

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 953 401

②1 N° d'enregistrement national : **09 05904**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 8/97** (2006.01), A 61 K 36/61, A 61 Q 19/00,
A 61 P 17/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 07.12.09.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 10.06.11 Bulletin 11/23.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : L'OCCITANE Société anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : MILLOU YVES, PIERRISNARD JEAN
LOUIS, FONTES KATIA et TOUREL CECILE.

⑦3 Titulaire(s) : L'OCCITANE Société anonyme.

⑦4 Mandataire(s) : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES.

⑤4 COMPOSITION COSMETIQUE OU DERMATOLOGIQUE A BASE D'HUILE ESSENTIELLE D'IMMORTELLE ET
D'HUILE ESSENTIELLE DE MYRTE ET SON UTILISATION.

⑤7 La présente invention se rapporte à une composition
cosmétique ou dermatologique et son utilisation pour lutter
contre les effets du vieillissement de la peau, en améliorant
la nutrition et la régénération cutanée, la longévité cellulaire,
l'éclat, l'uniformité du teint et l'aspect des tâches de pigmen-
tation.

La présente invention se rapport également à une mé-
thode de traitement cosmétique comprenant une étape
d'application sur la peau d'un sujet d'une quantité efficace
de la composition.

FR 2 953 401 - A1



**COMPOSITION COSMETIQUE OU DERMATOLOGIQUE A BASE
D'HUILE ESSENTIELLE D'IMMORTELLE ET D'HUILE ESSENTIELLE
DE MYRTE ET SON UTILISATION**

5

Domaine technique

La présente invention se rapporte à une composition cosmétique ou dermatologique et son utilisation pour lutter
10 contre les effets du vieillissement de la peau, en améliorant la nutrition et la régénération cutanée, la longévité cellulaire, l'éclat, l'uniformité du teint et l'aspect des tâches de pigmentation.

La présente invention se rapport également à une méthode
15 de traitement cosmétique comprenant une étape d'application sur la peau d'un sujet d'une quantité efficace de la composition.

Dans la description ci-dessous, les références entre crochets ([]) renvoient à la liste des références présentée à la
20 fin du texte.

Etat de la technique

Le vieillissement est un phénomène physiologique lent qui démarre à la maturité humaine, soit vers une quinzaine
25 d'années, avec une certaine non évolution jusqu'à 25-30 ans. Les premières manifestations extérieures apparaissent vers une trentaine d'années, pour évoluer et s'accélérer vers 45-50 ans.

Le vieillissement est également un processus
30 multifactoriel, qui se marque par l'apparition de nombreux signes extérieurs, variables selon les individus en fonction de

l'impact génétique propre à chacun. On parle alors de vieillissement biologique intrinsèque, encore appelé vieillissement naturel chrono-biologique.

Par ailleurs, le vieillissement est accéléré selon l'influence
5 des possibles agresseurs environnementaux tels que le soleil, la pollution, le stress, etc. On parle alors de vieillissement photo-induit ou de vieillissement actinique.

La baisse de la synthèse des lipides est à l'origine des ridules et premières rides. Avec l'âge, les variations
10 hormonales entraînent une diminution de l'activité sécrétrice des glandes sébacées. La peau devient plus sèche.

Les atteintes du vieillissement biologique cutané touchent tous les organes, tous les tissus et toutes les cellules constitutives de ces derniers. Ces atteintes seront
15 prédominantes et plus marquées dans le tissu conjonctif dermique. C'est l'atteinte fonctionnelle des fibroblastes qui semble jouer le rôle le plus important dans la genèse du vieillissement cutané. La baisse de la synthèse des fibres de collagène, de glycosaminoglycanes, laminine etc. et la baisse
20 de fonctionnalité de l'élastine sont à l'origine des rides profondes.

Après 45 ans, et plus spécialement au-delà de 55 ans, relâchement et aspect fripé de la peau sont les phénomènes qui apparaissent. La peau s'amincit, devient fine et atone et
25 subit une atteinte généralisée des structures de soutien mécanique ce qui conduit à un relâchement cutané généralisé marqué : peau moins tendue, moins élastique, moins ferme, moins tonique et moins résistante, peau plus dure, plus raidie. La diminution des fibres de soutien, leur rigidification et
30 l'affaissement de la jonction dermo-épidermique en sont à l'origine. La peau a moins de résistance sous l'action de la

pesanteur. Les marques de sensibilité sanguine et taches hypopigmentaires ou hyper-pigmentaires sont aussi les signes de dérèglements internes.

De nombreuses recherches scientifiques portent sur l'étude
5 du vieillissement mais également sur celle de la longévité.

Mc Cay dans ses expériences a montré dès 1930 que les levures, sous restriction calorique voyaient leur durée de vie s'allonger de façon significative et reproductible. A cette date-là, il ne savait pas encore que le gène de longévité SIR2
10 (Silent Information Regulator 2) est activé sous restriction calorique.

En 2000, l'équipe de Leonard P. Guarente, professeur de biologie au Massachusetts Institute of Technology aux USA identifie ce gène de longévité [1] (Lin, S.J et al. Science 2000)

15 En 2004, Frédéric Picard découvre avec ses collègues du Massachusetts un gène homologue chez les mammifères (souris), le SIRT-1 [2] (Picard, F et al. Nature 2004)

En 2005, Eriko Michishita du National Cancer Institute de Bethesda aux USA montre que les fibroblastes humains vieillissants
20 présentent une expression réduite de la protéine SIRT-1 [3] (Michishita, E et al. Molecular biology of the cell 2005). Les cellules de la peau expriment donc les sirtuines, découverte majeure présentée au Congrès IFSCC de Florence en 2005.

25 Sept sirtuines ont été identifiées. SIRT-1, SIRT-2, SIRT-6 et SIRT-7 sont situées dans le noyau des cellules. SIRT-3, SIRT-4 et -5 sont localisées au niveau des mitochondries. La protéine SIRT-1 est la sirtuine humaine la mieux caractérisée à ce jour.

