(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** **3 061 018**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **16 63161**

(51) Int Cl[8] : ***A 61 K 8/98*** *(2017.01), A 61 Q 19/00*

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

(54) COMPOSITION COSMETIQUE COMPRENANT UN EXTRAIT D'ALBIZIA JUBIBRISSIN, UN EXTRAIT DE ROMARIN ET DE LA GELEE ROYALE.

(22) **Date de dépôt :** 22.12.16.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 29.06.18 Bulletin 18/26.

(45) **Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention :** 06.03.20 Bulletin 20/10.

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

Se reporter à la fin du présent fascicule

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

(○) **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *L V M H RECHERCHE* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** KURFURST ROBIN, SOBILO LAUREN, SCHNEBERT SYLVIANNE, JEANNETON OLIVIER et HEUSELE CATHERINE.

(73) **Titulaire(s) :** L V M H RECHERCHE.

(74) **Mandataire(s) :** REGIMBEAU.

FR 3 061 018 - B1

La présente invention a pour objet une composition cosmétique favorisant la régénération et/ou la cicatrisation de la peau comprenant un extrait d'arbre à soie (*Albizia Julibrissin)*, un extrait de romarin (*Rosmarinus officinalis*) et de la gelée royale d'abeille noire d'Ouessant (*Apis mellifera mellifera*) dans un milieu cosmétiquement acceptable.

La cicatrisation et la régénération tissulaire sont des processus complexes et intimement liés, mettant en jeu de nombreux types cellulaires, impliquant de multiples systèmes de régulation, une communication cellulaire complexe et la sécrétion d'un grand nombre de facteurs de transcription (Martin, 1997).

Le TGF-béta (TGF-ß) est le principal déclencheur et régulateur des trois grandes étapes du processus de cicatrisation que sont l'inflammation, la prolifération cellulaire et le remodelage tissulaire. Par son spectre d'activité et ses actions en amont de ce processus, la voie du TGF-ß est la voie biologique qui permet d'accélérer ou au contraire ralentir les mécanismes de cicatrisation.

Le TGF-ß agit en se liant à ses récepteurs cellulaires formant un complexe de récepteurs de type I (TßR-I) et de type II (TßR-II) et via l'activation de la voie des smads, conduit ainsi à une régulation positive d'un ensemble de gènes. Ces gènes régulés par TGF-ß sont impliqués dans la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire, la prolifération et la motilité cellulaire, la régulation négative de l'expression d'enzymes protéolytiques ou encore la prolifération des fibroblastes dermiques.

La voie du TGF-ß est altérée par le vieillissement intrinsèque et le photovieillissement conduisant ainsi à un amincissement cutané et à des retards de cicatrisation tels que ceux observés par exemple chez les personnes âgées. Une autre caractéristique de la peau âgée est la réduction de la synthèse du collagène qui conduit à un amincissement de la peau et à une fragilité accrue. Cependant, une action biologique qui viserait à augmenter la production ou la concentration de TGF-ß pour atténuer les effets du vieillissement serait inefficace puisque c'est une altération des récepteurs au TGF-ß qui est la cause de la perte d'activité du TGF-ß au niveau cellulaire et tissulaire.

Par ailleurs, TIEG-1 (TGF beta early inducible gene 1) a été identifié en aval de la voie du TGF-ß, comme un facteur clef de la régénération osseuse (*Subramaniam M. et al. Mol. Cell. Biol., 2005, 1191-1199*), de la cicatrisation (*Taguchi M. et al., J. Musculoskelet. Res., 2008, 11, 63-69*) mais aussi de l'organisation moléculaire des fibres de collagène et de la composition de la matrice collagénique (*Gumez L. et al., J. Appl. Physiol., 2010, 108, 1706-1710*).

Des études récentes rapportées par Subramaniam M. *et al.* (*Biofactors, 2010, 36, 8-18*) ont démontré l'implication du gène codant pour TIEG-1 dans la régénération

osseuse. En effet, son expression est un élément de la réponse primaire des ostéoblastes (cellules synthétisant la partie non-minérale des os) au TGF-ß.
L'identification de la protéine TIEG-1, en aval de la voie du TGF-ß, représente donc une cible moléculaire d'intérêt pour activer la voie de signalisation du TGF-ß, en particulier lorsque les récepteurs au TGF-ß sont altérés.

Dans ce contexte, les inventeurs ont montré de manière surprenante, que l'expression du gène TIEG-1 pouvait être spécifiquement augmentée sous l'effet d'une nouvelle composition comprenant un extrait d'*Albizia julibrissin*, un extrait de romarin et de la gelée royale d'abeille noire d'Ouessant (*Apis mellifera mellifera*). Les inventeurs ont également démontré que cette composition pouvait améliorer la régénération de la peau qui est altérée par les processus intrinsèque ou extrinsèque de vieillissement ou consécutivement à une agression, par exemple une agression physique. On parlera dans ce dernier cas de cicatrisation.

En particulier, les inventeurs ont mis en évidence que les trois composés actifs de la composition de l'invention, à savoir l'extrait d'*Albizia julibrissin*, l'extrait de romarin et la gelée royale d'abeille noire d'Ouessant permettaient de stimuler l'expression de TIEG-1, et que la combinaison de ces extraits avec de la gelée royale d'abeille noire d'Ouessant permettait de stimuler l'expression de TIEG-1 de façon plus importante au sein d'une zone cicatricielle par rapport à une zone non-cicatricielle.

La présente invention a donc pour objet une composition cosmétique comprenant un extrait d'*Albizia julibrissin*, un extrait de romarin et de la gelée royale d'abeille noire d'Ouessant dans un milieu cosmétiquement acceptable.

Par « *cosmétiquement acceptable* » on entend que la composition convient à une utilisation topique ou transdermique, en contact avec la peau de mammifère et plus particulièrement la peau humaine.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'extrait d'*Albizia julibrissin* de la composition cosmétique selon l'invention est un extrait d'écorce d'*Albizia Julibrissin*.

Selon un autre mode de réalisation, l'extrait de romarin de la composition cosmétique selon l'invention est un extrait de feuilles de romarin.

La plante ou les parties de la plante sélectionnées peuvent éventuellement être fraiches, séchées et/ou broyées.

Selon une mise en œuvre préférée de l'invention, le matériel végétal se trouve à l'état sec et broyé.

L'extrait végétal peut être préparé par différents procédés d'extraction connus de l'homme du métier.

L'extraction est avantageusement réalisée par mise en contact du matériel végétal sélectionné avec un solvant polaire ou un mélange de solvants polaires. Selon la présente invention, l'expression « solvant polaire » signifie que le solvant a une valeur d'indice de Polarité qui est égale ou supérieure à une valeur de 4. L'indice de polarité est une grandeur calculée sur la base de grandeurs thermodynamiques (de solubilité et de changement d'état) qui met en évidence le caractère plus ou moins polaire d'une molécule. On se reportera, pour les indices de polarité des solvants, à l'article de Snyder (1974).

Le solvant polaire est avantageusement choisi parmi l'eau, les alcools en C1-C4, tel que le méthanol, l'éthanol, les glycols, tels que l'éthylène glycol, le glycérol, le butylèneglycol et leurs mélanges.

Selon une mise en œuvre préférée de l'invention, les extractions sont menées par utilisation d'eau ou d'un mélange hydro glycolique ou avec du méthanol.
Selon une mise en œuvre préférée de l'invention, l'extraction de l'écorce *d'Albizia Julibrissin* est avantageusement mené dans l'eau ou un alcool, par exemple l'éthanol ou bien encore un mélange hydro-alcoolique, conformément au brevet FR 2980362 SEDERMA, dont le contenu est inclus à la présente demande.

Selon une mise en œuvre préférée de l'invention, l'extraction est menée en utilisant un mélange hydro-alcoolique, en particulier un mélange d'eau et d'éthanol, de préférence un mélange d'eau et d'éthanol, avantageusement dans un rapport 50/50 (v/v).

