optimales (du point de vue de la croissance et de la production de métabolites d'intérêt). Pour l'embryogenèse, l'étape suivante est l'induction de cals à partir d'explants de la
30 plante mère. Ces cellules indifférenciées peuvent donner naissance à de nombreux embryons somatiques qu'il sera possible de multiplier et d'amplifier au travers de cycles successifs de culture. A partir des lignées les plus prolifératives et les plus productives, on régénère des plantules dans un milieu approprié et on les extrait au moment opportun en vue d'une production optimale des métabolites d'intérêt. Pour la multiplication végétative, la seconde étape consiste en l'induction
de tiges feuillées à partir d'explants de la plante mère sur un milieu de culture adapté de par sa composition hormonale. Une phase d'amplification des tiges feuillées est suivie d'une phase d'enracinement pour induire les racines. Il est alors possible de régénérer des plantules en grande
quantité, de les cultiver dans un milieu approprié et d'en extraire les molécules d'intérêt.

- 35 La présente invention propose de manière préférentielle un procédé d'obtention selon la première technique. Plus particulièrement elle propose un procédé d'obtention d'un extrait d'origine végétale

par culture végétale *in vitro*, du type comprenant à partir d'une lignée de cellules végétales indifférenciées :

- une étape de pré-culture, destinée à amplifier la biomasse,
- une étape de culture en bioréacteur comprenant une phase de prolifération puis une phase d'élicitation, et
- une étape de récupération dudit extrait.

Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que la lignée cellulaire est une lignée de la plante du genre *Globularia* et de manière préférée de l'espèce *Globularia cordifolia*.

Selon d'autres caractéristiques particulières :

- 10 - L'étape de pré-culture comprend la réalisation de pré-cultures de tailles croissantes, chaque pré-culture de taille inférieure permettant de produire de la biomasse cellulaire en quantité suffisante pour ensemercer la pré-culture de taille supérieure.
- L'étape de culture en bioréacteur subséquente se fait dans un bioréacteur ensemené par la biomasse produite dans l'étape de pré-culture. Après une phase initiale de prolifération des
- 15 cellules dans un milieu de base, un milieu d'élicitation des métabolites secondaires est ajouté dans le bioréacteur. La culture est arrêtée quand le niveau voulu de métabolites secondaires a été atteint. De préférence, pour atteindre ce niveau, on utilise selon l'invention un milieu d'élicitation carencé en saccharose et en macroéléments.
- L'étape de récupération comprend une phase d'extraction de cette biomasse par tout solvant
- 20 physiologiquement acceptable, ou par un mélange quelconque de ces solvants. L'extraction peut se faire selon les différents procédés connus qu'il est possible de combiner : à chaud, par macération, décoction, infusion, pression, lixiviation, aux ultra-sons, aux micro-ondes, en lysant les cellules par tout procédé chimique ou physique approprié. La séparation des phases peut se faire par filtration ou centrifugation. Alternativement, il est possible d'extraire la biomasse avec
- 25 un fluide supercritique ou subcritique. Alternativement encore, il est possible de réaliser une purification à l'aide d'une résine adsorbante, de méthodes chromatographiques ou d'un partage liquide-liquide.

Selon un mode préféré, les cellules sont lysées afin de transférer le contenu cellulaire dans l'eau.

De préférence encore selon l'invention, la lyse est effectuée par abaissement à un pH acide.

- 30 Après différentes filtrations, on obtient un extrait stérile. Son pH est ensuite avantageusement ajusté en fonction de l'utilisation ultérieure de l'extrait, par exemple à pH 4 pour une application cosmétique comme décrite plus loin.

Selon l'invention, la lignée cellulaire peut être une lignée existante ou une lignée créée dans une étape préalable, ladite étape pouvant être réalisée séparément dans le temps.

- 35 Selon l'invention, cette étape de création de la lignée cellulaire comprend les phases 1) d'induction de cals (amas de cellules indifférenciées), 2) de sélection des meilleurs cals et 3) d'optimisation sur

les cals sélectionnés en milieu liquide des paramètres de croissance et de production des molécules d'intérêt (par exemple par élicitation).

De manière plus particulière :

- 1) L'induction de cals peut être effectuée avec toutes les parties de la plante, notamment feuille, fruit, racine, bourgeon, graine, tige, branche, tissu méristématiques et du cambium ; de préférence, selon l'invention, la culture cellulaire indifférenciée est réalisée à partir des feuilles de la plante.
 - 2) La sélection des meilleures lignées, avant un transfert en milieu liquide, est effectuée selon l'invention selon notamment les critères suivants : forte capacité proliférative, texture tendre et friable, couleur homogène, bonne dispersion en milieu liquide et stabilité dans le temps de ces paramètres.
 - 3) L'optimisation des caractéristiques de la croissance et de production des métabolites secondaires en milieu liquide pour les lignées sélectionnées passe par le choix des milieux les plus adaptés, dans un premier temps pour assurer une croissance rapide de la biomasse et dans un second temps pour permettre un rendement maximal de synthèse des métabolites secondaires par les cellules en fin de phase exponentielle (arrêt de la multiplication). Cette seconde phase correspond à l'élicitation de la culture et peut être réalisée de différentes façons parmi toutes celles à la disposition de l'homme du métier. On peut citer notamment : l'addition à la culture de fractions microbiennes, de molécules de stress connues pour orienter les cellules vers leur métabolisme secondaire ; l'application à la culture d'une variation de température ou de pH, ou encore d'un stress osmotique ; le recours à un appauvrissement du milieu ; l'addition à la culture de résines adsorbantes, qui en plus d'éliciter les composés d'intérêt pourront les piéger. Le mode préféré d'élicitation selon l'invention consiste à appauvrir le milieu de culture en macroéléments et en sucres.
- On obtient ainsi selon l'invention une lignée cellulaire originale permettant de produire un extrait d'origine végétale selon l'invention, original et actif dans les domaines recherchés comme le montreront les tests d'efficacité donnés plus loin, de manière préférée une lignée cellulaire de *Globularia cordifolia*.
- Lorsque l'on part d'une lignée cellulaire selon l'invention déjà existante conservée, celle-ci sera dans une étape classique, préalable à l'étape de pré-culture, d'induction des cellules végétales indifférenciées, au départ en milieu gélosé, puis en milieu liquide.
- La présente invention couvre aussi un extrait d'origine végétale obtenu de manière classique par extraction de la plante entière ou de parties spécifiques de la plante au solvant, par fluide supercritique, micro-ondes ou ultra-sons, mais des résultats comparatifs ont montré une supériorité de l'extrait issu d'une lignée cellulaire par rapport à un extrait classique au solvant. Ces résultats sont donnés plus loin dans la description détaillée.

La présente invention a également pour objet une composition topique, notamment cosmétique, pharmaceutique ou cosméceutique, caractérisée en ce qu'elle contient, dans un milieu physiologiquement acceptable, en tant qu'agent actif, une quantité efficace d'un extrait d'origine végétal d'une plante du genre *Globularia*, et plus particulièrement de l'espèce *Globularia cordifolia*.

Selon d'autres caractéristiques avantageuses, la composition selon l'invention peut incorporer un ou plusieurs ingrédients actifs additionnels, permettant avantageusement d'offrir un produit avec une palette de propriétés plus large. Les ingrédients actifs additionnels peuvent être par exemple choisis parmi les actifs éclaircissants, anti-rougeurs, les filtres solaires UV, les actifs hydratants, humectants, exfoliants anti-âges, anti-rides et ridules, amincissants, volumateurs, améliorant les propriétés élastiques, anti-acné, anti-inflammatoires, anti-oxydants, anti-radicalaires, propigmentants ou dépigmentants, dépilatoires, anti-repousse, ou favorisant la pousse des poils et des cheveux, peptides, vitamines etc. Ces ingrédients actifs peuvent être obtenus à partir de matériaux végétaux, comme des extraits végétaux ou des produits de culture végétale ou de fermentation.

Plus spécifiquement, dans une composition cosmétique, l'extrait d'origine végétale selon l'invention peut être combiné avec au moins l'un des composés choisis parmi les composés de la vitamine B₃, les composés comme la niacinamide ou le tocophérol, les composés rétinoïdes comme le rétinol, l'hexamidine, l'acide α -lipoïque, le resvératrol ou la DHEA, les peptides, notamment le N-acétyl-Tyr-Arg-O-hexadécyl, le Pal-VGVAPG, le Pal-KTTKS, le Pal-GHK, le Pal-KMO2K et le Pal-GQPR, qui sont des ingrédients actifs classiques utilisés dans les compositions topiques cosmétiques ou dermo-pharmaceutiques.

La présente invention sera mieux comprise à la lumière de la description qui va suivre.

Les exemples qui suivent illustrent l'invention sans pour autant la limiter à ces seules applications.

25 **Préparation des compositions**

Par « milieu physiologiquement acceptable » on entend selon la présente invention, sans être limitatif, une solution aqueuse ou hydro alcoolique, une émulsion eau-dans-huile, une émulsion huile-dans-eau, une microémulsion, un gel aqueux, un gel anhydre, un sérum, une dispersion de vésicules, une poudre.

« physiologiquement acceptable » signifie que les compositions conviennent à une utilisation topique ou transdermique, en contact avec les muqueuses, les ongles, le cuir chevelu, les cheveux, les poils et la peau de mammifère et plus particulièrement humaine, des compositions pouvant être ingérées ou injectées dans la peau, sans risque de toxicité, d'incompatibilité, d'instabilité, de réponse allergique, et autres.

« Ce milieu physiologiquement acceptable » forme ce que l'on appelle classiquement l'excipient de la composition.

La quantité efficace d'extrait d'origine végétale selon l'invention, c'est-à-dire son dosage, dépend de la destination de la composition topique, cosmétique, pharmaceutique ou cosméceutique.

La quantité cosmétique, nutraceutique ou pharmaceutique efficace selon l'invention, à administrer pour traiter un désordre ou une pathologie et son dosage dépend de divers facteurs, comme l'âge, l'état du patient, la gravité du désordre ou de la pathologie et du mode d'administration. Une quantité efficace signifie une quantité non toxique suffisante pour obtenir l'effet désiré.

Dans une composition cosmétique selon l'invention, l'extrait de *Globularia* pour être présent en quantité efficace, se trouve en général dans des proportions comprises entre 0,000001% et 15% par rapport au poids total de la composition, de préférence encore entre 0,0001% et 10%, en fonction de la destination de la composition et de l'effet recherché plus ou moins prononcé.

Tous les pourcentages et ratios utilisés dans la présente demande sont par poids de la composition totale et toutes les mesures sont faites à 25°C à moins que cela ne soit précisé autrement.

Le choix de l'excipient de la composition est effectué en fonction des contraintes liées à l'extrait actif de *Globularia* (stabilité, solubilisation, etc.) et le cas échéant de la forme galénique envisagée ensuite pour la composition.

L'extrait de *Globularia* selon l'invention peut être incorporé dans la composition au moyen d'une solution aqueuse, ou être solubilisé grâce à des solubilisants usuels physiologiquement acceptables, comme par exemple et sans limiter à cette liste : l'éthanol, le propanol, l'isopropanol, le propylène glycol, la glycérine, le butylène glycol, ou le polyéthylène glycol ou toute combinaison. Il peut être également intéressant de solubiliser l'extrait à l'aide d'émulsifiants. On peut également utiliser un support poudre.

Les compositions de la présente invention sont généralement préparées par des méthodes usuelles bien connues par l'homme de l'art de la fabrication des compositions topiques et orales et les compositions pour l'injection. De telles méthodes peuvent impliquer un mélange d'ingrédients dans une ou plusieurs étapes pour obtenir un état uniforme, avec ou sans chauffage, refroidissement, etc.

Les différentes formes galéniques pouvant contenir l'extrait de *Globularia* selon l'invention se présentent sous toute forme à savoir crèmes, lotions, onguents laits ou crèmes, gels, émulsions, dispersions, solutions, suspensions, nettoyants, fonds de teint, préparations anhydres (sticks en particulier baume à lèvres, huiles pour le corps et le bain), gels pour la douche et le bain, shampooings et lotions de soin du cheveu, laits ou crèmes pour les soins de la peau ou des cheveux, lotions ou laits démaquillants, lotions, laits ou crèmes anti-solaires, lotions, laits ou crèmes de bronzage artificiel, crèmes, mousses, gels ou lotions de pré rasage, de rasage, ou après-rasage, maquillage, rouges à lèvres, mascaras ou vernis à ongles, "essences" de peau, sérums, matériels adhésifs ou absorbants, patchs transdermiques, ou poudres, lotions, laits ou crèmes émollientes, sprays, huiles pour le corps et le bain, bases de fond de teint, pommade, émulsion, colloïde, suspension compacte ou solide, crayon, formulation pulvérisable, brossable, fard à joues, rouge,

eyeliner, lipliner, gloss pour lèvres, poudre pour le visage ou le corps, mousses ou gels coiffants, conditionnant pour ongles, baumes à lèvres, conditionnants de peau, hydratants, laques, savons, exfoliants, astringents, produits dépilatoires solutions ondulantes permanentes, formulations anti-pelliculaires, compositions anti-transpirantes ou antiperspirantes, notamment sticks, « roll-on »
 5 déodorants, désodorisants, pulvérisations pour nez et ainsi de suite. Ces compositions peuvent également se présenter sous la forme de bâtons pour les lèvres destinés soit à les colorer, soit à éviter les gerçures, ou de produits de maquillage pour les yeux ou des fards et fonds de teint pour le visage. Les compositions selon l'invention incluent des produits de beauté, des produits personnels de soin et des préparations pharmaceutiques. On peut également envisager une composition sous la
 10 forme d'une mousse ou encore sous forme de compositions pour aérosol comprenant également un agent propulseur sous pression.

Les compositions selon l'invention peuvent aussi être à usage bucco-dentaire, par exemple une pâte dentifrice. Dans ce cas, les compositions peuvent contenir des adjuvants et additifs usuels pour les compositions à usage buccal et notamment des agents tensioactifs, des agents épaississants, des
 15 agents humectants, des agents de polissage tels que la silice, divers ingrédients actifs comme les fluorures, en particulier le fluorure de sodium, et éventuellement des agents édulcorants comme le saccharinate de sodium.