Pouvant vivre jusqu'à 300 ans, le myrte est un arbuste de la famille des Myrtacées, de 2 à 3 mètres de haut à fleurs blanches et odorantes et à feuilles toujours vertes parsemées de glandes contenant l'huile essentielle. Sa floraison a lieu
5 entre mai et juillet, son fruit ovoïde est peu charnu, noir-bleuâtre à maturité et à saveur âpre et résineuse assez agréable.

L'écorce rousse des tiges se détache par plaques et exhale comme toutes les autres parties de la plante une odeur
10 aromatique.

Le myrte est présent dans la frange littorale de la frontière italienne à la frontière espagnole, mais ce n'est pas une espèce très répandue sauf en Corse où il est bien commun.

Les fleurs, les feuilles et l'écorce sont donc aromatiques.
15 Les feuilles renferment en outre de la vitamine C et des flavonoïdes (myricétol et son rhamnoside). L'huile essentielle se trouve également dans les fruits à côté des acides citriques et maliques. L'huile essentielle est incolore à vert jaune, très fluide, soluble dans l'alcool et l'éther et presque insoluble dans
20 l'eau. Parmi ses principes actifs, on peut noter : 1,8cinéole (45%) α -pinène (>25%), cinéol, camphène, linalol, géraniol, nérol, myrténol, méthyleugénol, acétate de linalyle, de myrtényle, aldéhydes et lactones.

Au 1^{er} siècle, Dioscoride prescrit les feuilles et baies
25 macérées dans le vin comme astringent, avec Pline, ils indiquent de nombreuses applications médicales qui montrent que les anciens avaient déjà deviné l'action antiseptique du myrte.

Au, XIXe siècle, Linarix (Paris, 1878) lui a consacré une
30 importante thèse exposant le parti qu'on pouvait tirer de l'alcoolature et de l'essence de myrte en thérapeutique. Grâce

à son huile essentielle le myrte jouit de propriétés antiseptiques, désinfectantes, parasiticide. Son composant, le myrtol agit dans les bronchites, favorisant l'expectoration, une plus grande amplitude à la respiration et un apaisement de la
5 toux. Linarix précise aussi que l'action du myrte sur les affections cutanées squameuses rebelles -principalement sur le psoriasis- est également assez marquée.

Jadis, on employait ses fruits et ses feuilles comme tonique. On préparait par distillation avec ses feuilles et ses
10 fleurs, une eau cosmétique, dite "eau d'ange". Cette « eau d'ange » fait partie de nos anciennes eaux de toilette et reste réputée en Italie et en Grèce.

Par ailleurs, FR01/11224 [4] en date du 3 décembre 2004
15 et FR06/05953 [5] en date du 26 septembre 2008, présentant notamment les propriétés de l'huile essentielle d'immortelle, en association avec d'autres actifs définis, décrivaient déjà par des études in-vitro les actions :

- Effet anti-radicalaire
- 20 • Stimulation de la production de collagène I
- Stimulation de la microcirculation cutanée
- Stimulation de la synthèse de l'ATP pour accélérer le renouvellement cellulaire
- Stimulation de la prolifération des kératinocytes pour
25 réparer les tissus
- Inhibition de la mélanogénèse
- Réduction de la couleur de la mélanine existante
- Effet anti-collagénase

Si différentes compositions ont été mises au point dans
30 l'art antérieur, aucune n'apporte une réponse globale pour

combattre les signes de l'âge et présentant simultanément, en plus des propriétés citées précédemment et développées dans FR01/11224 [4] et FR06/05953 [5], une action de :

- 5 • stimulation de la synthèse du collagène III par les fibroblastes
- augmentation de la production de SIRT-1 (Sirtuine 1) par des fibroblastes âgés
- stimulation de la production des protéoglycanes

10 Il existe donc encore aujourd'hui un réel besoin d'une composition permettant d'apporter une action globale nourrissante, régénérante, éclaircissante et retardant le relâchement de la peau en agissant plus particulièrement encore sur la longévité cellulaire.

15 **Description de l'invention**

La présente invention répond précisément à ce besoin en fournissant une composition cosmétique ou dermatologique comprenant :

- 20 - une huile essentielle de myrte,
- au moins une huile végétale riche en oméga-3 et en oméga-6,
- au moins un minéral, choisi dans le groupe comprenant le sodium, le calcium ou le magnésium,
- 25 - au moins un oligoélément choisi dans le groupe comprenant le zinc, le cuivre ou le fer,
- 30 - au moins de la vitamine C ou un dérivé de celle-ci.

Dans la présente, sauf indication contraire, la concentration des composés est exprimée en pourcentage en poids par rapport au poids total de la composition.

L'au moins une huile végétale riche en oméga-3 et en oméga-6 peut être, par exemple, une huile d'échium, de cameline, d'onagre, de bourrache de colza, de noix, de pépins de raisin ou de germe de blé. La concentration totale d'huile végétale riche en oméga-3 et en oméga-6 peut aller de 0,1 % à 10 %, par exemple de 0,1 % à 5 %, par exemple de 0,1 à 3 %. Par exemple, les concentrations respectives d'huile d'échium, de cameline, d'onagre ou de bourrache peuvent aller chacun de 0,1 % à 10 %, par exemple de 0,1 % à 5 %.

10 L'huile essentielle de myrte, peut être par exemple, une huile essentielle de myrte vert, par exemple une huile essentielle de myrte vert corse. Cette huile peut par exemple être une huile biologique. La concentration en huile essentielle de myrte peut aller, par exemple, de 0,001 % à 2 %, par exemple de 0,01 % à 1 %.

La composition selon la présente invention peut en outre comprendre des sphérulites d'huile essentielle de myrte, par exemple, d'huile essentielle de myrte vert, par exemple d'huile essentielle de myrte vert corse, par exemple d'huile essentielle biologique de myrte vert corse. La concentration en sphérulites d'huile essentielle de myrte peut, par exemple aller de 0,05 % à 7 %, par exemple de 0,1 % à 3 %.

Avantageusement, selon l'invention, la composition peut comprendre une huile essentielle d'immortelle, par exemple, 25 une huile essentielle d'immortelle corse. Cette huile peut par exemple être une huile biologique. La concentration en huile essentielle d'immortelle peut aller, par exemple, de 0,001 % à 2 %, par exemple de 0,01 % à 1 %.