L'extraction peut aussi comprendre, de façon optionnelle, une étape supplémentaire consistant en un traitement de l'extrait visant à le décolorer partiellement ou complètement, ou à le purifier.

L'extraction peut être complétée par une étape d'élimination partielle ou totale des solvants d'extraction.

En cas d'élimination partielle des solvants d'extraction, on concentre généralement l'extrait jusqu'à obtenir un concentré dépourvu de quantités significatives de solvant organique. Dans le cas d'une élimination totale de ces solvants, on obtient un résidu sec.

De façon alternative, le produit de l'étape d'extraction peut être lyophilisé ou atomisé et se présenter sous la forme d'une poudre.

La poudre peut être utilisée en l'état dans une composition, telle qu'une composition cosmétique, selon la présente invention ou être dispersée dans un solvant ou un mélange de solvants.

De façon générale, le produit de l'étape d'extraction peut être dissous ou dispersé dans un solvant ou un mélange de solvants, pour être utilisé à titre d'agent actif dans les compositions de l'invention.

Le solvant ou le mélange de solvants dans lequel l'extrait est dissous ou dispersé peut être identique ou différent de celui ayant servi à l'extraction.

L'extrait de l'invention peut également être adsorbé sur un support avantageusement choisi parmi les poudres de nylon, poudres poreuses ou non poreuses et les micas ou toute substance minérale lamellaire.

Dans ce cas, l'extrait utilisé est préférentiellement un extrait dans le butylène glycol ou un extrait aqueux.

La gelée royale est un produit naturel issu de l'apiculture, qui se présente sous la forme d'une pâte. Contrairement à de la gelée royale « classique », ne provenant pas d'abeille noire d'Ouessant, la gelée royale d'abeille noire d'Ouessant présente l'avantage de stimuler l'expression de TIEG-1, et sa combinaison avec un extrait d'*Albizia julibrissin* et un extrait de romarin permet de stimuler l'expression de TIEG-1 plus intensément dans la zone cicatricielle, dans un modèle de cicatrisation *in vitro* par arrachage du tapis cellulaire et recolonisation.

Selon un mode de réalisation préféré, la composition cosmétique selon l'invention comprend :

- l'extrait d'*Albizia julibrissin* à une concentration comprise entre 0,001% et 5%, préférentiellement 0,01% et 3% et plus préférentiellement encore à 2% en poids de la composition totale;
- l'extrait de romarin à une concentration comprise entre 0,001% et 5%, préférentiellement entre 0,01% et 3 %, et plus préférentiellement encore à 2% en poids de la composition totale ; et
- la gelée royale d'abeille noire d'Ouessant à une concentration comprise entre 0,001% et 1% préférentiellement entre 0,005% et 0,5% et plus préférentiellement encore entre 0,5% et 0,2% en poids de la composition totale.

Selon un autre objet de la présente invention, la composition cosmétique selon l'invention est plus particulièrement destinée à la régénération et/ou cicatrisation de la peau.

La composition de l'invention est en particulier destinée à des peaux présentant des signes de vieillissement chronologique ou de photovieillissement.

En effet, le vieillissement intrinsèque ou extrinsèque de la peau provoque un ralentissement du renouvellement cellulaire et une dégradation de la matrice extracellulaire de façon plus importante que sa néo-synthèse, ce qui indique une

perte de l'homéostasie cutanée. Ceci se traduit notamment par un amincissement de la peau, un relâchement de la peau, ainsi que l'apparition de rides et ridules.

Selon un mode de réalisation préférée, la composition de l'invention est destinée à une application topique.

La composition cosmétique selon l'invention comprend, outre les principes actifs que sont l'extrait d'*Albizia julibrissin*, l'extrait de romarin et la gelée royale d'abeille noire d'Ouessant, un ou plusieurs excipients cosmétiques acceptable parmi ceux connus de l'homme du métier en vue d'obtenir une composition pour l'application topique sous forme de lait, de crème, de pommade, d'émulsion eau-dans huile ou huile dans eau, de baume, de gel, de lotion, de sérum, de spray, préférentiellement de crème ou de sérum.

Selon la nature de la composition, on sélectionnera un ou plusieurs excipients cosmétiquement acceptables parmi des polymères, des agents tensioactifs, des agents de rhéologie, des parfums, des électrolytes, des ajusteurs de pH, des agents anti-oxydants, des conservateurs, des colorants, des nacres, des pigments et leurs mélanges.

Dans un mode de réalisation particulier, la composition cosmétique selon la présente invention peut comprendre en outre au moins un agent cosmétiquement actif bien connu de l'homme du métier choisis parmi des agents pour retarder ou ralentir l'apparition de signes du vieillissement cutané intrinsèque ou extrinsèque ; des agents ayant une activité dépigmentante ou une activité éclaircissante de la peau; des agents ayant une activité amincissante ; des agents ayant une activité hydratante ; des agents ayant une activité calmante, apaisante ou relaxante ; des agents stimulant la microcirculation cutanée pour améliorer l'éclat du teint, en particulier du visage ; des agents ayant une activité sébo-régulatrice pour le soin des peaux grasses ; des agents destinés à nettoyer ou purifier la peau ; des agents ayant une activité anti-radicalaire.

La composition cosmétique de l'invention peut ainsi comprendre une ou plusieurs autres substances pouvant être avantageusement choisies parmi :

- des molécules favorisant le renouvellement cellulaire telles que, le rétinol et/ou ses esters; des alpha ou beta hydroxy acides tels que les acides de fruits, notamment l'acide malique, l'acide glycolique ou l'acide citrique, l'acide salicylique ou ses esters, l'acide gentisique ou ses esters, en particulier le gentisate de tocopherol ;
- des molécules ou extraits stimulant la fermeté de la peau telles que des peptides stimulateurs de la synthèse de collagène, en particulier le collagène de type I, II, IV ou VII, un extrait de *Centella asiatica*, l'acide madécassique, l'acide asiatique, le madécassoside, un extraits d'avoine, un extrait de *Berthollétia exscelsa*, un hydrolysat de protéines ou des peptides de soja, un

extrait de *Potentilla erecta*, un extrait de *Siegesbeckia orientalis*, des ginsenosides ou notoginsenosides, un extrait de graines de *Vigna aconitifolia* ;

- des molécules ou extraits favorisant la synthèse d'acide hyaluronique ou de glycosaminoglycanes au niveau épidermique et dermique, tels qu'un extrait d'essence vitale de Mamaku, un extrait de feuilles de *Cyathea medullaris*, un extrait d'*Eriobotrya japonica* ou des fragments d'acide hyaluronique de bas et moyens poids moléculaires ou bien encore un extrait d'*Adenum obesum* ;
- des molécules ou extraits régulant la différentiation de l'épiderme tels que l'ecdystérone, la turkestérone, des dérivés de calcium, des précurseurs de vitamine D ;
- l'adénosine, la carnitine ou ses dérivés en particulier l'acetylcarnitine, le retinol ou un de ces esters cosmétiquement acceptable, en particulier le propionate ou le retinyl palmitate;
- des inhibiteurs de métalloprotéinases (MMP), en particulier des inhibiteurs des MMP 1, 2, 9 tel qu'un extrait de Ruscus asculeatus, des peptides de soja ou des flavonoïdes ou des extraits végétaux en contenants ;
- des inhibiteurs d'élastase tels que des extraits végétaux d'*Aspergillus fumigatus*, de *Momordica charantia*, de *Cucurbita maxima* ;
- un peptide analogue de l'élastine, avantageusement estérifié, tel que celui formé par la séquence palmitoyl-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly commercialisé sous la dénomination commerciale BIOPEPTIDE EL par la société SEDERMA ;
- des substances capables de stimuler la synthèse de dermatopontine, telles qu'un extrait d'ambre ;
- des molécules ou extraits de plantes astringents resserrant les pores tels qu'un extrait d'Hamamélis ; le gluconate de zinc,
- des filtres protégeant des radiations UVA et UVB, tels que la benzophenone 4-butyl méthoxydibenzoylméthane, l'éthylhexyl méthoxycinnamate, l'octocrylène, l'éthylhexyl salicylate, l'acide sulfonique phenylbenzymidazole, l'homosalate, seuls ou en association avec des oxydes de titane ;
- des molécules ou extraits végétaux agissant sur la pigmentation telles que l'acide kojique, les extraits de racine de réglisse ou de mûrier, l'arbutine, le pantothenosulfonate de calcium, la boldine, la diacetylboldine, la vitamine C ou un de ses dérivés, tels que les glycosides, des extraits de lys en particulier de bulbe.
- des molécules ou extraits antiradicalaires ou anti-inflammatoires tels qu'un extrait d'*Artemisia capillaris*, un extrait de *Sanguisorba officinalis*, le resvératrol et ses dérivés, le cucurma, la cucurmine ou la tetrahydrocucurmine, des polyphénols extraits de pépins de raisin, de la vitamine E et ses dérivés, en particulier ses dérivés phosphate, l'ergothionéine ou ses dérivés, l'idébenone,
- un extrait d'orchidée telle qu'une orchidée appartenant au genre Brassocattleya, par exemple un extrait de l'orchidée *Brassocattleya marcella*, ou au genre Vanda, par exemple un extrait d'une orchidée parmi *Vanda coerulea*, *Vanda teres* ou encore *Vanda denisoniana* ;