L'extrait dans le cadre de la présente invention peut être utilisé sous forme solution, de dispersion, d'émulsion, de pâte ou de poudre, individuellement ou en pré-mélange ou être véhiculée
 20 individuellement ou en pré-mélange par des vecteurs comme les macrocapsules, les microcapsules ou les nanocapsules, les macrosphères, les microsphères, ou les nanosphères, les liposomes, les oléosomes ou les chylomicrons, les macroparticules, les microparticules ou les nanoparticules, macroéponges, les microéponges ou les nanoéponges, les microémulsions ou les nanoémulsions, ou adsorbé sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites, spores ou exines et autres
 25 supports minéraux ou organiques.

L'extrait de *Globularia* selon la présente invention peut être utilisé sous n'importe quelle forme, dans une forme liée, incorporée ou adsorbée sur des macro -, micro -, et nanoparticules, ou sur macro-, micro- et nanocapsules, pour le traitement des textiles, des fibres naturelles ou synthétiques, des laines, et tous matériaux destinés à entrer en contact avec la peau et qui peuvent
 30 être employés dans l'habillement, les sous-vêtements de jour ou de nuit, les mouchoirs, ou les tissus, afin d'exercer son effet cosmétique par l'intermédiaire de ce contact peau/textile et permettre une délivrance topique continue.

Ingrédients additionnels

Le CTFA ("International cosmetic ingredient dictionary & handbook (13ème Ed. 2010) publié par
 35 "the Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Inc.", Washington, D.C.) décrit une grande variété, sans limitation, d'ingrédients cosmétiques et pharmaceutiques habituellement utilisés dans

l'industrie du soin de la peau, qui conviennent pour être utilisés comme ingrédients additionnels dans les compositions selon la présente invention. Des exemples non limitatifs de ces classes d'ingrédients additionnels incluent : les agents cicatrisants, les agents anti-âge, les agents anti-rides, les agents anti-atrophie, les agents hydratants, les agents adoucissants, les agents antibactériens, les agents antiparasitaires, les agents antifongiques, les agents fongicides, les agents fongistatiques, les agents bactéricides, les agents bactériostatiques, les agents antimicrobiens, les agents anti-inflammatoires, les agents anti-prurigineux, les agents anesthésiques, les agents antiviraux, les agents kératolytiques, les agents anti-radicaux libres, les agents anti-séborrhéiques, les agents anti-pelliculaires, les agents modulant la différenciation, la prolifération ou la pigmentation cutanée, les agents accélérateurs de pénétration, les agents desquamants, les agents stimulant ou inhibant la synthèse de mélanine, les agents blanchissants, dépigmentants, ou éclaircissants, les agents propigmentants, les agents auto-bronzants, les agents inhibant la NO-synthase, les agents antioxydants, les agents piègeurs de radicaux libres et/ou anti-pollution atmosphérique, les agents anti-glycation, les agents raffermissants, les agents stimulant la synthèse des macromolécules dermiques ou épidermiques et/ou les agents capables de prévenir ou inhiber leur dégradation, les agents stimulant la synthèse de collagène, les agents stimulant la synthèse d'élastine, les agents stimulant la synthèse de décorine, les agents stimulant la synthèse de laminine, les agents stimulant la synthèse de défensine, les agents stimulant la synthèse de chaperon, les agents stimulant la synthèse de d'aquaporine, les agents stimulant la synthèse d'acide hyaluronique, les agents stimulant la synthèse de lipides et de composants du stratum corneum (céramides, acides gras, ...), les agents inhibant la dégradation du collagène, les agents inhibant la dégradation de l'élastine, les agents stimulant la prolifération des fibroblastes, les agents stimulant la prolifération des kératinocytes, les agents stimulant la prolifération des adipocytes, les agents stimulant la prolifération des mélanocytes, les agents stimulant la différenciation des kératinocytes, les agents stimulant la différenciation des adipocytes, les agents inhibant l'acétylcholinestérase, les agents stimulant la synthèse des glycosaminoglycanes, les agents réparant l'ADN, les agents protégeant l'ADN, les agents anti-démangeaison, les agents pour le traitement et/ou le soin de la peau sensible, les agents raffermissants, les agents anti-vergetures, les agents astringents, les agents régulant la production du sebum, les agents dermorelaxants, les agents adjuvants de guérison, les agents stimulant la réépithélialisation, les agents adjuvants de réépithélialisation, les facteurs de croissance de cytokine, les agents calmants, les agents anti-inflammatoires, les agents agissant sur la circulation et/ ou microcirculation capillaire, les agents stimulant l'angiogénèse, les agents inhibant la perméabilité vasculaire, les agents agissant sur le métabolisme cellulaire, les agents destinés à améliorer la jonction dermo-épidermique, les agents induisant la pousse des cheveux et/ou des poils, les agents inhibant ou ralentissant la pousse des cheveux et/ou des poils, les agents myorelaxants, les agents anti-pollution et/ou anti-radicalaires, les agents stimulant la lipolyse, les agents

amincissants, les agents anti-cellulite, les agents agissant sur la microcirculation, les agents agissant sur le métabolisme des cellules, les agents nettoyants, les agents de coiffage du cheveu, les stimulants de la pousse des cheveux, les écrans solaires, les écrans totaux, les agents de maquillage, les détergents, les produits pharmaceutiques, les agents émulsifiants, les émollients, les solvants organiques, les agents antiseptiques, les actifs déodorants, les milieux physiologiquement acceptables, les surfactants, les agents abrasifs, les absorbants, les composants esthétiques comme les parfums, les pigments, les teintures, colorants et colorants naturels, les huiles essentielles, les agents de toucher, les astringents cosmétiques, les agents anti-acné, les agents anti-coagulation, les agents anti-mousse, les antioxydants, les liguants, les additifs biologiques, les enzymes, les inhibiteurs enzymatiques, les inducteurs enzymatiques, les coenzymes, les agents chélatants, les extraits végétaux et dérivés de plantes, les huiles essentielles, les extraits marins, les agents venant d'un procédé de biofermentation et/ou de biotechnologie, les sels minéraux, les extraits cellulaires, les écrans solaires (les agents photoprotecteurs organiques ou minéraux qui sont actifs contre les rayons ultraviolets A et/ou B) les céramides, les peptides, les tampons, les agents de volume, les agents chélatants, les additifs chimiques, les colorants, les biocides cosmétiques, les dénaturants, les astringents médicaux, les analgésiques externes, les agents filmogènes, comme les polymères, pour exacerber les propriétés filmogènes et la substantivité de la composition, les dérivés quaternaires, les agents augmentant la substantivité, les agents opacifiants, les ajusteurs et régulateurs de pH (ex. triethanolamine), les propellants, les agents réducteurs, les séquestrants, les agents décolorants et/ou éclaircissant de la peau, les agents conditionnant de la peau (i.e., humectants, incluant miscellanées et occlusifs), les substances retenant l'humidité, les alphahydroxyacides, les bêtahydroxyacides, les hydratants, les enzymes hydrolytiques épidermiques, les agents apaisants et/ou cicatrisants les agents traitant la peau, les agents anti-rides, les agents capables de réduire ou traiter les poches sous les yeux, les agents exfoliants, les épaississants, les adoucissants, les polymères gélifiants, les vitamines et leurs dérivés, les agents mouillants, les agents pelants, les agents calmants, les agents curatifs de la peau, les lignanes, les conservateurs (i.e. phoxyethanol et parabens), les anti UV, les agents cytotoxiques, anti néoplastiques, agents modifiant la viscosité, les solvants non volatiles, des agents perlants, les agents anti transpirant, les dépilatoires, vaccin, eau parfumée, agent restructurant la peau (i.e. extrait de *Siegesbeckia orientalis*), les excipients, les charges, les minerais, les agents anti-mycobactériens, les agents anti-allergéniques, les antihistaminiques H1 ou H2, les anti-irritants, les agents stimulant le système immunitaire, les agents inhibant le système immunitaire, les agents répulsifs d'insectes, les lubrifiants, les pigmentants ou colorants, les agents hypopigmentants, les conservateurs, les agents photostabilisants, et leurs mélanges, tant qu'ils sont physiquement et chimiquement compatibles avec les autres ingrédients de la composition et spécialement avec les actifs de la présente invention. Par ailleurs la nature de ces ingrédients additionnels ne doit pas

altérer de manière inacceptable les bénéfices des actifs de l'invention. Ces ingrédients additionnels peuvent être synthétiques ou naturels comme par exemple les extraits de plantes ou venir d'un procédé de biofermentation. Des exemples additionnels peuvent être trouvés dans le CTFA Cosmetic Ingredient Handbook.

- 5 De tels ingrédients additionnels peuvent être choisis dans le groupe comprenant : les sucres aminés, glucosamine, D-glucosamine, N-acetyl- glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, mannosamine, N-acetyl mannosamine, galactosamine, N-acétyl galactosamine, vitamine B3 et ses dérivés, le niacinamide, déhydro-acétate de sodium, l'acide déhydroacétique et ses sels, phytosterols, composés d'acide salicylique, hexamidines, composés d'hydroxyproline de dialkanoyl, extraits et dérivés de
- 10 soja, equol, isoflavones, flavonoïdes, phytantriol, farnesol, géraniol, bisabolol, peptides et leurs dérivés, di -, tri -, tétra -, penta -, et hexapeptides et leurs dérivés, lys-thr-thr-lys-ser, palmitoyl-lys-thr-thr-lys-ser, carnosine, composés d'acide aminé N-acyl, rétinoïdes, propionate de rétinyl, rétinol, palmitate de rétinyl, acétate de rétinyl, rétinol, acide rétinoïque, vitamines hydrosolubles, ascorbates, vitamine C, glucoside ascorbyl, palmitate ascorbyl, magnesium ascorbyl phosphate, sodium ascorbyl
- 15 phosphate, vitamines et leurs sels et dérivés, provitamines et leurs sels et dérivés, ethyl panthenol, vitamine B et ses dérivés, vitamine B1, vitamine B2, vitamine B6, vitamine B12, vitamine K et ses dérivés, acide pantothénique et ses dérivés, éther éthylique de pantothenyl, panthenol et ses dérivés, panthenol éthylique, dexpantenol, biotine, acides aminés et leurs sels et les dérivés, acides aminés hydrosolubles, asparagine, alanine, indol, acide glutamique, vitamines insolubles dans l'eau, vitamine
- 20 A, vitamine E, vitamine F , vitamine D et ses composés, mono-, di -, et triterpénoïdes, bêta-ionol, cedrol, et leurs dérivés, acides aminés insolubles dans l'eau, tyrosine, tryptamine, matériaux particuliers, hydroxytoluène butylé, hydroxyanisole butylé, allantoin, nicotinate de tocophérol, tocophérol, esters de tocophérol, palmitoyl-gly-his-lys, phytostérol, hydroxy acides, acide glycolique, acide lactique, acide lactobionique, kétoacides, acide pyruvique, acide phytique, acide
- 25 lysophosphatidique, stilbenes, cinnamates, resveratrol, kinétine, zeatin, diméthylaminoethanol, peptides naturels, les peptides de soja, sels de sucres acides, gluconate de manganèse, gluconate de zinc, olamine de piroctone, 3,4,4'- trichlorocarbanilide, triclocarban, pyrithione de zinc, hydroquinone, acide kojique, acide ascorbique, magnésium ascorbyl phosphate, ascorbyl glucoside, pyridoxine, l'aloe vera, les alcools de terpène, allantoin, bisabolol, glycyrrhizinate dipotassique,
- 30 acide de glycérol, de sorbitol, de pentaerythritol, de pyrrolidone et ses sels, dihydroxyacetone, erythrose, glycéraldéhyde, tartaraldehyde, l'essence de clou de girofle, le menthol, le camphre, l'essence d'eucalyptus, eugénol, le lactate de menthyle, le distillat d'hamamélis, copolymère d'eicosène et vinyl pyrrolidone, iodopropyl butylcarbamate, un polysaccharide, un acide gras essentiel, un salicylate, un acide glycyrrhétinique, des caroténoïdes, des céramides et des pseudo-
- 35 céramides, un lipide complexe, les huiles en générale d'origine naturelle telles le beurre de karité, l'huile d'abricot, l'huile d'onagre, l'huile de pruneau, l'huile de palme, l'huile de manoi,

hydroquinone, l'HEPES, la procystéine, l'O-octanoyl-6-D-maltose, le sel disodique d'acide méthylglycine diacétique, les stéroïdes tels que la diosgénine et les dérivés de la DHEA, la DHEA déhydroépiandrostérone et/ou un précurseur ou dérivé chimique ou biologique, le N-éthylcarbonyl-4-para-aminophénol, les extraits de myrtille, les phytohormones, les extraits de levure *Saccharomyces cerevisiae*, les extraits d'algues, les extraits de soja, de lupin, de maïs et/ou de pois, l'alvérine et ses sels, en particulier le citrate d'alvérine, les extraits de petits houx et de marron d'inde et leurs combinaisons, un inhibiteur de métalloprotéinase.

D'autres actifs de soin de la peau et capillaire qui sont particulièrement utiles en combinaison avec la composition peuvent être trouvés dans la documentation commerciale de Sederma et sur le site www.sederma.fr.

On peut aussi citer à titre d'exemples les actifs commerciaux suivants : la bétaine, le glycérol, l'Actimoist Bio 2™ (Active organics), AquaCacteen™ (Mibelle AG Cosmetics), Aquaphyline™ (Silab), AquaregulK™ (Solabia), Carciline™ (Greentech), Codiavelane™ (Biotech Marine), Dermaflux™ (Arch Chemicals, Inc), HydraFlow™ (Sochibo), Hydrom moist L™ (Symrise), RenovHyal™ (Soliance), Seamoss™ (Biotech Marine), Essenskin™ (Sederma), Moist 24™ (Sederma), Argireline™ (nom commercial de l'acétyl hexapeptide-3 de Lipotec), le spilanthal ou un extrait d'*Acmella oleracea* connu sous le nom Gatuline Expression™, un extrait de *Boswellia serrata* connu sous le nom Boswellin™, Deepaline PVB™ (Seppic), Syn-AKE™ (Pentapharm), Ameliox™, Bioxilift™ (Silab), Juvinity™ (Sederma), Revidrat™ (Sederma), ou des mélanges de ceux-ci.