La composition selon la présente invention peut en outre 30 comprendre des sphérulites d'huile essentielle d'immortelle, par exemple, d'huile essentielle d'immortelle corse, par

exemple d'huile essentielle biologique d'immortelle corse. La concentration en sphérulites d'huile essentielle d'immortelle peut, par exemple aller de 0,05 % à 7 %, par exemple de 0,1 % à 3 %.

5 On entend par « sphérulites », des vésicules composées d'une alternance de bicouches de lipidique d'environ un micron.

 Suite à des travaux effectués par la Demanderesse, il a été démontré que l'association d'huiles essentielles d'immortelle et de myrte développe une synergie bénéfique aux
10 soins de la peau qui agit plus particulièrement de manière globale pour lutter contre tous les effets du vieillissement sur le visage et le cou en améliorant la nutrition et la régénération cutanée, la longévité cellulaire, l'éclat, l'uniformité du teint et l'aspect des tâches pigmentaires.

15 L'extraction de des huiles essentielles d'immortelle ou de myrte peut classiquement être effectuée à l'aide d'un générateur de vapeur d'où le fluide vaporisé est conduit par une tubulure dans le fond d'une chambre d'extraction dans laquelle sont enfermés les végétaux. Cette installation est
20 reliée à un dispositif de maintien de pression régulée. Les fluides d'extraction sont alors conduits dans un serpentin de refroidissement. La séparation finale des fluides d'extraction et des composants des huiles essentielles s'effectue à la pression atmosphérique par différence de densité.

25 La concentration en vitamine C ou de l'un de ses dérivés peut aller, par exemple de 0,5 % à 10 %, par exemple de 0,5 à 5 %.

 La concentration totale en oligoélément peut aller de 0,001 % à 5 %, par exemple de 0,001 % à 1 %, par exemple de 0,1 à
30 0,5 %. Par exemple, les concentrations respectives de

magnésium, de cuivre ou de zinc peuvent aller chacune de 0,001 % à 5 %, par exemple de 0,001 % à 1 %.

La composition selon la présente invention peut en outre comprendre d'autres actifs généralement utilisés en cosmétique ou dermatologie, par exemple des agents hydratants, restructurants ou apaisants. Ces actifs s'ils sont présents, peuvent être présents à une concentration allant de 0,1% à 50%, par exemple de 0,15% à 25%.

Par exemple, la composition selon la présente invention peut en outre comprendre toute teneur appropriée en oligo-éléments, vitamines, en huiles et en huiles essentielles d'immortelle et de myrte pour obtenir les effets fermeté, anti-relâchement, pro collagène I pro collagène III production de SIRT-1 et stimulation des protéoglycanes.

Les différents composés de la composition de la présente invention peuvent être libres ou inclus dans des microsphères à libération retardée de façon à créer un effet de rémanence.

La composition selon l'invention peuvent se présenter sous toute forme connue de l'homme du métier dans le domaine de la cosmétique et de la dermatologie, comme par exemple, une crème, un lait, une lotion, un gel, un masque, sans aucune restriction galénique particulière autre que celle de la compatibilité avec la composition de l'invention et pour l'application sur la peau.

La présente invention se rapport également à un conditionnement comprenant une composition selon la présente invention et un manuel ou une notice d'utilisation.

La présente invention se rapport également à l'utilisation d'une composition selon la présente invention pour améliorer la

régénération cutanée, la longévité cellulaire retardant le relâchement de la peau, l'éclat de la peau, l'uniformité du teint, diminuer la taille des taches de pigmentation de la peau ou diminuer la couleur des taches de pigmentation de la peau.

5

En la présente invention se rapporte également à une méthode de soin cosmétique comprenant une étape d'application sur la peau d'un sujet d'une quantité efficace d'une composition selon la présente invention. L'homme du métier est tout à fait à même de déterminer la quantité de composition à utiliser et la fréquence d'utilisation.

10

D'autres avantages pourront encore apparaître à l'homme du métier à la lecture des exemples ci-dessous, illustrés par les figures annexées, donnés à titre illustratif.

15

Brève description des figures

- La figure 1 représente des photographies représentant le marquage du collagène III dans les fibroblastes,
 - (a) en absence de TGF- β et d'HE Im,
 - (b) en présence de TGF- β à une concentration de 10 ng/ml et en absence d'HE Im,
 - (c) en présence d'HE Im à une concentration de 8×10^{-5} % et en absence de TGF- β ,
 - (d) en présence d'HE Im à une concentration de 4×10^{-4} % et en absence de TGF- β .

20

25

« T » signifie « témoin » et « HE Im » signifie « huile essentielle d'immortelle biologique corse ».

- La figure 2 représente des photographies représentant le marquage de SIRT-1 dans les fibroblastes,
 - (a) en absence de resvératrol et d'HE My,

30

- (b) en présence de resvératrol à une concentration de 5 ng/ml et en absence d'HE My,
- (c) en présence d'HE My à une concentration de 2×10^{-4} % et en absence de resvératrol,
- 5 (d) en présence d'HE My à une concentration de 6×10^{-4} % et en absence de resvératrol,
- (e) en présence d'HE My à une concentration de 2×10^{-3} % et en absence de resvératrol,
- « T » signifie « témoin », « Res » signifie « resvératrol » et
- 10 « HE My » signifie « huile essentielle de myrte vert biologique corse ».

- La figure 3 est un graphique représentant le pourcentage de surface occupée par le marquage de SIRT-1 dans l'épiderme avant l'application d'un excipient « T », « E1 »,

15 « E2 », « P2 », « P7 » ou « P10 » (J0) et dix jours après l'application de cet excipient (J10).

En abscisse, « % s » représente le pourcentage de surface occupée par le marquage de SIRT-1 dans l'épiderme. « T », « E1 », « E2 », « P2 », « P7 » et « P10 » correspondent

20 respectivement au témoin, au perhydrosqualène, eau distillée, huile essentielle de myrte vert biologique corse à 0,5%, resvératrol à 0,1% et huile essentielle de myrte vert biologique corse à 0,5% + huile essentielle d'immortelle biologique corse à 0,5%.