- des agents hydratants comme le glycérol, la triméthylglycine ou des polyols naturels, des céramides naturels ou de synthèse, des eaux de sources ou minérales.

Avantageusement, la composition selon l'invention peut comprendre en outre un miel ou un extrait de miel. Le miel étant préférentiellement un miel unifloral ou polyfloral.

De préférence, le miel utilisé dans la composition selon l'invention est peut être un miel de trèfle (*Trifolium repens*), un miel de thym (*Thymus vulgaris*), un miel de Manuka (*Leptospernum scoparium*), un miel d'Ouessant, un miel d'euphorbe (*Euphorbia echinus)* ou un miel de Corse

Sous quelle que forme que ce soit, la composition cosmétique de l'invention est appliquée sur une partie de la peau du corps, en particulier le visage, le cou, le décolleté et/ou les mains.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de traitement cosmétique pour stimuler la régénération et/ou la cicatrisation de la peau, caractérisé en ce qu'on applique sur la peau une quantité suffisante d'une composition cosmétique comprenant au moins un extrait d'*Albizia julibrissin*, un extrait de romarin et de la gelée royale d'abeille noire d'Ouessant, à titre d'agent cosmétiquement actif.

Les figures et exemples ci-après sont donnés à titre illustratif et ne sont pas limitatifs.

FIGURES

Figure 1 : Effet des extraits de Romarin (ROMext) et d'*Albizia Julibrissin* (ALBZ) sur le niveau de l'ARNm de TIEG-1 dans les Kératinocytes Humains Normaux (KHN).

Figure 2 : Etude de l'expression de la protéine TIEG-1 par Western Blot sur les fibroblastes humains normaux (FHN). A. Recomposition des images des membranes après révélation par chimiluminescence, C1 : ROMext + ALBZ (1ppm/30ppm), C2 : ROMext + ALBZ (0,5ppm/30ppm), C3 : ROMext + ALBZ (1ppm/50ppm) et C4 : ROMext + ALBZ (2ppm/30ppm) ; B. Analyse des ratios d'expression TIEG-1/Actine sur FHN après 6h de traitement.

Figure 3 : Expression protéique de TIEG-1 dans un modèle de cicatrisation *in vitro* dans des FHN.
Zone A. Schéma des zones d'intérêts où signal immunofluorescent est quantifié dans un modèle de cicatrisation. Zone A : éloignée de la zone blessée ; zone B : zone mixte comprenant la zone limitrophe de la blessure et une zone témoin sur le tapis

cellulaire ; zone C : zone de blessure correspondant à la zone raclée par une pointe de cône ; B. Suivi de l'expression protéique de TIEG-1 dans les fibroblastes 48h après blessure.

Figure 4 : Effet des extraits de Romarin (ROMext), d'*Albizia Julibrissin* (Prodizia®) et de gelée royale d'abeille noire d'Ouessant (gelée royale AN) sur le niveau protéique de TIEG-1 dans des FHN en culture au niveau de zones blessée (ou zone cicatricielle) et non-blessé.

EXEMPLES

Exemple 1 : Etude de l'association de l'extrait de romarin et de l'extrait *d'Albizia Julibrissin* sur les Kératinocytes Humains Normaux par q-PCR.

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet de l'extrait de Romarin (ROMext), riche en acide ursolique, et l'extrait d'*Albizia Julibrissin* (ALBZ) sur l'ARNm de TIEG-1 par qRT-PCR.

1.1. Matériels & Méthodes

Tableau 1 : Récapitulatifs des informations sur les extraits testés

Nom	Nom Fournisseur (Sederma)	Excipient	Concentration testée
Extrait d'écorce d'*Albizia Julibrissin*	Prodizia®	Eau	0,001% (10ppm)
Extrait de feuilles de Romarin	« Rosemary extract URSO » (ROMext)	DMSO	0,05% (0,75ppm d'URSO)

Afin d'observer un effet sur notre cible TIEG-1, le contrôle TGβ1 (Sigma) a été testé sur chaque essai à la concentration de 10ng/mL.

L'extrait d'*Albizia Julibrissin* (ALBZ) correspond à un extrait sans conservateur de l'actif commercialisé par la société SEDERMA sous le nom de Prodizia® : 0,001% (10ppm) d'ALBZ = 0,08% de Prodizia®.

L'extrait de feuilles de romarin (ROMext) correspond à un extrait commercialisé par la société SEDERMA titré en acide ursolique : 0.05% de Rosemary extract URSO (ROMext) contient à 0.75 ppm d'acide ursolique.

1.2. Traitements des Kératinocytes Humains Normaux (KHN)

Les KHN sont ensemencés dans le milieu de culture approprié sans antibiotique, milieu sans sérum pour kératinocyte (keratinocyte serum-free medium, KSFM) avec complément (Extrait Pituitaire et EGF) de 0,100 à 0,125 $x10^6$ cellules/puits, en plaque 12 puits.

Les cellules sont ensuite traitées avec les différents extraits préparés extemporanément dans du milieu de culture approprié, KSFM sans complément sans antibiotique afin d'en extraire les ARN totaux.

1.3. RT-PCR quantitative en temps réel

a. Obtention des ARN totaux à l'aide du pipeteur EpMotion (Eppendorf)

Le milieu de culture des cellules est éliminé, et 250 µL de tampon de lyse RLT (fourni dans le kit Nucleospin 96 RNA, (Macherey-Nagel) sont ajoutés. Les cellules sont raclées à l'aide d'un « *Cell Scraper* » puis le lysat cellulaire récupéré est dans un puit de 1,2 mL (fourni dans le kit Nucleospin 96 RNA). On extrait les ARN totaux selon un protocole que connaît l'Homme du Métier. Les solutions d'ARN totaux obtenues sont dosées à l'aide du BioAnalyser 2100 (Agilent Technologies). La technique nécessite une micro-plaque de 12 puits (RNA 6000 NanoChips) et un kit de réactifs (RNA 6000 Nano Reagents), spécifiques du dosage des ARN totaux eucaryotes.