Parmi les extraits de plante pouvant être combinés avec l'extrait selon l'invention, on peut mentionner en outre en particulier les extraits de lierre, par exemple de lierre grimpant (*Hedera Helix*), de *Bupleurum chinensis*, de *Bupleurum Falcatum*, d'arnica (*Arnica Montana L*), de romarin (*Rosmarinus officinalis N*), de souci (*Calendula officinalis*), de sauge (*Salvia officinalis L*), de ginseng (*Panax ginseng*), de ginkgo biloba, de millepertuis (*Hypericum Perforatum*), de fragon (*Ruscus aculeatus L*), d'ulmaire (*Filipendula ulmaria L*), d'orthosiphon (*Orthosiphon Stamincus Benth*), d'algues (*Fucus Vesiculosus*), de bouleau (*Betula alba*), de thé vert, de noix de cola (*Cola Nipida*), de marronniers d'Inde, de bambou, *Centella asiatica*, de bruyère, fucus, saule, piloselle, les extraits d'escine, les extraits de cangzhu, les extraits de chrysanthellum indicum de *chrysanthellum indicum*, de plantes du genre *Armeniacea*, *Atractylodis Platicodon*, *Sinnomenum*, *Pharbitidis*, *Flemingia*, de *Coleus* comme *C. Forskohlii*, *C. blumei*, *C. esquirolii*, *C. scutellaroides*, *C. xanthantus* et *C. Barbatus*, comme un extrait de raciness de *Coleus barbatus*, des extraits de *Ballote*, *Guioa*, *Davallia*, *Terminalia*, *Barringtonia*, *Trema*, *antirobia*, *cecropia*, *argania*, *dioscoreae* comme *Dioscorea opposita* ou mexicain, des extraits de *Ammi visnaga*, de *Siegesbeckia*, en particulier *Siegesbeckia orientalis*, des extraits végétaux de la familles des *Ericaceae*, en particulier des extraits de myrtilles (*Vaccinium angustifolium*) de *Arctostaphylos uva ursi*, *aloe vera*, de plantes contenant des stérols (notamment des phytostérols), de Manjistha

(extrait de plantes du genre *Rubia*, en particulier *Rubia Cordifolia*), de Guggal (extrait de plantes du genre *Commiphora*, en particulier *Commiphora Mukul*), un extrait de kola, camomille, treffle violet, de *Piper methysticum* (*Kava Kava* de Sederma), de *Bacopa monieri* (Bacocalmine™, Sederma) et de fouet de mer, de *Glycyrrhiza glabra*, de mûrier, de *melaleuca* (arbre à thê), de
 5 *Larrea divaricata*, de *Rabdosia rubescens*, de *Euglena gracilis*, de *Fibraurea recisa Hirudinea*, de *Chaparral Sorghum*, de fleur de tournesol, d'*Enantia chlorantha*, de Mitracarpe du genre *Spermacoceae*, de *Buchu barosma*, de *Lawsonia inermis* L., d'*Adiantum Capillus-Veneris* L., de *Chelidonium majus*, de *Luffa cylindrical*, de « Japanese Mandarin » (*Citrus reticulata* Blanco var. *unshiu*), de *Camelia sinensis*, de *Imperata cylindrical*, de *Glaucium Flavum*, de *Cupressus*
 10 *Sempervirens*, de *Polygonatum multiflorum*, de *loveily hemsleya*, de *Sambucus Nigra*, de *Phaseolus lunatus*, de *Centaurium*, de *Macrocystis Pyrifer*, de *Turnera Diffusa*, de *Anemarrhena asphodeloides*, de *Portulaca pilosa*, d'*Humulus lupulus*, de café Arabica ou d'*Ilex Paraguariensis*.

Les compositions selon la présente invention peuvent comprendre des peptides, incluant, sans se limiter, les, di-, tri-, tetra-, penta- et hexapeptides et leurs dérivés. Selon un mode de réalisation
 15 particulier, la concentration du peptide additionnel, dans la composition, varie entre $1 \times 10^{-7}\%$ et 20%, de préférence entre $1 \times 10^{-6}\%$ et 10%, préférentiellement entre $1 \times 10^{-5}\%$ et 5%, en poids.

Dans le cadre de la présente invention, le terme « peptide » désigne les peptides contenant 10 acides aminés ou moins, leurs dérivés, isomères et complexes avec d'autres espèces telles qu'un ion métal (e.g. cuivre, zinc, manganèse, magnésium, et autres). Le terme "peptides" se réfère à la fois à des
 20 peptides naturels et à des peptides de synthèse. Il se réfère également à des compositions qui contiennent des peptides et qui se rencontrent dans la nature, et/ou qui sont commercialement disponibles.

Des exemples non limitatifs de dipeptides utilisables dans le cadre de la présente invention, comprennent la Carnosine (beta-AH), YR, VW, NF, DF, KT, KC, CK, KP, KK ou TT. Des
 25 exemples non limitatifs de tripeptides comprennent RKR, HGG, GHK, GKH, GGH, GHG, KFK, GKH, KPK, KMOK, KMO₂K ou KAvaK. Des exemples non limitatifs de tetrapeptides sont RSRK, GQPR ou KTFK. Un exemple non limitatif de pentapeptide est le KTTKS et d'hexapeptides les GKTTKS et VGVAPG.

D'autres peptides utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être choisis parmi, sans
 30 que cette liste soit limitative : les dérivés lipophiles de peptides, de préférence les dérivés palmitoyl, et les complexes avec les ions métal mentionnés plus haut (e.g. complexe cuivre du tripeptide HGG). Les dipeptides préférés comprennent par exemple le N-Palmitoyl-beta-Ala-His, N-Acetyl-Tyr-Arg-hexadecylester (Calmosensine™, Idealift™, Sederma). Les tripeptides préférés comprennent notamment le N-Pal-Gly-Lys-His, (Pal-GKH, Sederma), le dérivé cuivre de HGG
 35 (Lamin™, Sigma), la lipospondin (N-Elaidoyl-KFK) et ses analogues de substitution conservative, N-Acetyl-RKR-NH₂ (Peptide CK+), N-Biot-GHK (Sederma), le Pal-KMO₂K (Sederma) et leurs

dérivés. Des dérivés tetrapeptides utilisables dans le cadre de la présente invention comprennent, sans y être limités, le N-Pal-GQPR (Sederma), des dérivés pentapeptides utilisables sont, sans y être limités, le N-Pal-KTTKS (MATRIXYL™, Sederma), le N-Pal-Tyr-Gly-Gly-Phe-X avec X étant Met ou Leu ou leur mélange. Des dérivés hexapeptides utilisables, comprennent sans y être limités : N-Pal-VGVAPG et dérivés. On peut citer aussi le mélange Pal-GHK et Pal-GQPR (Matrixyl™ 3000, Sederma).

Les compositions préférées disponibles dans le commerce contenant un tripeptide ou dérivé comprennent le Biopeptide-CL™, Maxilip™ ou Biobustyl™ de Sederma. Les compositions préférées, disponibles dans le commerce, sources de tetrapeptides comprennent : RIGIN™, Eyeliss™, Matrixyl™ Reloaded et Matrixyl 3000™, qui contiennent entre 50 et 500 ppm de palmitoyl-GQPR et un excipient, proposé par Sederma.

Les peptides commerciaux suivants peuvent également être mentionnés comme ingrédients actifs additionnels : Vialox™, Syn-ake™ or Syn-Coll™ (Pentapharm), Hydroxyprolisilane CN™ (Exsymol), Argireline™, Leuphasyl™, Aldenine™, Trylgen™, Eyeseryl™, Serilesine™ or Decorinyl™ (Lipotec), Collaxyl™ or Quintescine™ (Vincience), BONT-L-Peptide™ (Infinitec Activos), Cytokinol™LS (Laboratoires Serobiologiques/Cognis), Kollaren™, IP2000™ or Meliprene™ (Institut Européen de Biologie Cellulaire), Neutrazen™ (Innovations), ECM-Protect™ (Atrium Innovations), Timp-Peptide™ or ECM Moduline™ (Infinitec Activos).

Méthode de traitement cosmétique

La présente invention propose également une méthode de traitement cosmétique d'amélioration de l'état général de la peau, comprenant l'application topique sur la peau et/ou les phanères d'une quantité efficace d'une composition selon l'invention telle que définie ci-dessus.

La composition selon l'invention peut être appliquée localement sur les zones du visage, des lèvres, du cou, du décolleté, des mains, des pieds, ou du corps. L'un des grands avantages de la présente invention réside dans la possibilité de pouvoir procéder, chaque fois que nécessaire ou souhaitable, à des traitements "doux" localisés et sélectifs grâce au mode d'application par voie topique, non invasif. Dans le cas d'une utilisation anti-rides par exemple, l'application peut être réalisée de manière très localisée à l'aide d'une seringue ou d'une microcanule.

Il est aussi toutefois possible d'envisager une composition comprenant l'extrait selon l'invention destinée à être injectée en sous-cutané.

Selon d'autres particularités, le procédé de traitement cosmétique selon l'invention avec un ou plusieurs autres procédés de traitement visant la peau, comme par exemple les traitements par luminothérapie, par la chaleur ou par aromathérapie.

Selon l'invention, il est possible de proposer des dispositifs à plusieurs compartiments ou kits destinés à la mise en oeuvre du procédé décrit ci-dessus, et qui pourrait comprendre, à titre d'exemple, et sans que ce soit limitatif, dans un premier compartiment une composition contenant

l'extrait de l'invention et dans un second compartiment une composition contenant un autre actif et/ou excipient, les compositions contenues dans lesdits premier et second compartiments étant ici considérées comme composition de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps notamment dans l'un des traitements définis ci-dessus.

- 5 Pour une application cosméceutique ou pharmaceutique, la composition selon l'invention se trouve sous une forme adaptée pouvant être ingérée.

Le procédé de traitement selon l'invention est plus particulièrement adapté à prévenir et/ou traiter le vieillissement cutané en stimulant les réactions de détoxification et/ou la régénération cellulaire grâce à une réponse de type hormétique, notamment pour améliorer l'éclat et/ou la transparence du
 10 teint, pour prévenir et/ou traiter les peaux sensibles et/ou réactives, pour prévenir et/ou traiter les rougeurs et/ou pour prévenir la glycation des protéines.

A) Exemple d'obtention d'un extrait d'origine végétal selon l'invention par culture cellulaire indifférenciée de *Globularia cordifolia*

1) Création d'une lignée cellulaire

- 15 Des plants de *Globularia cordifolia* sont obtenus à partir de graines.

Des feuilles sont prélevées qui après nettoyage et rinçage à l'eau sont décontaminées puis à nouveau rincées.

a) Etape d'induction de cellules indifférenciées ou cals

- Des morceaux de feuilles sont découpés et posés à la surface d'une gélose nutritive, contenant une
 20 source de carbone assimilable, une solution de micro et macroéléments et une combinaison hormonale et vitaminique adaptée. Ce milieu nutritif, par sa composition, va déclencher la production d'amas de cellules indifférenciées appelés cals au site de cicatrisation de la feuille.

Composition du milieu nutritif solide utilisé (selon Gamborg) : solution de macro éléments, micro éléments, saccharose, plante agar, hormones végétales et vitamines.

- 25 Le pH est ajusté entre 5,5 et 6.

On fera par la suite référence à ce milieu en l'appelant « milieu de base ».

Cette étape d'induction dure de 1 à 4 mois. La culture se fait à 25°C et à l'obscurité.

b) Etape de stabilisation et de sélection des cultures en milieu gélosé.

- La stabilisation des cals est obtenue après des repiquages successifs, toutes les 3 semaines, sur du
 30 milieu neuf. Elle permet d'obtenir des cultures homogènes de par leurs caractéristiques phénotypiques (couleur, friabilité, prolifération) et stables.

La sélection consiste à choisir les meilleures cultures pour le transfert en milieu liquide, parmi les dizaines initiées précédemment. Les lignées retenues sont caractérisée par une forte croissance, une texture tendre et friable, une couleur homogène, une bonne dispersion en milieu liquide et une
 35 stabilité de ces paramètres au cours des repiquages.

Cette étape dure de 6 mois à 1 an.

c) Transfert en milieu liquide et optimisation de la production des métabolites secondaires

Les lignées retenues sont transférées en milieu liquide en vue d'optimiser dans un premier temps leurs paramètres de croissance.

- 5 La croissance cellulaire et l'appréciation des différentes phases (latence, exponentielle, stationnaire) sont évaluées par la mesure régulière du pourcentage du volume de la culture occupé par les cellules ou « packed cell volume » (PCV).

Différentes suspensions issues des cals sont placées sur une table orbitale, agitées à 110 rpm, à l'obscurité, à 25°C (dans des erlens contenant chacun 100 ml de milieu et 10 grammes de cals homogènes en texture, couleur et croissance). Plusieurs milieux et combinaisons hormonales sont testés et comparés, en vue d'optimiser la courbe de croissance. On cherche également à optimiser la densité initiale de l'inoculum pour diminuer la phase de latence et donc le temps global de la culture.

En final, le milieu retenu est le milieu de base pour avoir un milieu liquide. Par ailleurs, la densité initiale retenue pour l'inoculum correspond à un PCV de 10%.

L'étape suivante consiste à déterminer les conditions de milieu optimales pour orienter le métabolisme cellulaire vers la production des métabolites secondaires à la fin de la phase de croissance de la culture. Ces métabolites secondaires, ainsi que les autres composants du milieu extrait, participeront à l'activité de l'extrait obtenu en final.

20 Ainsi, dans le milieu, il a pu être identifié une forte proportion de molécules polaires, notamment des sucres, amino-acides, métabolites primaires, dérivés de l'acide cinnamique et caféique et mélange de phénylétanoïdes glycosides. Ces derniers ont été choisis comme indicateurs de la production par la biomasse des métabolites secondaires, leur dosage total pouvant être réalisé aisément par la méthode d'Arnou, méthode spectrophotométrique basée sur l'oxydation des polyphénols totaux en milieu alcalin par le nitrite de sodium et le molybdate de sodium (lecture à 510 nm). D'autres classes de molécules sont supposées être présentes dans le milieu, comme des irridioïdes ou des flavonoïdes mais n'ont pu être mises en évidence. Il va de soi que c'est l'ensemble de ces molécules qui sera responsable de l'activité de l'extrait final.