25

EXEMPLES

Exemple 1 : Exemple de crème de soin du visage réalisée à partir de la composition de la présente invention

On prépare par mélange des différents composants, des crèmes ayant une composition décrite dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : exemple de composition pour le visage

Ingrédients	Quantité en pourcentage par rapport au poids total de la composition (%)
Stéarate de sucrose	0,5 à 6%
Distéarate de sucrose	0,5 à 6%
Triglycéride caprylique/caprique	3 à 20%
Alcool cetylique	0,5 à 4%
Huile d'échium	0,1 à 5 %
Huile de cameline	0,1 à 5 %
Huile d'onagre	0,1 à 5 %
Huile de bourrache	0,1 à 5 %
Huile essentielle de Myrte	0,001 à 1.5%
Sphérulites de myrte	0,1 à 3%
Huile essentielle d'Hélichryse	0,001 à 2.5%
Sphérulites d'Immortelle	0,1 à 3%
Magnésium	0,001 à 1%
Cuivre	0,001 à 1%
Zinc	0,001 à 1%
Acide ascorbique 2-Glucoside	0,5 à 2%
Acétate de tocophéryle	0,05 à 1%
Glycérine	0,5 à 10%
Gomme xanthane	0,1 à 0,5%
Parfum	qs
Conservateurs	qs
Eau	qsp 100%

5

Dans ce tableau, « qs » signifie « quantité suffisante » et correspond, par exemple, à la quantité de conservateurs à utiliser afin d'obtenir l'effet souhaité. « qsp » signifie « quantum satis » ou « quantité suffisante pour » et correspond à la quantité d'un produit à ajouter pour arriver à la composition finale.

10

Exemple 2 : Effet de l'huile essentielle d'immortelle biologique corse sur la production de collagène III par des fibroblastes dermiques humains normaux

5 A partir de 65 ans, il apparaît un déséquilibre marqué entre collagène fibrillaire I et III lié à l'augmentation relative du collagène de type I par rapport au collagène de type III qui lui tend à diminuer.

10 Les travaux réalisés par la Demanderesse dans le cadre de l'invention ont permis de mettre en évidence la capacité de l'huile essentielle d'immortelle biologique corse (composé HE immortelle Bio Corse) à augmenter la production de collagène III de 20% par marquage en immunofluorescence sur des fibroblastes dermiques humains normaux (NHDF), ce qui s'est
15 généralement contre les rides et plus généralement contre les dommages du temps.

I- Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude est de rechercher l'effet du composé HE immortelle Bio Corse sur la production de
20 collagène III par des NHDF.

L'objectif de cette étude est d'apprécier le pouvoir stimulation de la production de collagène III d'un actif cosmétique par des fibroblastes dermiques.

Dans la présente étude, l'activité du composé HE
25 immortelle Bio Corse sur la stimulation de la synthèse/maturation du collagène III a été évaluée par marquage en immunofluorescence sur NHDF.

II- Matériels et méthodes

30 **II.1- Modèle biologique**

- Type cellulaire :

Fibroblastes dermiques humains normaux (NHDF),

Référence **BIOalternatives** : pool PF2, utilisés au 9^{ème} passage

La dénomination PF2 signifie : Pool de Fibroblaste n°2.

5 Cette référence est préparée à partir de cultures primaires qui sont isolées et préparées par eux-même à partir de biopsie de peau.

L'obtention de fibroblastes, cellules adhérentes, à partir de biopsie de peau peut être mise en œuvre de la manière
10 suivante :

- le tissu est dissocié mécaniquement et enzymatiquement de façon séquentielle : on obtient une suspension de cellules que l'on peut purifier
- les cellules sont mises en culture : c'est la culture
15 primaire, on parle de passage 0
- elles sont repiquées lorsque ces cellules sont soumises à l'inhibition de contact et remise en culture (= ensemencé) (comme en microbiologie) : c'est la culture secondaire, on parle de passage n°1
20 et ainsi de suite

On réalise un repiquage d'une culture cellulaire en dissociant le tapis obtenu par action de la trypsine (ou d'autres enzymes protéolytiques) qui, en dégradant enzymatiquement les protéines d'adhésion, brisent les liens entre les cellules.

25

- Conditions de culture : 37°C, 5% CO₂

- Milieu de culture : DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle Medium ») complémenté avec : L-glutamine 2 mM ; Pénicilline 50 U/ml - Streptomycine 50 µg/ml ; Sérum de veau fœtal (SVF)
30 10%.

II.2- Composé testé : Huile essentielle d'immortelle biologique
Corse (Lot n°OC0611367 ; Réf. MPBi00116-3)

- Aspect : Liquide
- Stockage à température ambiante
- 5 - Solution stock : 1% en dyméthylsulfoxyde (DMSO)
- Dilution dans le milieu de culture
- Concentrations testées : 8×10^{-5} et 4×10^{-4} %

II.3- Référence : TGF- β

- 10 - Solution stock 2 $\mu\text{g/ml}$
- Dilution dans le milieu de culture
- Concentration testée : 10 $\mu\text{g/ml}$

II.4- Culture et traitement

- 15 Les fibroblastes ont été cultivés en plaques 96 puits en milieu de culture. A subconfluence, le milieu a été remplacé par du milieu de culture contenant ou non (témoin) le composé testé ou la référence. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 72 heures. Toutes les conditions ont été réalisées trois
- 20 fois.

II.5- Production de collagène III par des fibroblastes - immunofluorescence

- Après incubation, les milieux de culture ont été éliminés par
- 25 simple pipetage du milieu de culture suivi d'un rinçage.

- . Les cellules ont été rincées avec une solution de « phosphate buffered saline » (PBS) et fixées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4%. Après saturation des sites de liaison non spécifiques par incubation dans un tampon de PBS-Tween, albumine de sérum bovin (BSA) à 5%, les cellules ont
- 30

été marquées par un anticorps primaire dirigé contre le collagène III à température ambiante pendant 1 heure.