Les ARNt sont considérés comme qualitatifs selon 2 informations apportées par le BioAnalyser 2100 : le RIN (« *RNA Integrity Number* ») doit être supérieur à 7 pour valider l'intégrité des ARNt (non dégradés) et le Ratio 28S/18S doit être compris entre 1,8 et 2,2 pour ne pas avoir de contaminants comme les protéines.

b. Synthèse des ADN complémentaires

Le kit de transcription inverse (RT) utilisé est le « High Capacity Reverse Transcription Kit » (Life Technologies-Applied). Il a été utilisé selon le protocole proposé par le fournisseur. On dilue 500 ng d'ARN totaux dans de l'eau pour un volume final de 25 µL. Ils sont ensuite incubés pendant 10 minutes à 25°C puis 2 heures à 37°C en présence de 25 µL de mélange réactionnel de « *High Capacity Reverse Transcription Kit 2X* » préalablement préparé comme indiqué ci-dessous.

Tableau 2 : Préparation du mélange réactionnel « *High Capacity Reverse Transcription Kit 2X* » pour 1 réaction

Réactifs	Tampon RT	Tampon dNTP	Amorce aléatoire	RNaseOUT™	RT	H_2O
Volume	5 µL	2 µL	5 µL	0,5 µL	2,5 µL	10 µL

c. RT-PCR quantitative en temps réel

L'effet des différents traitements est évalué par PCR quantitative en temps réel avec le bloc de 96 puits adapté à l'appareil 7900HT et les réactifs de chez Life Technologies-Applied.

Les amorces « *TaqMan gene expression assay 20X* » utilisées sont :

- La bêta-2-microglobuline (ß2M) comme gène de ménage
- Gène cible TIEG-1

Tableau 3 : Préparation du mélange réactionnel pour 1 réaction

Réactifs	Volume
TaqMan Fast universal PCR master mix (2X) (Réf 4364103)	10 µL
TaqMan gene expression assay 20X	1 µL
H_2O (sans RNase)	4 µL

On place les 15 µL du mélange ans les puits d'une plaque 96 puits spécialement conçue pour l'appareil 7900HT, on ajoute 5 µL d'eau (pour le blanc) ou 5 µL de dilutions successives d'ADNc (pour la gamme) ou 5 µL d'échantillons dans les puits correspondants.

La PCR quantitative en temps réel peut être exploitée si l'efficacité des amorces est comprise entre 90% et 110%.

Dans la méthode de qPCR, la quantification est effectuée en utilisant la méthode comparative de ΔCt : la quantification relative (RQ). Cette méthode détermine le Ct (Cycle threshold) de chaque gène.. Ce Ct est normalisé par rapport au Ct d'un gène de ménage (dans notre étude Beta-2-microglobuline) qui est étudié en parallèle sur la carte.

1.4. Résultats

Les résultats (figure 1) sont présentés en moyenne sur n=3 avec les écart-types. Le test t de Student a été utilisé pour comparer l'effet entre les cellules traitées et contrôles (non traités ou excipient).

Les résultats de la figure 1 représentés par une étoile sont considérés comme significatifs pour $p<0,05$.

Le TGFβ1 favorise significativement l'expression du gène TIEG-1 dans les KHN.

Le traitement par chacun des actifs testés séparément ne stimule pas l'expression de TIEG-1. Par contre l'association des 2 (ROMext + ALBZ) favorise une augmentation significative à 2h de 72% et à 6h de 25% (Figure 1).

L'association des extraits de romarin et d'*Albizia julibrissin* présente une synergie d'activité si on la compare aux résultats obtenus pour chacun des actifs testés séparément.

Ce résultat inattendu permet d'envisager l'utilisation de la combinaison précitée dans des compositions de soin cosmétique de la peau pour limiter l'apparition des signes de vieillissement cutané intrinsèque ou extrinsèque.

L'association de l'extrait de Romarin (ROMext) enrichi en USRO et de l'extrait d'écorce d'*Albizia julibrissin* augmente significativement l'expression de TIEG-1 de 72% à 2h et de 25% à 6h pour les KHN.

Exemple 2 : Etude de l'expression de la protéine TIEG-1 par Western Blot sur les Fibroblastes Humains (FHN)

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet de l'association d'un extrait de Romarin riche en acide Usolique (URSO) et l'extrait d'*Albizia Julibrissin* sur l'expression de la protéine de TIEG-1 par Western Blot.

2.1. Matériels et Méthodes

Voir exemple 1, point 1.1.

2.2. Traitements des FHN

Les FHN sont ensemencés dans le milieu de culture approprié sans antibiotique, DMEM 1g/L de glucose avec 10% SVF (sérum de veau fœtal) à une densité d'ensemencement de $0{,}200 \times 10^6$ cellules/puits, en plaque 6 puits.

Les cellules sont ensuite traitées avec les extraits préparés extemporanément dans du milieu de culture approprié sans antibiotique et sans SVF afin d'en extraire les protéines.

2.3. Préparation des Réactifs et échantillons

Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : récapitulatif des anticorps et protéines recombinantes utilisés

Cible (anti-)	MW (kDa)	Espèce	Dilution à utiliser	Fabricant
TIEG-1	53	lapin	1/200^{e}	Abcam
b-Actine	42	souris	1/2500e	Abcam
α-souris couplé HRP	-		1/5000e	Bio-Rad
α-lapin couplé HRP	-		1/5000e	Bio-Rad

2.4. Préparation des extraits protéiques et dépôt sur gel

L'extraction des protéines totales se fait directement dans le tampon de dépôt qui est adapté au nombre de cellules obtenues. Pour ce faire, les cellules sont trypsinées et collectées en tube 15 mL pour être comptées via le compteur « *Vi-Cell Coulter* » pour en déterminer le nombre total. Les cellules sont ensuite culotées à 1 million après lavage au PBS dans des microtubes pour être lyser avec le tampon de dépôt (Tableau) (100µL de tampon pour 1 million de cellules).

Tableau 5 : Tampon de lyse-LDS à 1X

LDS 1X + 2% β-Mercaptoethanol + 5% Benzonase	1 mL
LDS 4X (Life Technologies)	250 µL
β-Mercaptoétahnol (Sigma)	20 µL
Benzonase Novagen (Merck Millipore)	50 µL
Eau MilliQ	680 µL

Avant le dépôt, les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 5 min afin de les dénaturer. On dépose 10µL de chaque lysat dans les gels SDS-PAGE pour correspondre à 100 000 cellules/piste (Tableau 6).

Tableau 6 : Les gels SDS-PAGE utilisés

	gels	puits	fournisseur
Test 2	Bis-Tris 12% de polyacrylamide	26	Bio-Rad

Un marqueur est déposé en parallèle des échantillons, le « *Precision Plus Protein™ WesternC™* » (Bio-Rad) qui peut être visualisé en visible, fluorescence et chimiluminescence.

2.5. Western Blot

L'électrophorèse est réalisée à l'aide de la cuve « *Criterion™ Cell* » de Bio-Rad qui permet de migrer 2 midi-gels précoulés. Le tampon de migration utilisé est le tampon MES (Bio-Rad). La migration se fait à 200V constant pendant 35 minutes pour les mini gels et 45 minutes pour les midi-gels. Aussitôt, les gels peuvent être démoulés pour réaliser le transfert en cuve.

Le transfert permet d'imprimer les protéines contenues dans le gel sur une membrane de nitrocellulose de 0,2µM (Bio-Rad). Le système utilisé pour ce transfert est le « *Criterion™ Blotter* » de Bio-Rad pouvant accueillir 2 midi-gels ou 4 mini gels. Le tampon de transfert utilisé est le tampon Tris/Glycine (Bio-Rad) contenant 20% de méthanol.

Les membranes sont placées dans une solution de saturation, « *Blotting Grade Blocker* » à 5% (Bio-Rad) pendant 1h sous agitation à température ambiante. Puis, les membranes sont incubées toutes la nuit à +4°C sous agitation dans la solution d'anticorps primaire préparée dans la solution de saturation.

Le lendemain après plusieurs lavages au TBS-T (« *Tris Buffer Saline* » (Sigma) contenant 0,1% de Tween20 (Bio-Rad ; 161-0781)), les membranes sont incubées dans l'anticorps secondaire couplé à une enzyme HRP (HorseRadish Peroxydase) pendant 1h sous agitation à température ambiante.