L'éllicitation choisie selon l'invention pour conduire à la production de métabolites secondaires consiste ensuite à placer les cellules dans un milieu appauvri en saccharose et en macroéléments, de préférence dans les mêmes proportions (avec un ratio 1 :1).

Cette phase de transfert en milieu liquide et d'optimisation des paramètres de croissance et de production peut durer de 6 mois à 1 an.

A l'issue de cette étape, une lignée donnant les meilleurs résultats a été sélectionnée.

35 Elle fait l'objet d'un dépôt auprès de DSMZ sous la référence d'identification du déposant E68.

2) Obtention de l'extrait

a) Réalisation de précultures en bioréacteur

Des précultures successives de la lignée cellulaire sélectionnée de 1 litre, puis de 5 litres, puis de 25
5 litres et enfin de 100 litres sont réalisées. Chacune estensemencée à 10% de PCV et cultivée
ensuite jusqu'à 50% de PCV. La biomasse cellulaire ainsi produite est utilisée pour ensemencer la
culture de taille supérieure. Cette étape peut durer de 1 à 3 mois.

b) Passage en bioréacteur comprenant la phase d'élicitation

Un bioréacteur à sac à usage unique de 600 litres (volume nominal) est alorsensemencé entre 5 et
10 20% de PCV.

Le bioréacteur est équipé :

- d'un système de bascule (rocker) permettant l'agitation et l'oxygénation des cellules et
régulant la température de la culture ; choisi de préférence car plus adapté à la fragilité des
cellules végétales par rapport à l'agitation cisaillante d'un bioréacteur classique ;
- 15 - d'une tour de contrôle munie de différentes sondes (oxygène, pH et température),
permettant la programmation des étapes de la culture ;
- d'une poche stérile à usage unique pour la culture des cellules, munie de différentes sondes
(pH, oxygène), d'un filtre pour l'apport de gaz et de systèmes d'échange pour prélèvement
ou inoculation stériles de liquides.

20 Après 10 à 15 jours de culture dans le bioréacteur, on atteint un PCV d'environ 30 à 45%. Le
milieu carencé est alors ajouté pour déclencher la production des métabolites secondaires, ici
notamment les phénylétanoïdes glycosides. L'ajout de milieu frais représente 10 à 50% du volume
final de la culture. Après 3 à 5 jours, la culture est arrêtée, à 35-50% de PCV, les phénylétanoïdes
glycosides se trouvant alors autour de 2 grammes par litre dans la culture.

25 L'ensemble de cette phase en bioréacteur se déroule sur 2 à 3 semaines.

c) Récupération de l'extrait

L'étape suivante va conduire à l'obtention d'un extrait aqueux et clarifié.

Intervient une lyse cellulaire, conduisant à la libération des métabolites secondaires dans la phase
liquide. Cette lyse s'effectue par acidification. Une cascade de filtrations est ensuite réalisée, la
30 première en profondeur, suivi d'une filtration stérilisante, permettant d'obtenir l'extrait aqueux
selon l'invention. Cette étape permet de stabiliser l'extrait.

L'extrait obtenu ici par culture végétale est limpide, incolore à jaune pâle, au contraire de l'extrait
de plante « classique » qui lui est jaune vif, ce qui est un avantage indéniable pour une formulation
subséquente directe de l'extrait en un ingrédient cosmétique ou autre.

Il va de soi que des variantes de ce procédé existent, notamment :

- 1) Concernant l'extraction des molécules d'intérêt :
 - L'étape de lyse cellulaire peut être réalisée par un traitement thermique de la biomasse ; par exemple par l'injection de vapeur dans la biomasse. Elle peut aussi se faire par un broyage des cellules à l'aide de microbilles.
 - Après l'étape de lyse cellulaire, il est possible de purifier l'extrait brut obtenu, afin de l'enrichir en molécules d'intérêt. Pour cela la biomasse est d'abord éliminée par filtration ou centrifugation. La phase liquide clarifiée résultante est ensuite mise en contact avec une résine adsorbante, sélectionnée pour son affinité avec les molécules d'intérêt. Cette résine est ensuite chargée dans une colonne de chromatographie en verre. La résine est éluée avec des mélanges appropriés et le produit de l'éluion concentré.
 - La récupération de l'extrait selon l'invention peut être réalisée à l'aide de liposomes.
- 2) Concernant le mode d'élicitation des molécules d'intérêt :
 - L'élicitation des composés d'intérêt peut se faire également par l'addition à la culture de fractions microbiennes ; l'addition à la culture de molécules d'origine biologique comme par exemple, le chitosan, le méthyljasmonate, l'acide jasmonique, l'acide salicylique ; l'addition à la culture de molécules d'origine non biologique comme par exemple le paclobutrazol ; l'application à la culture d'une variation de température ; l'application à la culture d'une variation de pH ; l'application à la culture d'un stress osmotique induit par un sucre non métabolisable, comme par exemple le mannitol ; le recours à un appauvrissement encore plus drastique du milieu en macroéléments et sucre ; l'addition à la culture de résines adsorbantes qui en plus d'éliciter la production des composés d'intérêt pourront les piéger.
- 3) A la place de l'étape de création de la lignée cellulaire, on peut utiliser une lignée cellulaire selon l'invention déjà préparée et conservée. Dans ce cas, l'étape de création de la lignée cellulaire est remplacée par une étape classique d'amplication des cellules végétales indifférenciées à partir de ladite lignée cellulaire existante d'abord en milieu gélosé puis en milieu liquide.

Il va de soi également que le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre pour d'autres espèces de *Globularia*.

B) Exemple de formulation d'une composition selon l'invention formant un « ingrédient actif », matière première pour l'industrie des cosmétiques

L'ingrédient actif est une composition selon l'invention contenant l'extrait d'origine végétal de *Globularia cordifolia* selon l'invention solubilisé dans une matrice formant un milieu

physiologiquement acceptable. Cet ingrédient actif est destiné à l'industrie cosmétique pour la préparation de produits cosmétiques, crèmes, gels, etc. (voir les exemples de galénique donnés plus loin).

- 5 L'extrait aqueux obtenu selon l'exemple A) ci-dessus peut préférentiellement être mélangé à hauteur de 20 à 80% à toute matrice de nature hydrophile comme un gel, un tampon aqueux, de la glycérine ou tout autre polyol à chaîne courte physiologiquement acceptable.

A titre d'exemple, et pour la description des tests et de la galénique un extrait à 33% a été préférentiellement réalisé.

- 10 Il va de soi que l'on peut également utiliser à titre d'ingrédient actif un extrait pur, sans excipient.

C) Évaluations *in vitro* et *ex-vivo*

L'extrait de *Globularia* selon l'invention présente un certain nombre d'effets remarquables présentés ci-dessous.

- 15 Un extrait aqueux préparé selon l'exemple B) ci-dessus à hauteur de 33% a été testé *in vitro* et a montré des activités cosmétiques variées, touchant à plusieurs secteurs de la physiologie de la peau. Les essais ont tous été réalisés avec 2% d'un tel extrait de *Globularia cordifolia*.

Tests comparatifs

- La supériorité de l'extrait obtenu par culture cellulaire sur un extrait hydroalcoolique de la plante entière a été montrée dans un premier temps. Ces premiers essais ont été réalisés en comparant
20 l'extrait de *Globularia cordifolia* selon B) ci-dessus (33% d'extrait selon l'invention) dilué à 2% contre l'extrait hydroalcoolique de plante entière à concentration en phényléthanoïdes glycosides équivalente.

1) Glycation non enzymatique de la BSA

- Ce test simple reproduit *in vitro* un stress auquel sont soumises régulièrement les protéines de la
25 peau : leur altération fonctionnelle par un phénomène de glycation non enzymatique.

Le modèle d'étude retenu est une albumine bovine (BSA), qui est mise en contact avec un sucre réducteur physiologique, le fructose, donnant une réaction spontanée et lente entre les 2 molécules, pouvant être accélérée par la température.

- Dans ce test, la BSA et le fructose sont incubés en présence ou non des produits à tester à 50°C
30 pendant 7 jours. Les produits finaux de la glycation présentent une fluorescence naturelle que l'on peut quantifier au fluorimètre ($\lambda_{ex} = 360\text{nm}$ et $\lambda_{em} = 460\text{nm}$).

L'aminoguanidine à 0.03% est utilisée comme témoin positif d'inhibition de la glycation.

Données dans le tableau 1 ci-après.

Tableau 1 :

Inhibition de la glycation	% de variation par rapport au contrôle
Extrait de plante	+8% (dns*)
Extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	-64% (p<0.01)

*: dns = données non significatives

Le témoin positif donne une inhibition de la glycation de -85% par rapport au contrôle.

2) Test antiradicalaire du DPPH

- 5 Le DPPH (1,1-diphényl-2-picryl hydrazyl) est un radical libre stable qui est très utilisé pour la détection des piègeurs de radicaux libres. Cette molécule en perdant son caractère radicalaire est convertie en DPPH2 (1,1-diphényl-2-picryl hydrazine). Cette conversion s'accompagne d'une décoloration (violet → jaune) qui peut être suivie dans le temps en spectrophotométrie à 517nm.

Le contrôle ne présentant pas d'activité antiradicalaire garde une DO constante. L'acide caféique à

- 10 0.003% est utilisé comme témoin positif d'activité antiradicalaire.

Données dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 :

Activité anti-radicalaire	% de variation par rapport au contrôle
Extrait de plante	-1% (dns)
Extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	+53% (p<0.01)

Le témoin positif donne une activité anti-radicalaire de +85% par rapport au contrôle.

3) Test anti Oxygène singulet

- 15 L'oxygène moléculaire (O₂) joue un rôle vital comme accepteur terminal des électrons de la chaîne respiratoire. Cependant, ce métabolisme et d'autres, ainsi que des facteurs externes, tel les UV, entraînent l'apparition de certains dérivés particulièrement réactifs (oxygène singulet, radical hydroxyl, anion superoxyde), qui vont causer des dommages oxydatifs aux lipides, protéines et acides nucléiques, et cela même dans les organismes sains. L'oxygène singulet est une de ces
- 20 formes très énergétiques et très réactives de l'oxygène. Il est possible expérimentalement de produire *in vitro* de l'oxygène singulet à l'aide de colorants et de photons UVA ou de lumière visible. Le test présenté ici utilise le Rose Bengale, un colorant et la lumière visible.

Le but de ce test est d'évaluer la dégradation de l'acide urique par l'oxygène singulet formé à partir du Rose Bengale, sous action de la lumière visible. La visualisation de la production d'oxygène

25 singulet est obtenue en suivant la destruction de l'acide urique à 292 nm. En présence d'un composé capable de neutraliser l'oxygène singulet, cette destruction sera ralentie.

L'acide caféique à 0.002% est utilisé comme témoin positif d'activité antioxygène singulet.

Données dans le tableau 3 ci-après.

Tableau 3 :

Activité anti-oxygène singulet	% de variation par rapport au contrôle
Extrait de plante	+14% (dns)
Extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	+33% (p<0.01)

Le témoin positif donne une activité anti-oxygène singulet de +73% par rapport au contrôle.

- 5 Ces 3 tests montrent l'intérêt cosmétique de l'extrait obtenu par culture cellulaire, qui par ailleurs présente une efficacité bien supérieure à l'extrait hydroalcoolique obtenu à partir de la plante.

Tests sur l'extrait d'origine végétale selon l'invention

Protection de kératinocytes en culture par l'extrait selon l'invention face à un double stress, mécanique et oxydatif

- 10 Des tapis confluents de kératinocytes ont été mis en contact (test) ou non (contrôle) avec l'extrait selon l'invention à 2% dans un milieu de culture pendant 24 heures. Les tapis ont ensuite été « blessés » de façon reproductible et exposés immédiatement après aux UVB afin d'estimer leur capacité à résister à deux stress fréquemment subis par la peau. La récupération des tapis cellulaires a ensuite été évaluée par analyse d'image, en quantifiant la surface exempte de cellules (résultats dans le tableau 4 ci-après).

15 Tableau 4 :

		Surface de la cicatrice (en Unités Arbitraires)		% de la surface blessée recolonisée à T48 heures
		T0	T48 heures	
Kératinocytes ; n=9	Contrôle	43.3 +/- 7.1	19.8 +/- 11.3	54.3 %
	Extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	40.4 +/- 9	2.9 +/- 6.6	92.8 %

- 20 Les observations visuelles ont montré que les tapis contrôles ont subi une altération profonde de leur intégrité (avec de la mortalité cellulaire) et ont beaucoup de difficulté à recoloniser les surfaces blessées. Au contraire, les tapis ayant été au contact de l'extrait de culture végétale de *Globularia cordifolia* présentent moins d'altération et reforment une couche dense et uniforme plus rapidement.

Ce test préliminaire illustre bien le phénomène hormétique à l'œuvre en présence de l'extrait selon l'invention. On peut penser que le pré-contact des cellules avec l'extrait a permis la mise en place d'un certain nombre de ligne de défense, antioxydante notamment, avant le stress,

dont les cellules se sont servies ensuite pour contrer les effets délétères du stress et régénérer un tapis cellulaire normal.

- Cet effet hormétique de l'extrait de *Globularia cordifolia* a été démontré et quantifié *in vitro* par l'étude des 3 axes distincts suivants (4 à 6).

4- Préservation des progéniteurs de l'épiderme

Principe

- L'épiderme se régénère sans cesse afin de produire une barrière cutanée efficace. Ce phénomène ralentit avec l'âge. Les cellules à l'origine de ce processus s'appellent les cellules souches ou progéniteurs. Elles sont rares mais conservent leur potentiel de régénération grâce aux liens qui les unissent à leur environnement immédiat et à la nature de cet environnement.