L'anticorps primaire a ensuite été révélé par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (GAR-Alexa 488) et les
5 noyaux des cellules ont été colorés par le Hoechst (bis-benzimide).

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide de l'appareil InCell Analyzer™1000 (GE Healthcare). Des contrôles sans anticorps primaire ont été réalisés afin de régler
10 les paramètres d'acquisition de la caméra. Pour chaque puits, 5 saisies d'images numérisées ont été réalisées. Le marquage a été quantifié en mesurant l'intensité de fluorescence (intégration des données numériques avec le logiciel Developer Toolbox 1.5, GE Healthcare).

15

III- Résultats

La référence TGF- β a significativement stimulé la production du collagène III par les fibroblastes.

Comme le montrent les résultats du tableau 2 ci-dessous,
20 le composé HE immortelle Bio Corse, testé à 8×10^{-5} % et 4×10^{-4} % a significativement stimulé la production du collagène III par les fibroblastes. Cette stimulation est d'au moins +19 % par rapport au témoin négatif.

25 **Tableau 2 : Effet de l'huile essentielle d'immortelle biologique Corse sur la production de collagène III par des fibroblastes**

Traitement Concentration	I / nb cell (UA)	Moy (UA)	% Tém	esm (%)	p
Témoin -	162 166 183	170	100	4	-

TGF-β 10 ng/ml	216 220 210	215	126	2	**
HE immortelle Bio Corse $8 \times 10^{-5} \%$	192 206 219	206	121	5	*
HE immortelle Bio Corse $4 \times 10^{-4} \%$	187 205 214	202	119	5	*

Dans ce tableau « I / nb cell » signifie « intensité de fluorescence par nombre de cellule » et est exprimé en unité arbitraire (UA). « moy » correspond à la moyenne de ces intensités, exprimé en UA. « % Tem » correspond à comparaison en pourcentage de l'intensité mesurée par rapport à celle du témoin. « esm % » correspond à « l'écart type de la moyenne ». « p » correspond au seuil de significativité statistique où « * » correspond à une valeur de p allant de 0,01 à 0,05 (significatif) et « ** » correspond à une valeur de p allant de 0,001 à 0,01 (très significatif).

Le composé HE immortelle Bio Corse a donc un effet stimulant sur la synthèse/maturation du collagène III par les fibroblastes dermiques humains normaux.

Exemple 3 : Effet de l'huile essentielle de myrte vert biologique corse sur l'expression de SIRT-1 par des fibroblastes normaux et par des fibroblastes âgés

Les travaux réalisés sur l'huile essentielle de myrte vert biologique corse (composé HE myrte vert Bio Corse) ont permis de mettre en évidence l'augmentation de la production de SIRT-1 par marquage en immunofluorescence sur fibroblastes, ce qui s'est avéré particulièrement utile pour stimuler l'action

de la protéine de longévité, contribuant à accroître la vitalité cellulaire et préservant l'aspect jeune de la peau.

I- OBJECTIF DE L'ETUDE

5 L'objectif de cette étude est d'apprécier l'effet du composé HE myrte vert Corse Bio sur la production de la Sirtuine 1 (SIRT-1) par des fibroblastes dermiques humains âgés (16^{ème} passage).

10 Dans la présente étude, l'activité du composé HE myrte vert Corse Bio sur la stimulation de la production de SIRT-1 a été évaluée par marquage en immunofluorescence et cela à la fois sur des fibroblastes dermiques normaux et des fibroblastes âgés traités ou non avec le composé à l'essai.

15 II- MATERIELS ET METHODES

II.1- Modèle biologique

- Type cellulaire :

Fibroblastes dermiques humains normaux (NHDF),

20 Référence **BIOalternatives** : « pool PF2 », utilisés au 16^{ème} (R16) passage

Après 15 à 25 passages, représentant entre 30 et 60 mitoses, on constate que les cellules vieillissent et cessent de se multiplier. Cette limite a été appelée « la limite d'Hayflick ». La limite de Hayflick a été découverte en 1965. Hayflick avait
25 observé que des cellules en mitose dans une culture cellulaire ne se divisaient que 50 fois avant de mourir. Quand des cellules approchaient cette limite, elles montraient des signes de sénescence.

Pour les besoins de ce projet, cette méthodologie a été
30 utilisée pour obtenir des cellules vieilles. Autrement dit les

fibroblastes de passage 8 ou 9 sont considérés comme normaux et les fibroblastes de passage 16 sont âgés.

- Conditions de culture : 37°C, 5% CO₂
- 5 - Milieu de culture : DMEM complémenté avec : L-glutamine 2 mM ; Pénicilline 50 U/ml - Streptomycine 50 µg/ml ; Sérum de veau fœtal (SVF) 10%

10 II.2- Composé testé : Huile essentielle de myrte vert biologique
Corse (Lot n° 05/07 ; Ref. L'Astratella GT080116-2))

- Aspect : Huile
- Stockage à température ambiante
- Solution stock : 1% en éthanol
- Dilution dans le milieu de culture
- 15 - Concentrations testées : 2×10^{-4} , 6×10^{-4} et 2×10^{-3} %

II.3- Référence : Resvératrol

- Solution stock 22.8 mg/ml en DMSO
- Dilution dans le milieu de culture
- 20 - Concentration testée : 5 µg/ml

II.4- Culture et traitement

Les fibroblastes ont été cultivés en plaques 96 puits en milieu de culture. A subconfluence, le milieu a été remplacé par
25 du milieu de culture contenant ou non (témoin) le composé testé ou la référence. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 24 heures. Les essais ont été réalisés sur fibroblastes âgés (R16 NHDF). Toutes les conditions ont été réalisées en six fois.

II.5- Production de SIRT-1 par des fibroblastes - immunofluorescence

Après incubation, les milieux de culture ont été éliminés. Les cellules ont été rincées avec une solution de « phosphate buffered saline » (PBS) et fixées avec une solution de paraformaldehyde (PFA) à 4%. Après saturation des sites de liaison non spécifiques par incubation dans un tampon de PBS-Tween, albumine de sérum bovin (BSA) à 5%, les cellules ont été marquées par un anticorps primaire anti-SIRT-1 à température ambiante pendant 1 heure.