Après les lavages dans le TBS-T, les membranes sont mises en contact avec la solution de révélation contenue dans le kit « Super Signal Pico » (Pierce Thermo Scientific). L'HRP des anticorps secondaires catalyse l'oxydation du luminol contenu dans la solution de révélation en lumière. Cette émission de lumière est visualisée par la caméra CCD MyECL Imager (Thermo).

Les images obtenues sont analysées par un logiciel adapté permettant de mesurer l'intensité des bandes pour déterminer le ratio d'expression par rapport à une protéine de référence, l'actine.

2.6 Résultats

Différents ratio des extraits de romarin et d'*Albizia julibrissin* ont été testés en cinétique (Tableau 7):

Tableau 7 : Les combinaisons d'extraits de romarin et d'*Albizia julibrissin* utilisés

Combinaison	Romarin (ROMex)	Albizia (ALBZ)
C1	1ppm	30ppm
C2	0,5ppm	30ppm
C3	1ppm	50ppm
C4	2ppm	30ppm

Les résultats (Figure 2) sont présentés en moyenne sur n=3 avec les écart-types. Le test t de Student a été utilisé pour comparer l'effet entre les cellules traitées et non traitées.

Les résultats avec un astérisque sont considérés comme significatifs pour $p<0,05$.

Pour les associations testées, des augmentations significatives de la cible sont observées à 6h. L'effet semble plus important lorsque la proportion en ALBZ est plus forte que ROMext.

2.7. Conclusion

Sur les FHN, une augmentation significative de l'expression protéique de TIEG-1 est observée avec les associations testées des extraits de romain et *Albizia julibrissin*.

L'effet est plus important lorsque la proportion en extrait d'*Albizia Julibrissin* est plus forte que l'extrait de Romarin (Figure 2).

Exemple 3. Expression de TIEG-1 dans un modèle de cicatrisation *in vitro*.

Il est possible d'obtenir par culture cellulaire, une surface couverte uniformément de cellules. Ce tapis peut être blessé en effectuant une déchirure par utilisation de la pointe d'un cône qui va racler le tapis cellulaire.

Sur ce modèle, on distingue 3 zones différentes : la zone de blessure correspondant à la zone raclée par la pointe de cône (zone C), une zone mixte c'est-à-dire la zone comprenant la zone limitrophe de la blessure (zone B) et une zone témoin sur le tapis cellulaire, éloignée de la zone blessée (Zone A) (Figure 3, A). L'expression de TIEG-1 a été révélée par immuno-marquage et quantifiée par analyse d'image dans les fibroblastes présents dans ces trois zones quand le processus de cicatrisation est amorcé.

Cette étude démontre que TIEG-1 est surexprimé significativement dans la zone de blessure C de 47% par rapport à la zone mixte B et de 53% par rapport à la zone témoin A (Figure 3, B).

Ceci indique que TIEG-1 est un acteur majeur du mécanisme de la mobilité cellulaire notamment fibroblastique, mécanisme majeur du processus de cicatrisation.

Exemple 4. Etude de l'expression protéique de TIEG 1 dans des FHN en culture soumis à un test de cicatrisation sous l'effet de l'association d'un extrait d'écorce d'*Albizia julibrissin*, d'un extrait de feuilles de romarin et Prodizia® et de gelée royale d'abeille noire d'Ouessant

L'expression de TIEG 1 a été évaluée sous l'effet d'un traitement par la combinaison d'un extrait d'écorce d'*Albizia julibrissin* (Prodizia®), d'un extrait de feuilles de romarin et de gelée royale d'abeille noire d'Ouessant dans un test de cicatrisation sur des FHN en culture.

4.1. Traitement des cellules

Des Fibroblastes Humains Normaux (FHN) sont ensemencés à raison de 80 000 cellules par boite de pétri 35 ibidi traité dans du milieu DMEM faible en glucose implémenté de 10% de SVF et d'un mélange d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine) et maintenues en culture pendant 48 heures, puis le milieu est changé et remplacé par du milieu déplété en SVF.

Après 24 heures de culture sans SVF, les FHN sont traités par la combinaison des trois ingrédients actifs préparés extemporanément (tableau 8).

Tableau 4 : Récapitulatif des ingrédients testés

Nom	Nom Fournisseur (Sederma)	Excipient	Dose Testée
Extrait d'écorce d'*Albizia Julibrissin*	Prodizia®	Eau	0,005% (50 ppm)
Extrait de feuilles de Romarin	Rosemary extract URSO	DMSO	0,067 (1ppm d'URSO)
Gelée Royale d'abeille noire d'Ouessant			100 µg/ml

Après 15 heures de traitement, une blessure sur le tapis de FHN de chaque boîte de Pétri est réalisée à l'aide d'un cône, en forme de croix.

24h après la blessure, le milieu de culture est éliminé et l'immunomarquage de TIEG-1 est réalisé.

Les cellules sont fixées à la formaline puis perméabilisées au triton (0,1%) pendant 10 minutes. Elles sont ensuite saturées avec du PBS/BSA 1% (« Phosphate Buffer Salin », « Bovin Serum Albumin ») pendant 30 minutes. L'anticorps primaire (anti-KLF10 de lapin; Abcam) est dilué au 1/200ème dans du tampon PBS-BSA 1% et incubé sur les cellules à température ambiante pendant 1 heure. Après rinçage par du PBS, l'anticorps secondaire (« Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG ») est dilué au 1/200ème dans du tampon PBS-BSA 1% et déposé à température ambiante pendant 1

heure à l'obscurité. Un marquage des noyaux au DAPI (dilué au 1/100ème) ainsi que des filaments d'actine à la phalloïdine 488 (diluée au 1/200ème) est réalisé en parallèle de l'incubation de l'anticorps secondaire.

Après rinçage au PBS, quelques gouttes de milieu de montage aqueux sont ajoutées. Les boites sont enfin stockées à 4°C en attente d'acquisition d'image au microscope à fluorescence.

4.2. Acquisition et analyse d'images

Les images sont réalisées avec un microscope confocal Leica SP5 II à l'objectif à air x20 à la résolution 1024 x 1024 pixels. Trois images sont faites en zone non blessée et trois images ou plus en zone blessée, avec les mêmes paramètres d'acquisition. Les images sont faites après excitation des fluorochromes par un laser spécifique : 1. laser à Argon (488 nm), 2. diode laser (405 nm) et 3. laser hélium-néon » (633 nm).

Après acquisition, les images sont analysées une par une grâce au logiciel Leica QWin, afin d'en obtenir une description quantitative.

Un programme d'analyse d'image permet une détection spécifique des noyaux et du marquage TIEG-1. La détection du marquage de TIEG-1 est réalisée dans le compartiment cytoplasmique et dans le noyau des cellules. Pour chaque condition, la quantification de TIEG-1 est mesurée dans la zone cicatricielle et dans la zone non blessée. Les valeurs de cette quantification sont systématiquement pondérées par le nombre de noyaux ou la surface cellulaire.

4.3. Résultats

L'expression de TIEG-1 a été analysée dans le compartiment nucléaire pour chaque condition de traitement et dans les deux zones à comparer : la zone de blessure, dite zone cicatricielle et la zone non blessée (Figure 4). Les résultats sont regroupés dans le tableau 9 ci-dessous :

Tableau 9 : Expression TIEG-1 pour différentes conditions de traitement dans la zone de blessure et la zone non-blessée

	Conditions de traitement	Expression TIEG-1 Noyaux/cellule	
		Moyenne	Ecart type
Zone non-blessée	Témoin non traité	12,9	0,6
	Albizia julibrissin + romarin + Gelée royale d'abeille noire	87,6	6,5
Zone cicatricielle	Témoin non traité	14,9	2,1

	Albizia julibrissin + romarin + Gelée royale d'abeille noire	107,9	15,4

L'étude de l'expression de TIEG-1 dans le compartiment nucléaire montre que la combinaison d'extraits et de gelée royale d'abeille noire d'Ouessant (gelée royale AN) selon l'invention induit une augmentation significative de l'expression nucléaire de TIEG-1 par rapport au témoin non traité de **+581%** dans la zone non blessée et de **+624%** dans la zone cicatricielle (Figure 4).