- Des traitements nocifs, comme par exemples les oxydants, vont modifier l'environnement de ces cellules, les faire évoluer vers un phénotype différent et ainsi provoquer un affaiblissement de leur capacité ultérieure à proliférer. *In vitro* ces cellules ayant perdu leur capacité proliférative forment des colonies de tailles modestes, voire invisibles à l'œil nu, les cellules filles retrouvées dans ces colonies étant de taille relativement grande. A l'opposé, les cellules de type progéniteur sont capables de se multiplier fortement, afin de régénérer la peau, et donnent des colonies plus grandes, visibles à l'œil nu, et des cellules de petites tailles. On estime ce potentiel de régénération, et donc la richesse en progéniteurs d'une population cellulaire, par la méthode de l'efficacité de clonage. Cette méthode consiste, à partir d'un ensemencement cellulaire à faible densité et après un certain temps de culture, à compter le nombre de colonies visibles à l'œil nu. Le nombre obtenu permet d'apprécier la vigueur progénitrice de la population cellulaire de départ.

- Des kératinocytes humains progéniteurs de l'épiderme à confluence ont été mis en contact d'un milieu optimisé pour forcer leur transformation vers un état de kératinocyte différencié (et ainsi leur faire perdre leur phénotype progéniteur), en présence ou en absence de l'extrait de *Globularia cordifolia*. A l'issue de ce contact, les cellules des 2 séries sont repiquées à raison de 1000 cellules / 25cm² (n=5) dans le seul milieu différenciateur.

Résultats

- Après 12 jours de culture, le nombre et la taille des colonies peuvent être estimés après fixation et coloration préalables. Les résultats montrent que les cas contrôles présentent un nombre de colonies de 5,4 +/- 1,5 / 1000 cellulesensemencées, ces colonies ont une taille modeste. En parallèle le contact avec l'extrait de *Globularia cordifolia* fournit 2,3 fois plus de colonies (12,6 colonies +/- 4,3 / 1000 cellulesensemencées ; $p < 0,01$) que le contrôle, ces colonies étant de plus grande taille. Ceci indique que l'extrait de *Globularia cordifolia* prévient le passage au stade différencié et maintient les capacités prolifératives des progéniteurs. Il préserve de la sorte la capacité de l'épiderme à se régénérer.

5- Stimulation du potentiel énergétique

a. Sirtuin 1

Des phénomènes hormétiques telle la restriction calorique ou le contact avec des molécules hormétiques activent l'expression d'une famille de gènes, les Sirtuins qui contribuent à augmenter la longévité de différents organismes. Les Sirtuins agissent notamment sur la déacétylation du facteur FOXO et évitent qu'il ne déclenche la fabrication de protéines apoptotiques. Les Sirtuins stimulent par ailleurs les défenses anti-oxydantes et purificatrices (détoxifiantes) de la cellule et permettent ainsi la préservation des fonctionnalités mitochondriales et donc de la production d'énergie. Ceci augmente la survie et la résistance aux stress.

- 10 Des kératinocytes humains ont été cultivés en présence ou en l'absence de l'extrait de *Globularia cordifolia* pendant 6 jours, puis ont été broyés, et la quantité intracellulaire de Sirtuin-1 a été évaluée par une méthode ELISA. En parallèle, un dosage protéique (BCA) a permis de normaliser les résultats (donnés dans le tableau 5 ci-après).

Tableau 5 :

		Sirtuin-1 (ng/mg protéine).	% Variation ; significativité
Kératinocytes ; n=5	Contrôle	2,10 ± 0,58	Référence
	Extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	3,65 ± 0,33	+74% <i>p</i> <0,01

- 15 Contrôle positif Trolox à 500µm : +27%, *p*<0,05.

En parallèle, des explants de peau abdominale (femme ; 58ans) ont reçu 1 application topique par jour pendant 6 jours d'une crème contenant l'extrait de *Globularia cordifolia* selon l'invention ou son placebo (test *ex vivo*).

- 20 A l'issu de ce traitement, les explants ont été préparés et marqués à l'aide d'anticorps fluorescents pour évaluer la quantité de Sirtuin-1. La quantification a été faite à l'aide d'un système d'analyse d'image après prise de photos (50 photos / cas). Les résultats sont donnés dans le tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6 :

		Sirtuin-1 (Intensité Fluorescence).	% Variation ; significativité
Explants de peau ; n=5	Placebo	10,94 ± 2,40	Référence
	Extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	12,23 ± 2,80	+12% <i>p</i> <0,03

b. Créatine kinase

- 25 La créatine kinase est une enzyme ubiquitaire dont il existe deux isoformes dans la peau. Elle sert à stocker de l'énergie dans les cellules et à permettre aux tissus de faire face à une demande urgente en énergie.

La créatine est transformée par cette enzyme en phosphocréatine grâce à un ATP qui repasse sous la forme ADP. En cas de besoin, l'enzyme travaille à l'envers et restitue l'énergie. Son activité baisse avec l'âge car cette enzyme est l'une des cibles privilégiée des espèces réactives de l'oxygène. Son maintien et l'augmentation de son activité sont donc à favoriser.

- 5 Des fibroblastes humains dermiques ont été mis au contact de l'extrait de *Globularia cordifolia* selon l'invention pendant 3 jours puis les cellules ont été exposées, en l'absence dudit extrait, à un stress oxydant (peroxyde d'hydrogène). Après 3j de contact supplémentaire avec l'extrait de *Globularia cordifolia*, les cellules sont à nouveau exposées avec le même stress oxydant avant d'être broyées pour doser l'activité créatine kinase intracellulaire. Le dosage de l'activité utilise la
- 10 synthèse de l'ATP à partir de phosphocréatine et d'ADP. *In fine* l'ATP est dosé par une réaction enzymatique aboutissant à du NADPH, lu à 340nm.

Un dosage de protéines totales (BCA) a permis de normaliser les résultats (donnés dans le tableau 7 ci-après).

Tableau 7 :

		Activité Créatine kinase (U/mg protéine)	% Variation ; significativité	
Fibroblastes; n=5	Contrôle sans H ₂ O ₂	0,307 ± 0,020	Référence 1	-
	Contrôle avec H ₂ O ₂	0,247 ± 0,030	-19% ; $p < 0.02$	Référence 2
	H ₂ O ₂ et extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	0,381 ± 0,055	-	+54% ; $p < 0,01$

15

Contrôle positif Trolox à 500µm : +28%, $p < 0,05$.

- Les explants ayant déjà été utilisés pour les Sirtuin-1 ont été marquées à l'aide d'anticorps fluorescents pour évaluer la quantité de Créatine Kinase mitochondriale épidermique. La
- 20 quantification a été faite à l'aide d'un système d'analyse d'image après prise de photos (50 photos / cas). Les résultats sont donnés dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8 :

		Créatine Kinase mitochondriale (Intensité Fluorescence).	% Variation ; significativité
Explants ; n=5	Placebo	7,62 ± 1,70	Référence
	Extrait de <i>Globularia cordifolia</i> selon l'invention	10,81 ± 2,30	+42% $p < 0,01$

c. Potentiel membranaire mitochondrial

La mitochondrie est un site majeur de la formation des espèces oxygénées réactives qui au fil du temps perturbent le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Il en résulte une baisse du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi$) qui va entraîner une réduction de la production d'ATP.

- 5 La chute de ce potentiel membranaire est un signe avant-coureur de la sénescence et de la mort cellulaire. Il est donc primordial de préserver ce potentiel membranaire pour conserver à la mitochondrie ses capacités à fabriquer de l'ATP.

- 10 Le potentiel membranaire a été estimé à l'aide d'une sonde membranaire spécifique sensible aux micro-variations protoniques mitochondriale. Elle possède deux formes, une monomérique et une polymérique, qui n'ont pas le même spectre d'émission en fluorescence. Un potentiel de membrane élevé favorise la forme polymérique. L'augmentation du ratio monomère/polymère (520nm/590nm) traduit donc une baisse de $\Delta\Psi$.

Ainsi, une valeur élevée de ce ratio est moins favorable à la survie de la cellule qu'une valeur plus faible.

- 15 Les mêmes cultures de fibroblastes dermiques que celles utilisées pour la créatine kinase ci-dessus ont été employées. Les résultats sont donnés dans le tableau 9 ci-après.

Tableau 9 :

		Ratio	% Variation* ; significativité	
Fibroblastes; n=5	Contrôle sans H ₂ O ₂	6,15 ± 1,33	Référence 1	-
	Contrôle avec H ₂ O ₂	8,13 ± 1,12	-32% ; $p < 0,01$	Référence 2
	H ₂ O ₂ et extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	4,89 ± 0,57	-	+40% ; $p < 0,01$

Contrôle positif Trolox à 500µm : +36%, $p < 0,05$.

(*) Variation : % = $100 \times [(Contrôle - Extrait de Globularia cordifolia) / Contrôle]$

- 20 L'amélioration du potentiel membranaire est donc très net grâce à l'extrait de *Globularia cordifolia* selon l'invention (+40%, $p < 0,01$).

- Cette étude complète les deux études précédentes pour montrer la capacité de l'extrait de *Globularia cordifolia* selon l'invention en tant que prévention anti-âge. Il stimule de façon spontanée la quantité de Sirtuin1. Il maintient l'activité de la créatine kinase et protège la fabrication d'ATP, en réponse à un stress oxydatif.
- 25

6- Lutte contre les produits nocifs

a. Peroxydes endogènes

- Un des indicateurs classiquement utilisés pour apprécier la vitalité d'une population cellulaire est son niveau de stress oxydant. Ce facteur peut être évalué de façon fiable grâce à une sonde appelée DCFH-DA, dont la particularité est de fluorescer au contact des peroxydes une fois qu'elle est entrée dans la cellule.
- 30

Protocole

Des kératinocytes humains à confluence ont été mis ou non (contrôle négatif) au contact avec l'extrait de *Globularia cordifolia* pendant 24 heures jusqu'à obtenir une confluence. A ce stade, ces cellules reçoivent et métabolisent la sonde DCFH mise dans un tampon, la sonde peut alors réagir avec les peroxydes intracellulaires. Le milieu est alors remplacé par un milieu contenant ou non l'extrait de *Globularia cordifolia* et l'agent oxydant modèle peroxyde d'hydrogène (ni le milieu ni l'extrait de *Globularia cordifolia* ne réagissent directement avec H_2O_2). Une lecture de fluorescence est effectuée pour estimer le niveau de peroxyde intracellulaire ayant réagi avec la sonde. Une quantification du nombre de cellules est réalisée par une méthode de marquage de noyau (Hoechst 33258). Les résultats sont donnés dans le tableau 10 ci-après.

Tableau 10 :

		Peroxyde intracellulaires (UFA/ 10^3 cells)	% Variation ; significativité	
Kératinocytes ; n=5	Contrôle non peroxydé	$37,3 \pm 2,2$	Référence 1	-
	Contrôle négatif avec H_2O_2	$1099 \pm 24,0$	X29 ; $p < 0,01$	Référence 2
	H_2O_2 et extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	$137 \pm 4,0$	-	-88% ; $p < 0,01$

UFA : Unités fluorescence arbitraires ; Contrôle positif Trolox à $500\mu\text{m}$: -91%, $p < 0,01$.

L'extrait de *Globularia cordifolia* selon l'invention permet de préserver le contenu intracellulaire de l'augmentation des peroxydes induite par le peroxyde d'hydrogène. Ce résultat traduit une réduction des dégâts générés par des agents radicalaires ou des espèces oxygénées réactives, suite au stress oxydatif, en présence de l'extrait de *Globularia cordifolia*.

b. SOD et Catalase

Les enzymes antioxydantes telles que la catalase ou la SOD, produites par notre organisme, tout comme les antioxydants, vitamines E et C, caroténoïdes,... qui sont puisés dans notre alimentation, aident à lutter contre les effets délétères des radicaux libres et des espèces réactives oxygénées. Il y a donc un intérêt clair à en accroître leur quantité en stimulant leur synthèse.

Un essai préliminaire portant sur le potentiel antioxydant cutané a permis de constater que des kératinocytes humains traités avec le peroxyde d'hydrogène, modèle de stress oxydatif, ont vu leur activité intracellulaire en SOD (superoxyde dismutase) augmenter de +22%* ($p < 0,01$) par rapport au contrôle négatif, en présence de l'extrait de *Globularia cordifolia*.

* Contrôle positif Trolox à 0,012% : SOD +21%, $p < 0,01$.

Par ailleurs, des explants de peau abdominale (femme ; 58 ans) ont reçu 1 application topique par jour pendant 6 jours d'une crème contenant l'extrait de *Globularia cordifolia* ou son placebo.

A l'issue de ce traitement, les explants ont été préparés et marqués à l'aide d'anticorps fluorescents anti-SOD d'une part ou anti-Catalase d'autre part. La quantification a été faite à l'aide d'un

système d'analyse d'image après prise de photos (50 photos / cas). Les résultats sont donnés dans les tableaux 11 et 12 ci-dessous.

Tableau 11 :

		SOD (Intensité Fluorescence).	% Variation ; significativité
Explants de peau; n=5	Placebo	6,31 ± 2,00	Référence
	Extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	8,58 ± 1,40	+36% <i>p</i> <0,01

Tableau 12 :

		Catalase (Intensité Fluorescence).	% Variation ; significativité
Explants de peau; n=5	Placebo	6,87 ± 2,90	Référence
	Extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	12,24 ± 3,70	+78% <i>p</i> <0,01

- 5 L'extrait de *Globularia cordifolia* permet donc de stimuler la production de SOD et de la Catalase, indépendamment de tout stress. Ces stimulations « spontanées », retrouvées dans l'Hormésis, permettent à la peau de préparer des défenses appropriées contre des stress pouvant subvenir ultérieurement.

c. Protéasome et glycation

- 10 Les protéines endommagées par les glycations, oxydations (protéines carbonylées) ou conjugaisons avec les peroxydes lipidiques, tendent à s'accumuler dans la cellule lors du vieillissement. Leur élimination est assurée en routine par le protéasome qui limite leur effet néfaste pour l'homéostasie cellulaire. Cependant l'activité du protéasome diminue du fait même de ces accumulations de molécules oxydées, de celle de la lipofuscine, un déchet lipoprotéique, ou avec le temps,
- 15 provoquant ainsi par effet retour une augmentation des protéines endommagées.
- Le maintien de l'activité du protéasome est une des conséquences positives de l'hormésis car il complète l'arsenal des défenses anti-âges de la cellule. Il permet d'éliminer les déchets qui en s'accumulant provoquent la fabrication de produits pré-inflammatoires et qui de plus, opacifient les cellules.
- 20 Des fibroblastes humains dermiques ont été mis ou non (contrôle négatif) au contact de l'extrait de *Globularia cordifolia* selon l'invention jusqu'à confluence. L'extrait de *Globularia cordifolia* est alors retiré et les cellules sont mises au contact avec le peroxyde d'hydrogène, afin de créer un vieillissement accéléré. Après cette étape, les cellules reçoivent ou non l'extrait de *Globularia cordifolia* pendant 3j puis sont repiquées et subissent à nouveau un stress oxydatif pour amplifier
- 25 l'effet du premier stress.
- Les cellules sont alors broyées et l'activité résiduelle du protéasome est évaluée en suivant le clivage d'un peptide modèle fluorescent. Un dosage de protéines est effectué en parallèle pour normaliser les résultats (donnés dans le tableau 13 ci-après).