L'anticorps primaire a ensuite été révélé par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (GAR-Alexa 488) et les noyaux des cellules ont été colorés par le Hoechst (bis-benzimide).

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide de l'appareil InCell Analyzer™1000 (GE Healthcare). Des contrôles sans anticorps primaire ont été réalisés afin de régler les paramètres d'acquisition de la caméra. Pour chaque puits, 5 saisies d'images numérisées ont été réalisées. Le marquage a été quantifié en mesurant l'intensité de fluorescence (intégration des données numériques avec le logiciel Developer Toolbox 1.5, GE Healthcare).

III- Résultats

La référence resvératrol a stimulé la production de SIRT-1 par les fibroblastes âgés.

Comme le montrent les résultats du tableau 3 ci-dessous, le composé HE myrte vert Corse Bio, a significativement stimulé la production de SIRT-1 par les fibroblastes âgés à toutes les concentrations testées. Cette stimulation est d'au moins +24 % par rapport au témoin négatif.

Tableau 3 : Effet de l'huile essentielle de myrte vert biologique Corse sur la production de SIRT-1 par des fibroblastes âgés

Traitement Concentration	I / nb cell (UA)	Moy (UA)	% Tém	esm (%)	p
Témoin -	11422 17268 16722 14497 17602 17167	15780	100	3	-
TGF-β 10 ng/ml	17238 18653 20283 19644 19311 20487	19269	122	3	**
HE myrte vert Bio Corse 2 x 10 ⁻⁴ %	19442 20970 19053 23741 17291 18900	19899	126	6	*
HE myrte vert Bio Corse 6 x 10 ⁻⁴ %	19331 18909 18488 23449 18700 18474	19559	124	5	*
HE myrte vert Bio Corse 2 x 10 ⁻³ %	19122 248760 ⁽¹⁾ 18766 18944 19042 21678	19510	124	3	*

5 (1) donnée invalidée

Dans ce tableau « I / nb cell » signifie « intensité de fluorescence par nombre de cellule » et est exprimé en unité arbitraire (UA). « moy » correspond à la moyenne de ces
10 intensités, exprimé en UA. « % Tem » correspond à

comparaison en pourcentage de l'intensité mesurée par rapport à celle du témoin. « esm % » correspond à « l'écart type de la moyenne ». « p » correspond au seuil de significativité statistique où « * » correspond à une valeur de p allant de 0,01 à 0,05 (significatif) et « ** » correspond à une valeur de p allant de 0,001 à 0,01 (très significatif).

Le composé HE myrte vert Corse Bio a donc un effet stimulant sur la production de SIRT-1 par des fibroblastes âgés.

Exemple 4 : Effet de l'huile essentielle de myrte vert biologique corse, de l'huile essentielle d'immortelle biologique corse et de leur association sur l'expression de SIRT-1 sur explants de peau

I- Objectif de l'étude

Cette étude a pour but d'observer l'activité de l'huile essentielle Myrte vert Corse Bio, de l'huile essentielle Immortel Bio Corse et de leur association sur explants de peau humaine maintenus en survie.

Son activité a été évaluée par Immunomarquage de la sirtuine-1.

II- Mode opératoire

II.1- Préparation des explants

A partir d'une plastie abdominale d'une femme de type caucasien âgée de 54 ans, 21 explants de peau humaine d'un diamètre d'environ 10 mm ont été préparés. Les explants ont

été mis en survie en milieu BEM (BIO-EC's Explants Médium) à 37°C en atmosphère humide, enrichie de 5 % de CO₂.

Ces explants ont été répartis en 7 lots de 3 explants comme suit présenté dans le tableau 4 ci-dessous.

5

Tableau 4 : Répartition des lots

Lot	Nb explants	Traitement	Prélèvement
T0	3	-	J0
T	3	-	J10
E1	3	Perhydrosqualène	J10
E2	3	H ₂ O	J10
P1	3	HE immortelle 0,5	J10
P2	3	HE myrte 0,5 %	J10
P7	3	Resvératrol 0,1 %	J10
P10	3	HE immortelle 0,5 % + HE myrte 0,5 %	J10

1) Préparation des produits à tester

- a. **Solution de HE d'Immortelle à 0,5%** : Diluer 25µl d'huile d'immortelle dans 5 ml de perhydrosqualène.
- b. **Solution de HE de Myrte à 0.5%** : Diluer 25µl d'huile de myrte dans 5 ml de perhydrosqualène.
- c. **Solution de resvératrol à 0.1%** : Diluer 5mg de la poudre de resvératrol à 10% dans 5ml d'eau distillée stérile.
- d. **Solution d'immortelle à 0.5% + HE Myrte à 0.5%** : Dans 5 ml de perhydrosqualène diluer : 25µl d'huile d'immortelle et 25µl d'huile essentielle de myrte.

2) Traitement

A J0, les explants ont été placés dans 2 ml de milieu de culture et les produits ont été appliqués en topique à raison de

20

30µl de chaque produit sur les explants à l'aide d'un disque de papier filtre. Les témoins n'ont reçu aucun traitement.

Le traitement a été renouvelé tous les deux jours, à J1, J3, J5 et J7 et les explants ont été remis en survie à 37°C en atmosphère humide enrichie de 5% de CO₂.

3) Prélèvement pour l'histologie

A J0, les trois explants du lot T0 ont été prélevés et coupés en deux. Une moitié a été fixée au formol tamponné, et l'autre moitié a été congelée à -80°C.

A J10, les 3 explants de chaque lot ont été prélevés et traités de la même manière.

4) Traitements histologiques

Après 24 heures de fixation au formol tamponné, les prélèvements ont été déshydratés et imprégnés en paraffine à l'aide d'un automate de déshydratation Leica 1020. Ils ont été mis en bloc selon le mode opératoire MO-H-153 à l'aide d'une station d'enrobage Leica EG 1160. Des coupes de 5µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome type Minot, Leica RM 2125 et collées sur des lames de verre histologiques Superfrost (marque déposée).