Par ailleurs, on note que le traitement par *Albizia julibrissin*, le romarin et la gelée royale d'abeille noire d'Ouessant augmente de 23% l'expression protéique de TIEG-1 dans le compartiment nucléaire des cellules de la zone cicatricielle par rapport à l'expression de TIEG-1 après traitement des cellules de la zone non blessée contre 16% pour le témoin non traité.

La combinaison de ces trois extraits présente un intérêt tout particulier pour une utilisation dans une composition cosmétique de soin destinée à contrer l'apparition de signes du vieillissement intrinsèque ou extrinsèque.

Exemple 5 : Crème riche comprenant la combinaison d'ingrédients actifs selon l'invention

Une crème fortement nourrissante et hydratante (riche) est préparée sous la forme d'une émulsion huile-dans-eau.

La formule de cette crème est indiquée ci-dessous, et les pourcentages sont indiqués en poids de l'ingrédient par rapport à la composition finale :

- Solution d'extrait de feuilles de romarin (*Rosemarinus officinalis*)	2,0
- Solution d'extrait d'écorce d'arbre à soie *(Albizia julibrissin)*	2,0
- Gelée royale d'abeille noire d'Ouessant	0,1
- Glycérine	7,5
- Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,3
- Gomme xanthane	0,2
- cetyl alcool/glyceryl stearate/PEG-75/ceteth/steareth-2	5,3
- C10-C18 triglycerides	5,0
- Coco-glycerides hydrogénés	2,5
- Alcool cétylique	1,0
- Polyisobutène hydrogéné	8,2
- Acide citrique	< 0,1
- Citrate trisodique	0,14
- Tocopheryl acetate	0,2
- Adjuvants (parfums, agent neutralisant, conservateurs)	Qs
- Eau purifiée	Qsp 100%

L'extrait d'écorce *d'Albizia julibrissin* est sous la forme d'une solution dudit extrait (45% en poids sec d'extrait) dans le glycérol, commercialisée sous la dénomination commerciale Prodizia® par la société SEDERMA. L'extrait de romarin est un extrait méthanolique de feuilles de romarin. Cet extrait est séché pour être mis en solution à 2% en poids sec dans un mélange butyleneglycol/glycérol, titré à 1500ppm en acide ursolique.

La phase grasse est préparée à chaud. Une fois homogène, elle est dispersée dans la phase aqueuse contenant la combinaison des ingrédients actifs selon l'invention.

Exemple 6 : Sérum comprenant la combinaison d'ingrédients actifs selon l'invention

La formule du sérum est indiquée ci-dessous et les pourcentages sont indiqués en poids de l'ingrédient par rapport à la composition finale :

- Solution d'extrait de feuilles de romarin	2,0
- Solution d'extrait d'écorce d'*Albizia julibrissin*	2,0
- Gelée royale d'abeille noire d'Ouessant	0,1
- Cetearyl isononanoate	7
- Steareth-2	0,5
- Steareth-21	0,5
- Esters de jojoba	1,5
- Butylene glycol	1,0
- Glycérol	6,0
- Hyaluronate de sodium	0,1
- Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,3
- Gomme xanthane	0,1
- Acide citrique	< 0,1
- Citrate trisodique	0,1
- Polymethyl methacrylate	1,8
- Tocopheryl acetate	0,2
- Adjuvants (parfums, alcalinisant, conservateurs)	qs
- Eau purifiée	qsp 100

Les extraits de romarin et d'*Albizia julibrissin* sont identiques à l'exemple 5.

Le sérum est appliqué sur le visage, en particulier sur les zones présentant des signes de vieillissement.

Outre sa texture agréable à l'application, il présente une efficacité anti-âge remarquable, notamment pour ralentir l'évolution des signes de vieillissement intrinsèque ou extrinsèque.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Gumez L. *et al.*, J. Appl. Physiol., 2010, 108, 1706-1710

Paul Martin, Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration, Science, 1997, 276, 5309, pp. 75-81.

Snyder L.R. Journal Of Chromatography, vol. 92, 1974, pages 223 - 230

Subramaniam M. *et al.* Mol. Cell. Biol., 2005, 1191-1199

Subramaniam M. *et al.*, Biofactors, 2010, 36, 8-18

Taguchi M. *et al.*, J. Musculoskelet. Res., 2008, 11, 63-69

REVENDICATIONS

1. Composition cosmétique caractérisée en ce qu'elle comprend un extrait d'*Albizia Julibrissin*, un extrait de romarin et de la gelée royale d'abeille noire d'Ouessant dans un milieu cosmétiquement acceptable.

2. Composition cosmétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit extrait d'*Albizia Julibrissin* est un extrait d'écorce d'*Albizia Julibrissin*.

3. Composition cosmétique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit extrait de romarin est un extrait de feuilles de romarin.

4. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comprend :
   - l'extrait d'*Albizia julibrissin* à une concentration comprise entre 0,001% et 5%, préférentiellement 0,01% et 3% et plus préférentiellement encore à 2% en poids de la composition totale;
   - l'extrait de romarin à une concentration comprise entre 0,001% et 5%, préférentiellement 0,01% et 3% et plus préférentiellement encore à 2% en poids de la composition totale; et
   - la gelée royale d'abeille noire d'Ouessant à une concentration comprise entre 0.001% et 1% préférentiellement entre 0,005% et 0,5% et plus préférentiellement encore entre 0,05% et 0,2% en poids de la composition totale.

5. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour son utilisation topique destinée à stimuler la régénération de la peau et/ou la cicatrisation.

6. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite composition comprend un ou plusieurs excipients cosmétiquement acceptables.

7. Composition cosmétique selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit excipient cosmétiquement acceptable est sélectionné parmi des polymères, des agents tensioactifs, des agents de rhéologie, des parfums, des électrolytes, des ajusteurs de pH, des agents anti-oxydants, des conservateurs, des colorants, des nacres, des pigments et leurs mélanges.

8. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, en ce qu'elle est sous forme émulsions huile-dans-eau ou eau-dans-huile, crème, huile, lait, lotions, sérum, préférentiellement sous forme de crème ou de sérum.

9. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, en ce qu'elle comprend en outre un miel ou un extrait de miel unifloral ou polyfloral, préférentiellement un miel de trèfle (*Trifolium repens*) ou d'euphorbe.