Tableau 13 :

		Activité du protéasome (UFA/ μ g protéines)	% Variation ; significativité	
Fibroblastes ; n=5	Contrôle non peroxydé	1,138 $\pm$ 0,15	Référence 1	-
	Contrôle avec H ₂ O ₂	0,342 $\pm$ 0,04	-70% <i>p</i> <0,01	Référence 2
	H ₂ O ₂ et extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	0,538 $\pm$ 0,11		+57% ; <i>p</i><0.01

UFA : Unités de fluorescence arbitraires ; Contrôle positif Trolox à 500 μ m : +24%, *p*<0,05.

- 5 L'effet anti-glycation de l'extrait de *Globularia cordifolia* selon l'invention a été évalué à l'aide d'une protéine modèle, la BSA, et d'un sucre réducteur naturel : le fructose qui se lie à la protéine de façon non enzymatique. Le produit de cette liaison est fluorescent, détectable par un fluorimètre. Les résultats sont donnés dans le tableau 14 ci-dessous.

Tableau 14 :

		Glycation (Intensité Fluorescence).	% Variation ; significativité
Protéine modèle BSA; n=4	Contrôle	21206 $\pm$ 140	Référence
	Extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	7668 $\pm$ 121	-64% <i>p</i> <0,01

Contrôle positif aminoguanidine à 0,03% : -85%, *p*<0,01.

d) Glutathion

- 10 En plus de son rôle antioxydant très connu, le glutathion est l'élément de désintoxication le plus important de l'organisme et le principal agent de la bonne santé de l'organisme. Il se lie à des toxines comme les métaux lourds, les solvants et les pesticides et les transforme en composés hydrosolubles susceptibles d'être facilement éliminés dans la bile ou les urines.

- 15 La synthèse de glutathion a été stimulée de façon spontanée chez le kératinocyte en présence de l'extrait de culture végétale de *Globularia cordifolia* : +49%* (*p*<0,01) par rapport au contrôle négatif, n'ayant pas reçu l'extrait.

* Contrôle positif Trolox à 0,012% : GSH : +53% (*p*<0,01)

- 20 L'effet de type hormétique (« hormesis-like ») de l'extrait suivant l'invention a ainsi été montré notamment dans 3 directions :

- par un renforcement direct des molécules et voies métaboliques qui contribuent à rendre les cellules plus réactives face à un stress ultérieur (sirtuins, SOD, catalase, glutathion) ;

- par une protection directe du potentiel énergétique de la cellule et de son intégrité face à un stress oxydatif (créatine kinase, potentiel mitochondrial, protéasome, niveau de peroxydes ou de protéines glyquées) ; et
- par le maintien des capacités de régénération de l'épiderme, en favorisant le phénotype progéniteur et donc prolifératif chez les cellules en charge de cette fonction.

D) Galénique

Ingrédient actif selon l'invention :

Formule contenant l'extrait aqueux de *Globularia cordifolia* selon l'invention définie à l'exemple B) ci-dessus (à 33%).

- 10 Différentes formulations sont décrites ci-après avec ou sans ingrédients actifs cosmétiques additionnels, ces derniers venant le cas échéant en soutien et/ou en complément de l'activité de l'ingrédient actif selon l'invention. Ces ingrédients peuvent être de toute catégorie selon leur(s) fonction(s), le lieu d'application (corps, visage, cou, buste, mains, etc.), l'effet final recherché et le consommateur ciblé, par exemple anti-âge, anti-rides, hydratant, anti-cernes, raffermissant,
- 15 éclaircissant, anti-glycation, anti-tâches, amincissant, apaisant, myo-relaxant, anti-rougeurs, anti-vergétures, etc.

Exemple 1 : Forme crème de jour pour le visage

Ingrédients	Noms INCI	% en masse
Phase A		
H ₂ O	Water	Qsp100
Ultrez 10	Carbomer	0,25
Phase B		
Butylène glycol	Butylene glycol	2,00
Phenoxyethanol	Phenoxyethanol	qs
Phase C		
Brij S2/Volpo S2	Steareth-2	0,40
Brij S10/Volpo S 10	Steareth-10	1,20
Crodafos CES	Cetearyl alcohol & Dicetyl phosphate & Ceteth 10 phosphate	4,00
Crodacol CS 90	Cetearyl Alcohol	1,00
Laurocapram	Azone	2,50
DC 345	Cyclohexasiloxane & Cyclopentasiloxane	2,00
Crodamol OSU	Ethylhexyl succinate	7,00
Phase D		
Sorbate de potassium	Potassium Sorbate	0,10
Phase E		
H ₂ O	Water	3,00
NaOH 30 %	Sodium Hydroxide	0,40
Phase F		
Ingrédient actif selon l'invention contenant l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i>		2,00

- Mode opératoire** : Peser la phase A et laisser gonfler sans agitation pendant 30 mn. Mettre la phase A à chauffer à 75 °C au bain-marie. Peser et mélanger la phase B. Peser la phase C et mettre à chauffer à 75°C au bain-marie. Rajouter la phase B dans la phase A. Bien mélanger. Sous agitation verser la phase C dans la phase A+B. Bien homogénéiser. Rajouter la phase D, extemporanément. Rajouter la phase E, bien homogénéiser. Rajouter la phase F, bien homogénéiser.

Exemple 2 : Forme Gel pour le visage

Ingrédients	Noms INCI	% en masse
Phase A		
H ₂ O	Water	Qsp 100
Cetyl hydroxyethylcellulose	Cetyl hydroxyethylcellulose	0,30
Phase B		
Ultrez 10	Carbomer	0,40
H ₂ O	Water	20,00
Phase C		
Glycérine	Glycerin	3,00
Panstat	Ethyl & Methyl & Propyl parabens	0,30
Phase D		
Marcol 82	Mineral oil	4,00
Crillet 1	Polysorbate 20	1,00
Crodamol AB	C12-15 Alkyl Benzoate	2,00
Pemulen TR2	C10-30 Alkyl Acrylate cross polymer	0,30
Phase E		
Sorbate de potassium	Potassium Sorbate	0,10
Phase F		
H ₂ O	Water	5,00
NaOH 10N	Sodium Hydroxide	0,50
Phase G		
Ingrédient actif selon l'invention contenant l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i>		2,00

- Mode opératoire** : Disperser la Phase A sous agitation. Saupoudrer l'Ultrez 10 dans l'eau, laisser gonfler 30 minutes. Chauffer la Phase C jusqu'à dissolution complète. Mélanger la Phase A avec la Phase B. Rajouter C dans la Phase (B+A). Ajouter la Phase D, sous agitation, dans la Phase (A+B+C). Rajouter la Phase E. Neutraliser avec la Phase F. Ajouter la Phase G et mélanger.

Exemples d'autres ingrédients pouvant être ajoutés à cette formulation de type gel dans l'une des phases selon leur propriété physique hydrophobe ou hydrophyle, à un certain % selon leur concentration et l'effet recherché :

RIGIN™ : actif commercialisé par SEDERMA (WO2000/433417) améliorant l'élasticité et la fermeté de la peau, renforçant l'hydratation et lissant la peau. 3% en masse de cet ingrédient peuvent être par exemple rajoutés à la formulation dans la phase G.

- 5 RENOVAGE™ : ingrédient actif anti-âge global commercialisé par SEDERMA (WO2006/020646). 3% en masse de cet ingrédient peuvent être par exemple rajoutés à la formulation dans la phase D.

LUMISKIN™ : ingrédient actif commercialisé par SEDERMA (WO2004/024695), qui éclaircit le teint. 3% en masse de cet ingrédient peuvent être par exemple rajoutés à la formulation dans la phase D.

- 10 SUBLISKIN™ : ingrédient actif commercialisé par SEDERMA (WO2009/055663) qui hydrate et lisse la peau tout en lui permettant de résister aux agressions extérieures. 3% en masse de cet ingrédient peuvent être par exemple rajoutés à la formulation dans la phase G.

- 15 MATRIXYL 3000™ : ingrédient actif anti-rides à base de peptides commercialisé par SEDERMA (WO2005/048968) qui aide à réparer les dommages cutanés causés par le vieillissement. 3% en masse de cet ingrédient peuvent par exemple être rajoutés à la formulation dans la phase G.

Exemple 3 : forme crème de nuit pour le visage

Ingrédients	Noms INCI	% en masse
<u>Phase A</u>		
H ₂ O	Water	qsp100
Ultrez 10	Carbomer	0,40
<u>Phase B</u>		
Glycérine	Glycerin	3,00
Panstat	Ethyl & Methyl & Propyl parabens	0,30
<u>Phase C</u>		
Polawax GP 200	Cetearyl Alcohol & polysorbate 20	1,00
Crodacol CS 90	Cetearyl Alcohol	1,00
Crodamol STS	PPG-3 Benzyl Ether Myristate	1,00
DC 200 5 cps	Dimethicone	2,50
Crodamol TN	Isotridecyl Isononanoate	5,00
<u>Phase D</u>		
Sorbate de potassium	Potassium sorbate	0,10
<u>Phase E</u>		
NaOH 30%	Sodium hydroxide	0,40
H ₂ O	Water	4,00
<u>Phase F</u>		
Ingrédient actif selon l'invention contenant l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i>		2,00
<u>Phase G</u>		
Parfum	Fragrance	0,10

Mode opératoire : Peser la Phase A et laisser gonfler pendant 30 minutes. Puis mettre la Phase A à chauffer au bain-marie 75°C°. Chauffer la Phase B jusqu'à dissolution. Rajouter la Phase B dans la Phase A. Chauffer la Phase C au bain-marie à 75°C°. Sous agitation, verser la Phase C dans la Phase (A+B). Ajouter la Phase D, bien homogénéiser. Neutraliser avec la Phase E vers 55°C°. Rajouter la Phase F, puis la Phase G, bien homogénéiser.

Exemples d'autres ingrédients pouvant être ajoutés à cette formulation de type crème dans l'une des phases ou extemporanément selon leur propriété physique hydrophobe ou hydrophyle, à un certain % selon leur concentration et l'effet recherché :

DERMAXYL™ : ingrédient actif anti-âge commercialisé par SEDERMA (WO2004/101609) qui lisse les rides et répare la barrière cutanée. 3% en masse de cet ingrédient peuvent être par exemple ajoutés extemporanément à la phase (A+B+C).

Niacinamide (vitamine B3), Rétinol, Resvératrol, DHEA : actifs anti-âge, notamment anti-rides. 0,5 % en masse de Rétinol, de Resvératrol ou de DHEA peuvent par exemple être ajoutés extemporanément à la phase (A+B+C). 10% en masse de Niacinamide à 10% dans l'eau peuvent par exemple être ajoutés à la phase G.

Hexamidine : actif anti-bactérien pouvant être ajouté à la phase G de la formulation à 0,5% en masse.

CHRONODYN™ : ingrédient actif commercialisé par SEDERMA (WO2006/075311) qui tonifie et raffermi la peau, qui efface les marques de fatigue. 3% de cet ingrédient peuvent par exemple être ajoutés à la phase G.

VENUCEANE™ : ingrédient actif commercialisé par SEDERMA (WO2002/066668) qui prévient des signes visibles du photovieillissement (taches, rides, sécheresse...), protège les structures cellulaires des dommages engendrés par les UV et renforce l'intégrité de la peau. 3% de cet ingrédient peuvent par exemple être ajoutés à la phase G.

Exemple 4 : Forme crème pour le corps

Ingrédients	Noms INCI	% en masse
Phase A		
H ₂ O	Water	qsp 100
Ultrez 10	Carbomer	0,40
Phase B		
Glycérine	Glycerin	3,00
Panstat	Ethyl & Methyl & Propyl parabens	0,30
Phase C		
Crill 3	Sorbitan Stearate	2,00
Marcol 82	Mineral oil	4,00
Cromollient DP3A	PPG 3 Myristyl Ether Adipate	1,00
Cithrol GMS AS	Glyceryl stearate & PEG 100 stearate	3,00

Phase D		
Sorbate de potassium	Sorbate de potassium	0,10
Phase E		
NaOH 30%	Sodium hydroxide	0,40
H ₂ O	Water	4,00
Phase F		
Ingrédient actif selon l'invention contenant l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i>		2,00
Phase G		
Parfum	Fragrance	0,10

Mode opératoire : Peser la Phase A et laisser gonfler pendant 30 minutes. Mettre la Phase A à chauffer au bain-marie à 75C°. Chauffer la Phase B jusqu'à dissolution. Rajouter la Phase B dans la Phase A. Mettre à chauffer la Phase C au bain-marie à 75C°. Sous agitation, verser la Phase C dans la Phase (A+B). Ajouter la Phase D, bien homogénéiser. Neutraliser avec la Phase E vers 55C°, bien homogénéiser. Rajouter la Phase F, puis la Phase G, bien homogénéiser.

Exemples d'autres ingrédients pouvant être ajoutés à cette formulation de type crème dans l'une des phases ou extemporanément selon leur propriété physique hydrophobe ou hydrophyle, à un certain % selon leur concentration et l'effet recherché :

JUVINITY™ : actif commercialisé par SEDERMA qui réduit les signes de l'âge sur le visage et le décolleté, lisse les rides, restructure et densifie le derme. 2% de cet ingrédient peuvent par exemple être ajoutés à la phase extemporanément à la phase (A+B+C).