SIRT-1 a été marquée sur coupes paraffine formolées avec un anticorps polyclonal anti-SIRT-1, (Santa Cruz, réf : sc-15404), fait sur lapin, au 1/200^{ème} pendant 24 heures à température ambiante avec système amplificateur streptavidine/biotine (Vector, Vectastain), et révélé en VIP (Vector, SK-4600).

Cet immunomarquage a été réalisé sur les T0, T, E1, E2, P1, P2, P7, P10, soient 24 explants.

III- Résultats

III.1- SIRT-1

Aucun marquage n'est observé sur les coupes sur lesquelles l'anticorps primaire ou secondaire a été remplacé par du PBS, ce qui montre la spécificité du marquage observé.

III.2- A J0

5 **Lot témoin à T0**

Quelques cellules à noyau nettement marqué sont observées dans les couches supérieures de l'épiderme vivant.

III.3- A J10

10 **Lot non traité (T)**

Un nombre modéré de cellules à noyau nettement positif sont observées dans les couches supérieures de l'épiderme vivant.

Un marquage cytoplasmique faible, est également observé dans les couches spineuses de l'épiderme.

Lot traité avec le perhydrosqualène (E1)

Un nombre modéré de cellules à noyau nettement positif sont observées dans les couches supérieures de l'épiderme vivant.

Un marquage cytoplasmique modéré, est également observé dans les couches spineuses de l'épiderme.

Lot traité avec de l'eau distillée (E2)

Un nombre modéré de cellules à noyau nettement positif sont observées dans les couches supérieures de l'épiderme vivant.

Un marquage cytoplasmique modéré, est également observé dans les couches spineuses de l'épiderme.

30 **Lot traité avec de l'huile essentielle d'immortelle à 0.5% (P1)**

De nombreuses cellules à noyau nettement positif sont observées dans les couches supérieures de l'épiderme vivant.

Un marquage cytoplasmique modéré, est également observé dans les couches spineuses de l'épiderme.

5

Lot traité avec de l'huile essentielle de myrte à 0.5% (P2)

D'assez nombreuses cellules à noyau nettement positif sont observées dans les couches supérieures de l'épiderme vivant.

10 Un marquage cytoplasmique modéré, est également observé dans les couches spineuses de l'épiderme.

Lot traité avec le resvératrol à 0.1% (P7)

15 D'assez nombreuses cellules à noyau nettement positif sont observées dans les couches supérieures de l'épiderme vivant.

Un marquage cytoplasmique très modéré, est également observé dans les couches spineuses de l'épiderme.

20 **Lot traité avec HE immortelle à 0.5% + HE myrte à 0.5% (P10)**

De nombreuses cellules à noyau nettement positif sont observées dans les couches supérieures de l'épiderme vivant.

25 Un marquage cytoplasmique assez net, est également observé dans les couches spineuses de l'épiderme.

L'ensemble des résultats est récapitulé dans le tableau 5 ci-dessous.

30

Tableau 5 : Détermination du pourcentage de surface occupé par le marquage de SIRT-1 dans l'épiderme

SIRT-1 % de surface	J0		J10	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
T	0,49	0,30	2,83	1,01
E1			3,62	0,87
E2			2,64	0,96
P1			4,91	1,10
P2			4,17	0,68
P7			3,81	0,60
P10			4,95	0,91

IV- Discussion

5 IV.1- Sirtuine-1

A J0

L'expression de SIRT-1 est très modérée.

A J10

10 Après 10 jours de survie, l'expression de SIRT-1 est légèrement augmentée. Elle est modérée.

- Après traitement avec l'excipient E1, l'expression de SIRT-1 est proche de celle observée sur le lot non traité. **L'excipient E1 n'induit pas de modification notable de l'expression de SIRT-1 dans l'épiderme.**

15 - Après traitement avec l'excipient E2, l'expression de SIRT-1 est proche de celle observée sur le lot non traité. **L'excipient E2 n'induit pas de modification notable de l'expression de SIRT-1 dans l'épiderme.**

20 - Après traitement avec le produit P1, l'expression de SIRT-1 est nette dans tout l'épiderme. **Le produit P1 induit une nette expression de SIRT-1 dans l'épiderme.**

- Après traitement avec le produit P2, l'expression de SIRT-1 est assez nette dans tout l'épiderme. **Le produit P2 induit une assez nette expression de SIRT-1 dans l'épiderme.**

5 - Après traitement avec le produit P7, l'expression de SIRT-1 est assez nette dans tout l'épiderme. **Le produit P7 induit une assez nette expression de SIRT-1 dans l'épiderme.**

10 - Après traitement avec le produit P10, l'expression de SIRT-1 est nette dans tout l'épiderme. **Le produit P10 induit une nette expression de SIRT-1 dans l'épiderme.**

La détermination du pourcentage de surface occupé par la sirtuine-1 dans l'épiderme par analyse d'image montre que :

15 - Le produit P1 induit une augmentation significative de 65% du pourcentage de surface occupé par la sirtuine-1, par rapport au lot non traité à J10.

- Le produit P2 induit une augmentation significative de 43% du pourcentage de surface occupé par la sirtuine-1, par rapport au lot non traité à J10.

20 - Le produit P7 induit une augmentation significative de 42% du pourcentage de surface occupé par la sirtuine-1, par rapport au lot non traité à J10.

25 - Le produit P10 induit une augmentation significative de 70% du pourcentage de surface occupé par la sirtuine-1, par rapport au lot non traité à J10.

V- Conclusions

L'huile essentielle Myrte Vert Corse Bio montre une bonne activité sur l'expression de SIRT-1, équivalente voire
30 supérieure au resvératrol, molécule de référence.

Cette étude sur explant confirme le résultat observé dans l'exemple précédent (exemple III). L'intérêt ici est d'être dans des conditions très proches de l'application topique cutanée.

Un excellent effet de synergie est observé avec l'huile
5 essentielle Immortelle Corse Bio.

Exemple 5 : Effet de l'huile essentielle de myrte vert biologique corse sur la modulation d'expression d'un marqueur cutané (HSPG2)

10 **I- Objectif de l'étude**

La ou les cibles biologiques (thématiques ou marqueurs) de l'huile essentielle de myrte vert biologique Corse ont été recherchées.