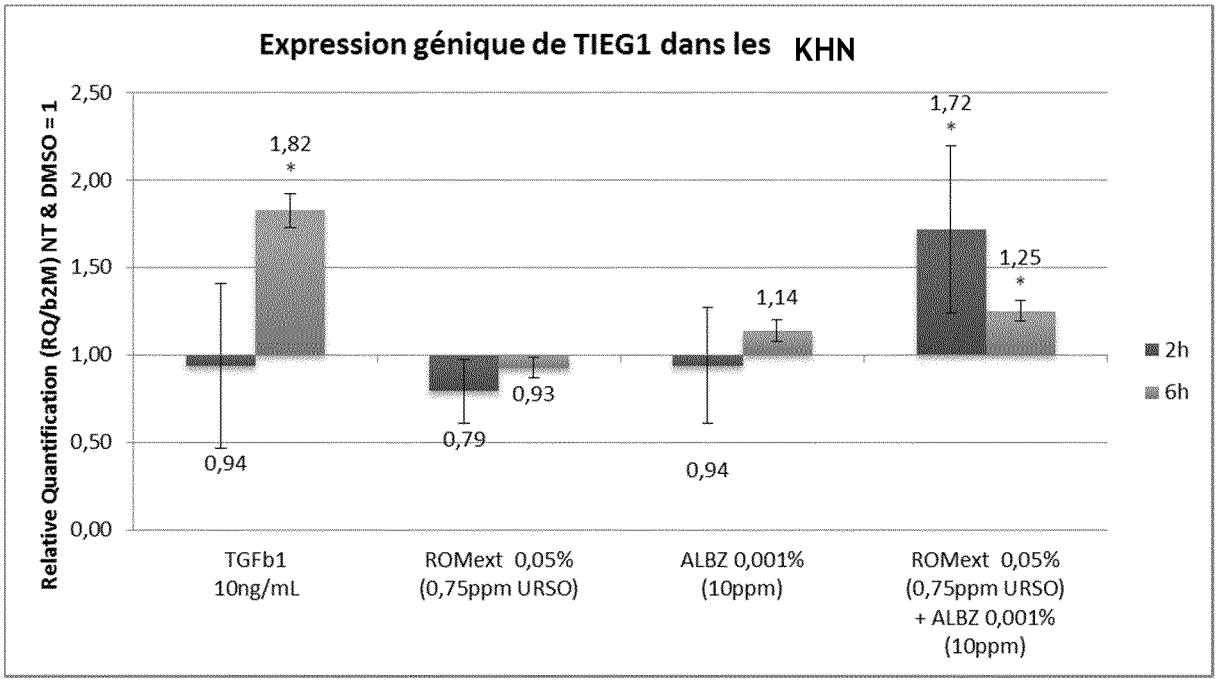

Expression génique de TIEG1 dans les KHN
Relative Quantification (RQ/b2M) NT & DMSO = 1
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
1,82
*
0,94
0,79
0,93
0,94
1,14
1,72
*
1,25
*
2h
6h
TGFb1 10ng/mL
ROMext 0,05% (0,75ppm URSO)
ALBZ 0,001% (10ppm)
ROMext 0,05% (0,75ppm URSO) + ALBZ 0,001% (10ppm)

Figure 1

A

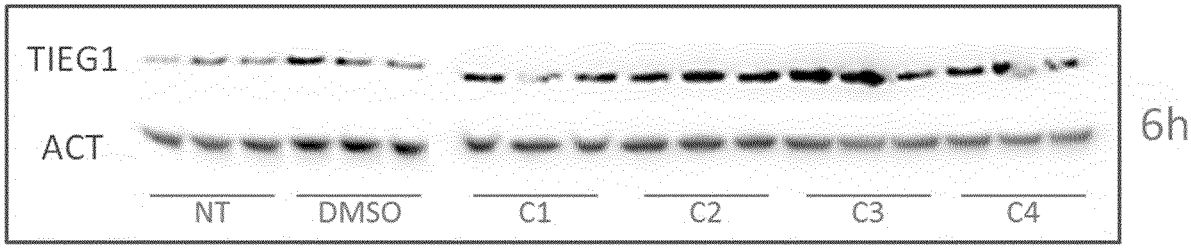


Figure 2

B

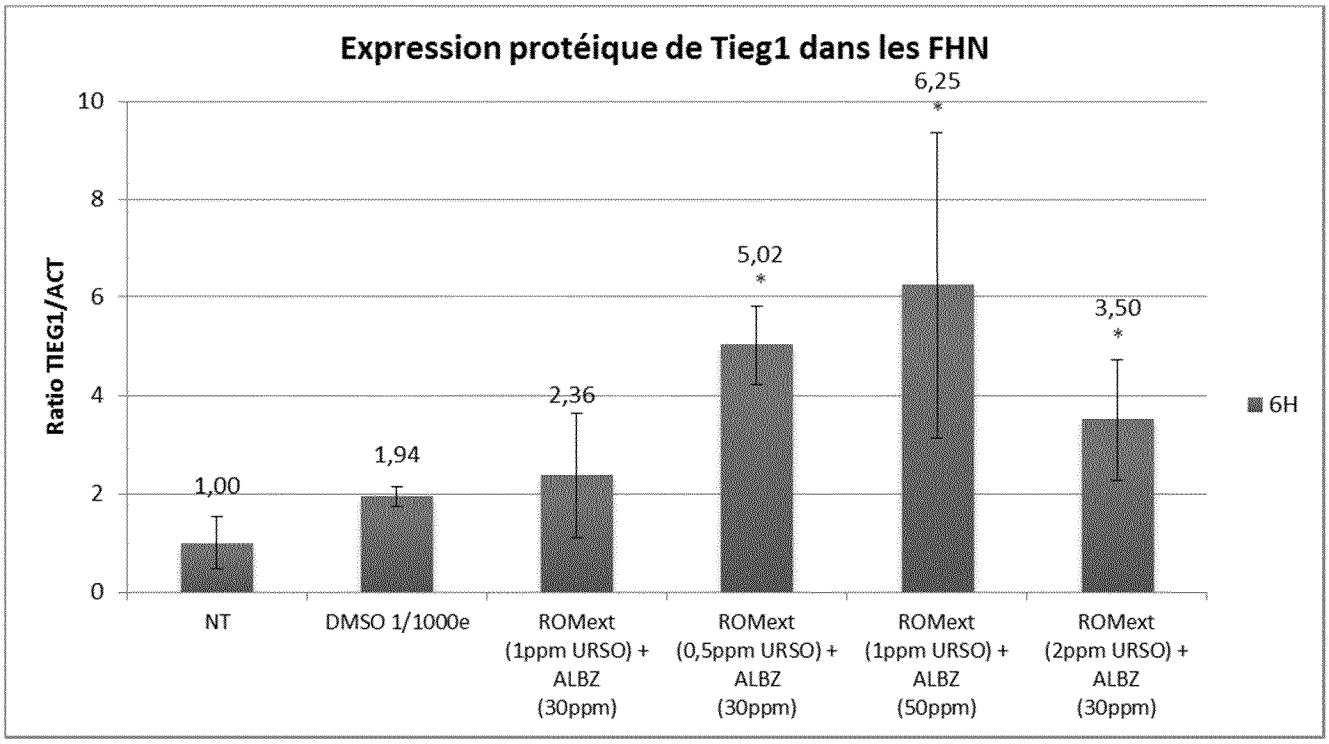
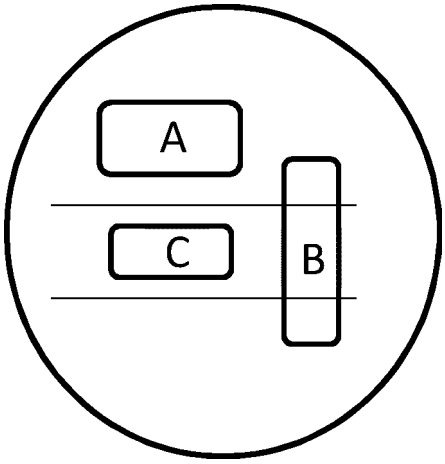