Tocophérol ou vitamine E : actifs ayant des propriétés anti-radicalaires et antioxydantes.

O.D.A. white™ : actif commercialisé par SEDERMA (WO1994/07837) qui éclaircit la peau par réduction de la synthèse de mélanine. 1% de cet ingrédient peut par exemple être ajoutés à la phase extemporanément à la phase (A+B+C).

Tocophérol (vitamine E) ou acide α -lipoïque (AAL) : actif ayant des propriétés anti-oxydantes et anti-radicalaires. 0,5% en masse peuvent être par exemple ajoutés à la phase (A+B+C).

Bio-Bustyl™ : actif à base de peptides et de filtrat bactérien commercialisé par SEDERMA ayant une action globale de fermeté et de tonicité sur le buste. 3% de cet ingrédient peuvent être par exemple ajoutés à la phase G.

Exemple 5 : Forme Sérum

Ingrédients	Noms INCI	% en masse
Phase A		
Optasens G 40	Carbomer	0,25
H ₂ O	Water	Qsp100
Phase B		

Butylene Glycol	Butylene Glycol	3,00
Phenoxyethanol	Phenoxyethanol	0,20
<u>Phase C</u>		
Crillet 1	Polysorbate 20	0,50
DC 245	Cyclopentasiloxane	1,00
Crodamol CAP	Cetearyl Ethylhexanoate	2,00
Crodamol STS	PPG-3 Benzyl Ether Myristate	0,50
Pemulen TR2	Acrylates/C 10-30 Alkyl Acrylates cross polymer	0,20
<u>Phase D</u>		
Sorbate de potassium	Potassium Sorbate	0,10
<u>Phase E</u>		
H ₂ O	Water	4,00
NaOH 30 %	Sodium Hydroxiide	0.45
<u>Phase F</u>		
Ingrédient actif selon l'invention contenant l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i>		2,00
<u>Phase G</u>		
Parfum	Fragrance	0,10

Mode opératoire : Phase A : Saupoudrer le carbomer dans l'eau, laisser gonfler 15 minutes. Mélanger la Phase B. Verser la Phase B dans la Phase A, homogénéiser. Puis Peser la Phase C, mélanger et rajouter dans la Phase A+B, sous agitation. Laisser gonfler 1 heure. Extemporaneément rajouter la Phase D dans la phase précédente sous agitation. Neutraliser avec la Phase E. Mettre sous agitation. Ensuite rajouter la Phase F. Laisser mélanger au moins 1 heure sous agitation puis rajouter la Phase G. Bien mélanger.

Exemples d'autres ingrédients pouvant être ajoutés à cette formulation de type sérum dans l'une des phases ou extemporaneément selon leur propriété physique hydrophobe ou hydrophyle, à un certain % selon leur concentration et l'effet recherché :

- 10 **LUMISPHERE™** : ingrédient actif commercialisé par SEDERMA (WO04/024695). C'est l'association de diacétylbaldine (DAB) encapsulée dans des microcapsules de polyméthylméthacrylate et de dioxyde de titane modifié au manganèse (TiO₂Mn). Le TiO₂Mn procure à la peau un effet unifiant, matifiant et lumineux et la DAB apporte un effet physiologique éclaircissant. 4% de cet ingrédient peuvent par exemple être ajoutés à la phase F de la formulation.
- 15 **REVIDRAT™** : actif commercialisé par SEDERMA, qui notamment améliore la cohésion de l'épiderme et son hydratation. 2% de cet ingrédient peuvent par exemple être ajoutés à la phase C de la formulation.

EVERMAT™ : actif commercialisé par SEDERMA (WO2007/029187), qui diminue la sécrétion de sébum et ainsi participe au traitement des peaux grasses. 4% de cet ingrédient peuvent par exemple être ajoutés à la phase F de la formulation.

- 5 HALOXYL™ : actif commercialisé par SEDERMA (WO2005/102266), qui améliore le contour des yeux en résorbant les cernes. 3% de cet ingrédient peuvent par exemple être ajoutés à la phase F de la formulation.

Exemple 6 : Forme Lotion

Ingrédients	Noms INCI	% en masse
<u>Phase A</u>		
H ₂ O	Water	Qsp100
<u>Phase B</u>		
Butylene Glycol	Butylene Glycol	5,00
Phenoxyethanol	Phenoxyethanol	0,20
<u>Phase C</u>		
Crillet 1	Polysorbate 20	2,00
Crodamol STS	PPG-3 Benzyl Ether Myristate	0,10
<u>Phase D</u>		
Sorbate de potassium	Potassium Sorbate	0,10
<u>Phase E</u>		
Ingrédient actif selon l'invention contenant l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i>		2,00
<u>Phase F</u>		
Parfum	Fragrance	0,10

- Mode opératoire** : Peser la phase A. Peser la phase B et mélanger. Ajouter la phase B dans la phase A sous agitation pendant 30 minutes. Peser la phase C, homogénéiser jusqu'à obtenir un mélange homogène. Ajouter la phase C dans la phase A+B sous agitation. Ajouter la phase D dans la phase précédente. Ajouter la phase E toujours sous agitation, bien homogénéiser. Peser la phase F, mélanger et ajouter à la phase précédente, bien homogénéiser.
- 10

- Exemples d'autres ingrédients** pouvant être ajoutés à cette formulation de type lotion dans l'une des phases ou extemporanément selon leur propriété physique hydrophobe ou hydrophyle, à un certain % selon leur concentration et l'effet recherché :
- 15

EYELISS™ : est un actif commercialisé par SEDERMA (WO2003/068141), qui aide à prévenir et lutter contre l'apparition des poches sous les yeux. 3% de cet ingrédient peuvent par exemple être ajoutés à la phase E de la formulation.

- Ac-Net™ : est un actif commercialisé par SEDERMA (WO2003/02828692) offrant un traitement complet des peaux grasses et à tendance acnéique. 3% de cet ingrédient peuvent par exemple être ajoutés à la phase E de la formulation.
- 20

EVERMATTM : mentionné ci-dessus. 4% de cet ingrédient peuvent par exemple être ajoutés à la phase E de la formulation.

HYDRERGYTM : actif commercialisé par SEDERMA (WO2003/02828692 hydratant longue durée et qui stimule la synthèse d'ATP. 3% de cet ingrédient peuvent par exemple être ajoutés à la phase

5 E de la formulation.

E) Évaluations *in vivo*

Les tests ont été réalisés avec la crème de l'exemple 1 ci-dessus.

Principe

10 L'étude de l'efficacité de la crème contenant l'ingrédient actif selon l'invention a été menée sur un panel de 20 volontaires à la peau terne pour l'évaluation de l'amélioration du teint du visage ; sur un autre panel de 22 volontaires à la peau réactive pour montrer une amélioration de cet état et sur un panel de 14 volontaires présentant des signes visibles de vieillissement (rides, taches...) pour évaluer les quantités de SOD et de protéines carbonylées.

Plusieurs méthodes complémentaires ont été associées durant cette étude :

- 15 • Analyse de la clarté et de la rougeur du teint sur **photographies standardisées**.
- Analyse de la transparence de la peau par le **Transluderm**.
- Analyse de la brillance et du satinage de la peau par le **Goniolux**.
- Évaluation de la baisse de sur-réactivité de la peau à l'aide du **Neurometer**.
- Evaluation de la quantité de **SOD** et de **protéines carbonylées** sur adhésifs prélevés sur la
- 20 joue.

Protocole

Critères d'inclusion particuliers aux études

Pour l'étude du teint, des femmes ayant un teint terne, fatigué et hétérogène ont été incluses. Parmi ces sujets, 39% étaient fumeuses, un facteur très souvent associé au teint brouillé.

25 Pour l'étude de la réactivité cutanée, les volontaires ont été sélectionnées sur la base d'une réponse positive au test de stinging (test de picotement) ainsi qu'avec un questionnaire établissant un score de sensibilité suffisant. Ces volontaires devaient respecter une période de « wash-out » de 15 jours (utilisation du placebo).

30 Pour l'étude des signes du vieillissement, les 14 volontaires étaient sélectionnés avec un âge supérieur à 45 ans et une présence de signes multiples du vieillissement : rides, taches ou rougeurs. Comme pour l'étude précédente, une période de « wash-out » a été imposée.

Pour les 3 tests, Il a été demandé une constance hormonale durant les 3 mois précédant le test et pendant le test (pas de changement de traitement contraceptif, substitutif ou curatif).

L'usage exclusif des produits cosmétiques fournis pendant la durée de l'étude était exigé.

35 Type d'études et durée

Les études ont été menées en simple aveugle à l'aide de mesures non-invasives et ont porté sur :

- 20 volontaires à la peau terne (âge moyen de 34 ans [20 à 48 ans]) appliquant de façon randomisée la crème contenant l'extrait de *Globularia cordifolia*, en héli-visage. La crème placebo a été appliquée sur l'autre partie du visage.

- 22 volontaires à la peau réactive (âge moyen de 44 ans [25 à 64 ans]) appliquant de façon randomisée la crème contenant l'extrait de *Globularia cordifolia*, sur un avant-bras. La crème placebo a été appliquée en controlatéral. Les crèmes pour ce panel étaient légèrement plus riches (ajout de 2% glycerine) en raison de leur peau réactive.
- 5 • 14 volontaires avec des signes visibles de vieillissement (âge moyen de 57,5 ans [47 à 71 ans]) appliquant de façon randomisée la crème contenant l'extrait de *Globularia cordifolia* sur les joues. La crème placebo a été appliquée en controlatéral.

La crème avec l'extrait de *Globularia cordifolia* ou la crème placebo ont été appliquées en massage biquotidien pendant 2 mois.

- 10 Le synopsis de l'étude peut se résumer selon le schéma ci-dessous.

T0 : Mesures Teint ; Mesures Neurometer ; SOD ; Protéines Carbonylées

T 1 mois : Mesures Neurometer

T 2 mois : Mesures Teint ; SOD ; Protéines Carbonylées

- Les études statistiques ont été effectuées à l'aide du test *t* de Student ou si besoin avec un test non paramétrique de Wilcoxon, dans les deux cas les tests unilatéraux ont été effectués sur séries appariées.
- 15

1.1 Etude du teint sur le visage

Analyse de la Clarté et rougeur sur photographies standardisées

- Un banc photographique HeadScan a été utilisé pour assurer une prise de photo identique entre les 2 temps. Ce système utilisant un appareil photo numérique haute définition équipé de flashes et de filtres permet d'obtenir une lumière polarisée croisée assurant une prise de vue sans brillance.
- 20

Pour chaque hémiface, 5 zones ont été automatiquement extraites avec le logiciel FrameScanTM afin de calculer les paramètres de Clarté (L*) et de Rougeur (a*).

Les résultats sont donnés dans les tableaux 15 et 16 ci-après.

- 25 Tableau 15 : Variation de la clarté du teint du visage après application pendant 2 mois de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* ; (N=20)

	Amélioration de la Clarté du teint L*	
	T0	T 2 mois
Crème PLACEBO	29,86 ± 2,46	27,36 ± 2,17
% variation (Significativité)	-8,4% ($p < 0.01$)	
Crème à l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	29,88 ± 3,79	30,12 ± 3,39
% variation (significativité)	0,8% (dns)	
Delta (Crème à l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i> -Placebo) des différences de % Variations vs. T0.	9,2%	
Significativité vs. placebo	$p < 0,01$	

* Echelle physiologique : les 20 premières unités de l'échelle correspondent à une surface très sombre, elles sont défalquées.

- Les résultats montrent que la clarté du teint, mesurée par le paramètre L*, est dégradée du côté placebo après 2 mois, la différence avec T0 atteint 8,4% ($p<0,01$). Du côté de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* selon l'invention, on constate une stabilité de la clarté pendant cette
- 5 période où les paramètres de la peau se dégradent. Par rapport au placebo, une nette amélioration de la clarté du visage est observée, elle atteint +9.2% ($p<0.01$).

Tableau 16 : Variation de la rougeur du teint du visage après application pendant 2 mois de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* ; (N=20)

	Amélioration de la Rougeur +a*	
	T0	T 2 mois
Crème PLACEBO	14,42 ± 2,61	16,89 ± 1,95
% variation (Significativité)	17,1% ($p<0,01$)	
Crème à l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	14,28 ± 2,32	14,81 ± 2,07
% variation (significativité)	3,7% (dns)	
Delta (Crème à l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i> –Crème Placebo) des différences de % Variations vs. T0.	-13,4%	
Significativité vs. placebo	$p<0,01$	

- En parallèle, la rougeur du teint de ces volontaires a augmenté du côté placebo au cours du test de
- 10 +17,1% ; $p<0,01$, ceci pouvant être relié aux conditions météorologiques différentes entre les deux temps de mesures. Cependant l'application de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* a permis de contenir l'augmentation tendancielle de la rougeur. La différence entre les deux côtés est en faveur du côté traité par la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia*, elle atteint -13,4% ($p<0.01$).
- Des résultats obtenus pour ces deux paramètres, on peut déduire que le visage présente moins
- 15 d'imperfections et de rougeurs et apparaîtra ainsi plus homogène et éclatant.

Analyse de la Transparence de la peau par TRANSLUDERM™

- La transparence de la peau a été évaluée par un appareil de la Société Orion Concept : le Transluderm™.
- Cet appareil est constitué d'un plateau de 17 mm de rayon, au centre duquel se situe une diode à
- 20 lumière blanche à spectre continu permettant d'éclairer dans la peau. Dans les quatre directions de l'espace sont disposés des capteurs, tous les 1,5 mm, qui traduisent la quantité de lumière qui ressort de la peau. A l'aide d'une caméra haute résolution une image est acquise et permet une analyse d'image grâce à un logiciel dédié. Un paramètre « Distance maximale de propagation » de la lumière conduite dans la peau est ainsi fourni.
- 25 Une peau transparente conduira la lumière plus loin.
- Les résultats sont donnés dans le tableau 17 ci-après.