Figure 2

A



A: en dehors de la blessure
B: blessure et en dehors de la blessure
C: blessure

B

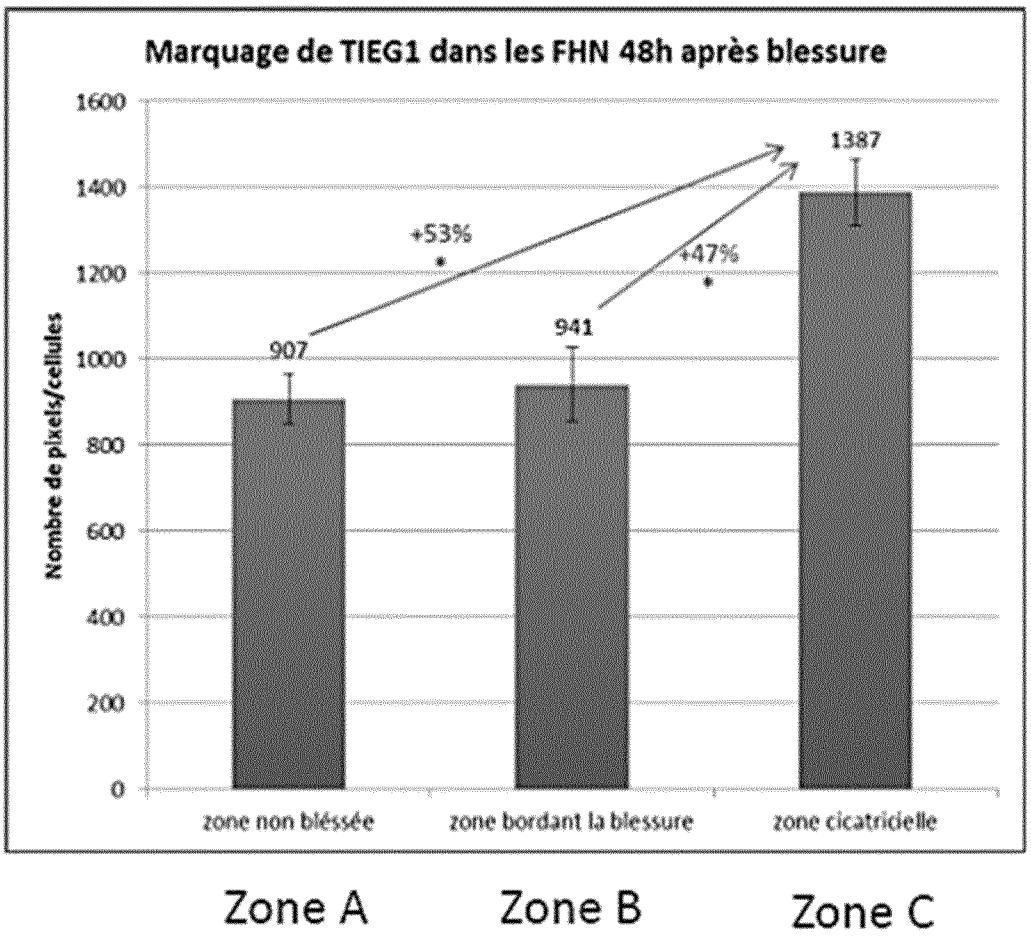


Figure 3

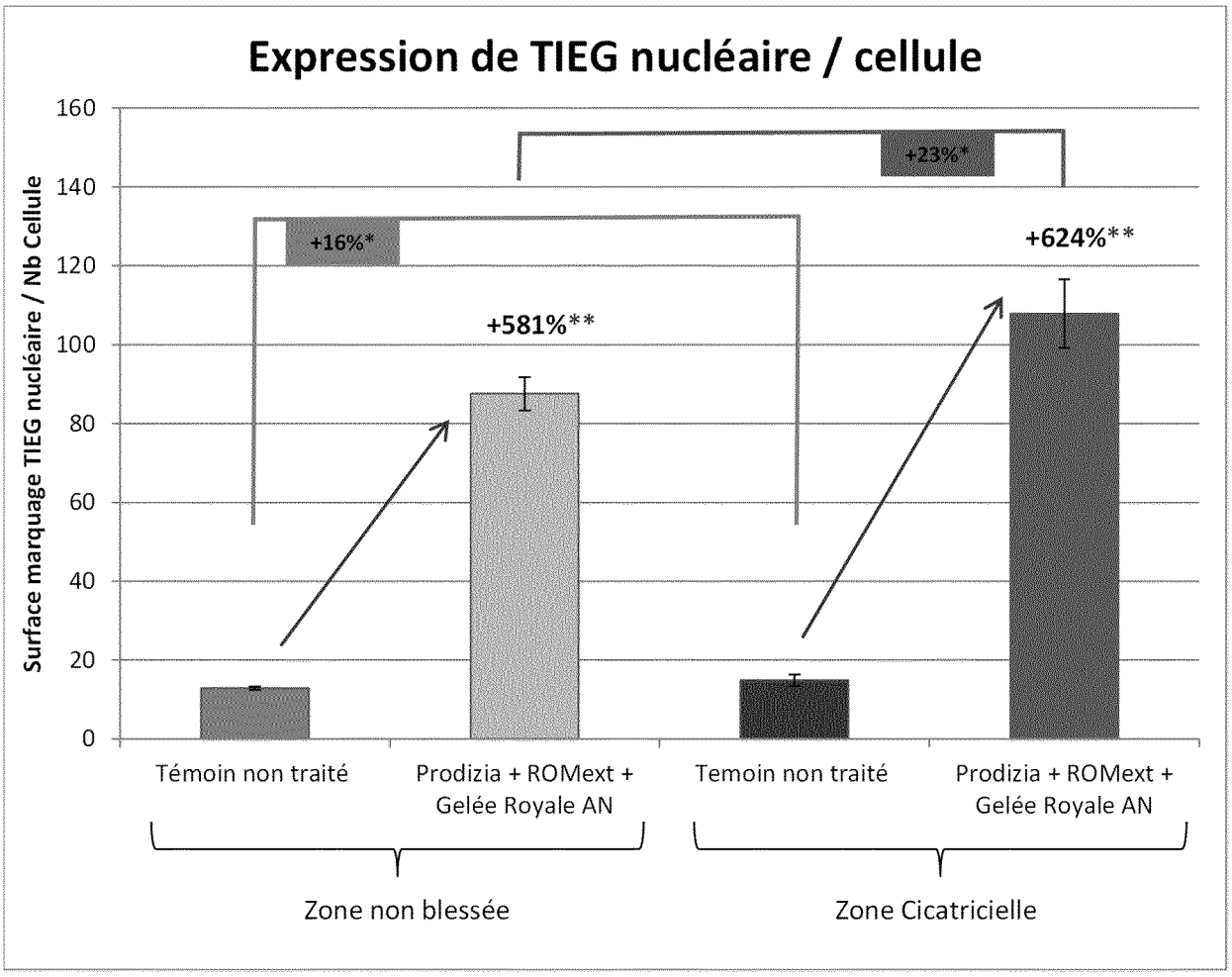

Expression de TIEG nucléaire / cellule
Surface marquage TIEG nucléaire / Nb Cellule
160
140
120
100
80
60
40
20
0
+16%*
+23%*
+581%**
+624%**
Témoin non traité
Prodizia + ROMext + Gelée Royale AN
Temoin non traité
Prodizia + ROMext + Gelée Royale AN
Zone non blessée
Zone Cicatricielle

Figure 4

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveauté) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.
Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

[x] Le demandeur a maintenu les revendications.

☐ Le demandeur a modifié les revendications.

☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

[x] Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; 10 février 2016 (2016-02-10), "Rich Day Cream Firming, Wrinkle Minimizing, Radiance", XP002772208, Database accession no. 4329035

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; septembre 2015 (2015-09), "Gold Eyetech Eye Sculpt Serum", XP002772209, Database accession no. 3398269

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; novembre 2013 (2013-11), "Face Treatment Oil", XP002772210, Database accession no. 2238472

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; 9 février 2010 (2010-02-09), "Youth Serum", XP002772211, Database accession no. 1396935

US 2009/068128 A1 (WADDINGTON TAUNA A [US]) 12 mars 2009 (2009-03-12)

EP 1 438 964 A1 (HAYASHIBARA BIOCHEM LAB [JP]) 21 juillet 2004 (2004-07-21)

US 2011/268812 A1 (CAUCHARD JEAN-HUBERT [FR] ET AL) 3 novembre 2011 (2011-11-03)

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; 3 février 2001 (2001-02-03), "Ultimate Repair Cream", XP002772212, Database accession no. 3852597

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; avril 2016 (2016-04), "Extraordinary Oil-Cream", XP002772213, Database accession no. 3927391

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; octobre 2016 (2016-10), "Rejuvenating Overnight Cream", XP002772218, Database accession no. 4308739

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

NEANT

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

NEANT