Tableau 17 : Variation de la transparence de la peau mesurée au Transluderm™ après application de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* ; (N=20)

	Distance (mm)	
	T0	T 2 mois
Crème PLACEBO	18,90 ± 13	21,59 ± 11,4
% variation (Significativité)	+14,3% (<i>dns</i>)	
Crème à l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	19,1 ± 12,4	31,9 ± 31,9
% variation (significativité)	+67% (<i>p<0.03</i>)	
Delta (Crème à l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i> –Crème Placebo) des différences de % Variations vs. T0.	52,7%	
Significativité vs. placebo	<i>p=0,095</i>	

Une forte augmentation de la distance parcourue par la lumière est observée (+52.7% vs placebo). Ceci indique donc que la transparence de la peau est grandement améliorée après application de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia*. Ceci renforce les effets observés précédemment.

Analyse de la brillance de la peau par GONIOLUX™

Le Goniolux™ (Orion Concept) a été utilisé pour évaluer les paramètres de brillance et de satinage de la peau. Cet appareil permet de quantifier l'interaction entre une lumière projetée sur la peau (lumière incidente) et le comportement de cette lumière renvoyée par la peau (lumière réfléchie). La lumière réfléchie est mesurée à l'aide de multiples capteurs dans toutes les directions dans un espace tridimensionnel. La lumière réfléchie se décompose en lumière réfléchie spéculaire (brillance) et en lumière réfléchie diffuse (halo). Une peau paraîtra d'autant plus jeune et belle que son rendu lumineux sera doux avec notamment moins de brillance et un satinage (halo) plus prononcé. Les résultats sont donnés dans le tableau 18 ci-dessous.

Tableau 18 : Variation du paramètre de brillance et de satinage de la peau après application de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia*; (N=20)

	Brillance (unité arbitraire)		Satinage (unité arbitraire)	
	T0	T 2 mois	T0	T 2 mois
Crème PLACEBO	780,7 ± 8,2	750,2 ± 27,2	7,37 ± 0,06	8,22 ± 0,51
% variation (Significativité)	-3,9% (<i>dns</i>)		+11.5% (<i>dns</i>)	
Crème à l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	777,0 ± 8,2	706,0 ± 28,4	7,39 ± 0,06	8,71 ± 0,51
% variation (significativité)	-9,1% (<i>p<0.02</i>)		+17,9% (<i>p<0.01</i>)	
Delta (Crème à l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i> –Crème Placebo) des différences de % Variations vs. T0.	+ 5,2%		+ 6,4%	
Significativité vs. placebo	<i>p=0,07</i>		<i>Tendance (p<0.15)</i>	

L'application de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* pendant 2 mois produit un effet matifiant intéressant qui se décompose en une diminution de la brillance (-9.1%, $p < 0.02$ vs. T0) ce qui produit une amélioration de ce paramètre (+5,2% $p < 0.07$ vs. placebo) additionnée à une augmentation tendancielle de l'aspect satiné (+17.9%, $p < 0.01$ vs. T0).

- 5 L'amélioration de ces 2 paramètres conduit à un visage d'aspect plus lisse et plus doux.

1.2 Etude de la réactivité cutanée

Afin d'étudier l'amélioration de la réactivité cutanée des volontaires, nous avons utilisé un appareil appelé NEUROMETER™, utilisé dans le domaine médical pour détecter précocement les hyper- ou hypo-réactivités.

- 10 Le NEUROMETER™ permet de caractériser aussi bien quantitativement que qualitativement les variations de sensibilité cutanée.

L'appareil permet de stimuler les fibres nerveuses en délivrant dans la peau un léger courant jusqu'à ce que le volontaire détecte quelque chose (cette opération étant totalement indolore). Ceci correspond au seuil de perception du courant (ou *CPT = Current Perception Threshold*) individuel.

- 15 Le fait, pour une personne, de percevoir des courants à une plus forte intensité que d'autres personnes indique une plus grande tolérance cutanée aux stress et une peau moins réactive. A l'inverse, une perception des courants faibles révèle une peau plus réactive.

Plusieurs types de fibres nerveuses existent, (fibres Aβ, Aδ ou C) excitables par des courant de fréquences différentes. Les 3 types de fibres nerveuses conduisent des informations différentes. En raison du ressenti des volontaires lors des tests d'inclusions, nous avons utilisé comme modèle pour cette étude les fibres de type Aβ de l'avant-bras. Ces fibres de large diamètre et de vitesse de conduction rapide, conduisent une information de toucher, de pression, de vibration et de distension de la peau. Quatre types de mécanorécepteurs sont associés à ces fibres : corpuscules de Meissner, corpuscules de Pacini, disques de Merkel et corpuscules de Ruffini.

- 20 Dans cette étude, la mesure est automatique et en double aveugle ce qui assure des résultats très fiables, particulièrement pertinents pour ce type de sensation dépendante de chaque personne. Les résultats sont donnés dans le tableau 19 ci-dessous.

Tableau 19 : Variation du seuil de tolérance de la peau après application de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia*; (N=22)

	Fibres Aβ (en mAmpères)	
	T0	T 1 mois
Crème PLACEBO	81,82 ± 17.9	75,64 ± 17.9
% variation (Significativité)	-7.6% (dns)	
Crème à l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i>	69,45 ± 16.8	80,55 ± 22.9
% variation (significativité)	+ 16% ($p < 0.01$)	
Delta (Crème à l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i> –Crème Placebo) des différences de % Variations vs. T0.	+23,6%	
Significativité vs. placebo	$p < 0,01$	

Les résultats obtenus montrent pour le site placebo une légère dégradation du seuil de perception qui en diminuant tend à rendre la peau plus réactive qu'à T0.

- 5 Au contraire, pour le site ayant reçu la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia*, et comparativement au placebo, un rehaussement très net du seuil de perception de +23,6% ($p < 0.01$) est observé. Ceci démontre une baisse de la réactivité cutanée après l'emploi de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* selon l'invention.

1.3 Etude de la SOD (enzyme superoxyde dismutase) et des protéines carbonylées sur adhésifs

- 10 Un test sur volontaires présentant des signes visibles du vieillissement (N=14) a permis de valider la stimulation de synthèse de SOD déjà observée sur des cellules en culture et dans des explants traités à l'aide de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia*.

- Après application pendant 2 mois sur la joue de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia*, l'activité SOD retrouvée sur des adhésifs prélevés sur ces joues montre une amélioration nette de cette activité de +19% du côté de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* contre une
15 dégradation de -13% du côté placebo appliqué du côté opposé (différence significative crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* / crème placebo $p < 0.01$).

- Par ailleurs, la quantité de protéines carbonylées retrouvées sur des cornéocytes prélevés par adhésifs lors de la même étude a également été évaluée à l'aide de la méthode de FUJITA et al. La sonde fluorescente FTZ a servi à révéler les protéines carbonylées directement sur les adhésifs, la
20 mesure employant un lecteur à fluorescence. Un dosage de protéines totales a été effectué en parallèle pour normaliser les données. Les résultats sont donnés dans le tableau 20 ci-dessous.

Tableau 20 : Variation de la quantité de protéines carbonylées après application de la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* ; (N=14)

	Protéines carbonylées / mg protéine (unités de fluorescence)		
	T0	T 2 mois	% Variation / T0
Crème PLACEBO % variation (Significativité)	158910 +/- 89197	184364 +/- 93933	+16%
Crème à l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i> % variation (significativité)	170510 +/- 77739	167937 +/- 77098	-2%
Delta (Crème à l'extrait de <i>Globularia cordifolia</i> –Crème Placebo) des différences de % Variations vs. T0.			18%
Significativité vs. placebo			$p < 0,01$

- 25 Les résultats montrent une moindre quantité de protéines carbonylées recueillies sur les adhésifs du côté ayant reçu la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia*, cette différence est significative par rapport au côté Placebo : -18% du côté placebo ($p < 0.01$).

Ainsi sur des peaux présentant des signes visibles du vieillissement, la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* est à même d'améliorer en 2 mois l'activité SOD et de diminuer le taux de

- protéines carbonylées. Associées aux observations relevées lors des essais sur les peaux ternes, on peut dire que la crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* a stimulé les défenses de la peau et lui a rendu sa transparence et son éclat. L'amélioration des capacités épuratrices a permis de réduire les niveaux de réactivité cutanée, ce qui tend à rendre la peau moins réceptive aux stress futurs, comme immunisée. La crème à l'extrait de *Globularia cordifolia* se présente donc comme un véritable vaccin anti-âge.
- 5

REVENDEICATIONS

1. Extrait d'origine végétale caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir d'une plante du genre *Globularia*.
2. Extrait selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'espèce est *Globularia Cordifolia*.
- 5 3. Extrait selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est obtenu par culture végétale *in vitro*.
4. Extrait selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est obtenu par culture végétale de cellules indifférenciées.
5. Extrait selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir
- 10 de feuilles.
6. Extrait selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en qu'il est un extrait aqueux.
7. Extrait selon l'une des revendications précédentes pour une utilisation comme ingrédient actif cosmétique afin d'améliorer l'état général de la peau et des phanères.
- 15 8. Extrait selon la revendication précédente pour une utilisation comme ingrédient actif cosmétique pour prévenir et/ou traiter le vieillissement cutané en stimulant les réactions de détoxification et/ou la régénération cellulaire grâce à une réponse de type hormétique.
9. Extrait selon la revendication 7 ou 8 pour une utilisation comme ingrédient actif cosmétique pour améliorer l'éclat et/ou la transparence du teint.
- 20 10. Extrait selon l'une des revendications 7 à 9, pour une utilisation comme ingrédient actif cosmétique pour prévenir et/ou traiter les peaux sensibles et/ou réactives.
11. Extrait selon l'une des revendications 7 à 10, pour une utilisation comme ingrédient actif cosmétique pour prévenir et/ou traiter les rougeurs.
12. Extrait selon l'une des revendications 7 à 11, pour une utilisation comme ingrédient actif
- 25 cosmétique pour prévenir la glycation des protéines.
13. Composition topique caractérisée en ce qu'elle contient, dans un milieu physiologiquement acceptable, en tant qu'agent actif, une quantité efficace d'un extrait végétal de *Globularia Cordifolia* selon l'une des revendications 1 à 12.
14. Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un
- 30 ingrédient actif additionnel.
15. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit ingrédient actif additionnel est choisi parmi choisis parmi les actifs éclaircissants, anti-rougeurs, les filtres solaires UV, les actifs hydratants, humectants, exfoliants anti-âges, anti-rides et ridules, amincissants, volumateurs, améliorant les propriétés élastiques, anti-acné, anti-
- 35 inflammatoires, anti-oxydants, anti-radicalaires, propigmentants ou dépigmentants,

dépilatoires, anti-repousse, ou favorisant la pousse des poils et/ou cheveux, peptides, vitamines.

- 5 16. Procédé d'obtention d'un extrait d'origine végétale par culture végétale *in vitro* selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, du type comprenant à partir d'une lignée de cellules végétales indifférenciées :
- une étape de pré-culture, destinée à amplifier la biomasse,
 - une étape de culture en bioréacteur comprenant une phase de prolifération puis une phase d'élicitation, et
 - une étape de récupération dudit extrait.
- 10 17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la phase d'élicitation dans l'étape de culture en bioréacteur est effectuée avec un milieu carencé en saccharose et en macro-éléments.
- 15 18. Procédé selon l'une des revendications 16 à 17, caractérisé en ce que l'étape de récupération dudit extrait comprend une lyse des cellules à pH acide.



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 747175
FR 1150739

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	FR 2 622 110 A1 (MARTY GEORGES [FR]) 28 avril 1989 (1989-04-28) * revendication 3 *	1,13-15	A61K8/97 A61K36/185 A61Q19/08 A61P17/00
X	EP 0 006 059 A1 (DEBAT LAB [FR]) 12 décembre 1979 (1979-12-12) * revendications *	1,5,6,13	
X	J.B. Harborne, C.A. Williams: "6-Hydroxyluteolin and Scutellarein as phyletic markers in higher plants", Phytochemistry, vol. 10, no. 2 février 1971 (1971-02), pages 367-378, XP000002659491, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)94052-4 Extrait de l'Internet: URL:http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(0 0)94052-4 [extrait le 2011-09-14] * page 369 * * page 376 - page 377 *	1-18	
X	R.K. Chaudhuri, O. Sticher: "Globularifolin, A New Acyl Iridoid Glucoside from Globularia cordifolia", Helvetica Chimica Acta, vol. 63, no. 1 23 janvier 1980 (1980-01-23), pages 117-120, XP000002659492, DOI: 10.1002/hlca.19800630112 Extrait de l'Internet: URL:http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10. 1002/hlca.19800630112/pdf [extrait le 2011-09-19] * page 119 *	1-18	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K A61Q
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
20 septembre 2011		Sala-Jung, Nathalie	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 747175
FR 1150739

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	H. Kirmizibekmez, I. Calis, S. Piacente, C. Pizza: "Phenolic compounds from Globularia cordifolia", Turk J Chem, vol. 28 2004, pages 455-460, XP000002659493, Extrait de l'Internet: URL: http://journals.tubitak.gov.tr/chem/is sues/kim-04-28-4/kim-28-4-7-0311-16.pdf [extrait le 2011-09-16] * page 456 *	1-18	
X	H. Kirmizibekmez, I. Calis, P. Akbay, O. Sticher: "Iridoid and Bisiridoid Glycosides from Globularia cordifolia", Zeitschrift für Naturforschung C., Journal of biosciences, vol. 58c 2003, pages 337-341, XP000002659494, Extrait de l'Internet: URL: http://www.znaturforsch.com/ac/v58c/s5 8c0337.pdf [extrait le 2011-09-19] * page 337 - page 338 *	1-18	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
20 septembre 2011		Sala-Jung, Nathalie	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1150739 FA 747175

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 **20-09-2011**

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 2622110	A1	28-04-1989	AUCUN	

EP 0006059	A1	12-12-1979	AU 4763279 A	06-12-1979
			DK 226079 A	01-12-1979
			ES 481169 A1	16-08-1980
			FI 791751 A	01-12-1979
			GR 65291 A1	01-08-1980
			JP 55027170 A	27-02-1980
			MA 18461 A1	31-12-1979
			NO 791806 A	03-12-1979
			OA 6266 A	30-06-1981
			PT 69702 A	01-06-1979
			ZA 7902681 A	27-08-1980