Le protocole réalisé est le même que celui décrit par
15 Bagory M. [7].

Les thématiques et marqueurs suivants ont été recherchés :

- Jonction dermo-épidermique : lamine ; collagène IV ; fibronectine ; intégrine

20 - Activité restructurante derme : collagène I ; collagène III ; glycosaminoglycannes ; protéoglycannes ; acide hyaluronique ; tropéolastine ; fibrilline ; SIRT-1 ; cavéolines-1

- Activité épidermique : profilaggrine/filaggrine ;
25 cholestérol/céramides ; involucrine ; loricrine ; cornifine ; kératine (K15/K14 et K1/K10) ; facteurs de croissance (EGF, TGF alpha, TGF beta, TNF alpha) ; transglutaminase membranaire ; aquaporine-3

- Activité éclaircissante : TRP-1 ; TRP-2 ; MC1-R et
30 MC2-R ; PAR-2

Dans cet exemple, les cultures cellulaires adéquates ont été réalisées sur des kératinocytes, fibroblastes et mélanocytes, en présence ou non (témoin) des 11 composés à tester puis il a été procédé à l'extraction des ARN afin de quantifier les marqueurs d'intérêt par RT-QPCR.

II- Matériel et méthodes

II.1- Modèle biologique

- Type cellulaire :

10 Fibroblastes dermiques humains normaux (NHDF)

Référence Bioalternatives : pool PF2, utilisés au 8^{ème} passage

- Conditions de culture : 37°C, 5% CO₂

15 - Milieu de culture : DMEM complémenté avec ; L-glutamine 2 mM ; Pénicilline 50 U/ml - Streptomycine 50 µg/ml ; Sérum de veau fœtal (SVF) 10%

- Milieu d'essai : DMEM complémenté avec ; Glutamine 2 mM ; Pénicilline 50 U/ml - Streptomycine 50 µg/ml ; Sérum de veau fœtal (SVF) 2%

20

II.2- Culture et traitement

Les fibroblastes dermiques humains normaux ont été cultivés en plaques 12 puits en milieu de culture jusqu'à confluence, puis placés en milieu d'essai. Les fibroblastes ont ensuite été traitées ou non (témoin) avec le composé testé et incubées pendant 24 heures. Toutes les conditions ont été réalisées trois fois.

25 A la fin de chaque période d'incubation, les fibroblastes ont été rincées avec une solution de « phosphate buffered saline » (PBS), 300µl de TriReagent ont été ajoutés et les fibroblastes ont été immédiatement congelées à -80°C.

30

II.3- Reverse-transcription (RT)

- Extraction des ARN de chaque échantillon en utilisant du Tri-reagent (EUROMEDEX) selon les conseils du fournisseur.

5 - Les potentielles traces contaminantes d'ADN génomique ont été enlevées par la méthode « DNAfree system » (Ambion).

- La reverse-transcription des mARN a été effectuée en présence d'oligo(dT12-18) et du kit « Superscript II» (invitrogen).

10

II.4- PCR en temps réel (q PCR)

Les PCR (Polymerase Chain Reactions) ont été réalisés en triple exemplaires à l'aide de l'appareil « LightCycler (marque déposée) system » (Roche Molecular Systems Inc.) en accord
15 avec le protocole recommandé par le fournisseur.

Cet appareil permet une rapide et puissante réaction des PCR, après détermination des conditions d'analyses de l'amorce des tests. Cela consiste en deux composantes :

20 - Un thermo-cycle : optimisé pour une application rapide des PCR, permettant des transferts thermiques extrêmement rapide à l'intérieur de la réaction de la mixture

25 - Un fluorimètre : permettant de mesurer fidèlement la fluorescence de l'intervalle teinté SYBR Green I ; teinture qui lie spécifiquement au double blocage ADN pendant le cycle d'allongement (détection longueur d'onde : 521nm).

Les amorces SEQ ID No.1 et SEQ ID No.2 présentées dans le tableau 6 ci-dessous), spécifiques du gène « Heparan sulfate protéoglycan » ou (« HSPG2 ») (SEQ ID No.3) référencé à la « Gene Bank » sous le numéro NM_005529, ont permis
30 l'amplification d'un fragment spécifique de 226 paires de bases.

Le niveau d'expression de ce gène est normalisé par rapport à un gène de référence quantifié en même temps que HSPG2 [7].

5 **Tableau 6 : Caractéristiques des amorces SEQ ID No.1 et SEQ ID No.2**

Amorce	Nombre de base	Position sur « HSPG2 »	Température de fusion moléculaire	%GC
SEQ ID No.1	19	8477 – 9495	60°C	58
SEQ ID No.2	18	8530 – 8547	60°C	67

III- Résultats

Comme le montre le tableau 7 ci-dessous, les résultats ont montré une tendance de l'huile essentielle biologique de myrte vert corse à stimuler les protéoglycanes.

10 **Tableau 7 : Stimulation de l'expression du gène des protéoglycanes par des fibroblastes**

Traitement		Expression de HSPG2
Témoin	-	100
Contrôle éthanol	0.3%	85
HE myrte vert Corse Bio	0.002%	136

15 **Exemple 6 : Evaluation clinique de l'effet anti-tâches (scorage)**

Une composition A comprenant les composés présentés dans le tableau 8 suivants a été préparée.

Tableau 8 : Composition A testée

Ingrédients	Quantité en pourcentage par rapport au poids total de la composition (%)
Stéarate de sucrose	3%
Distéarate de sucrose	1,5%
Triglycéride caprylique/caprique	20%
Alcool cetylique	2%
Huile d'échium	0,1%
Huile de cameline	1%
Huile d'onagre	2%
Huile de bourrache	0,25%
Huile essentielle de Myrte	0,035%
Sphérulites de myrte	0,2%
Huile essentielle d'Hélichryse	0,035%
Sphérulites d'Immortelle	0,8%
Magnésium	0,001 à 1%
Cuivre	0,001 à 1%
Zinc	0,001 à 1%
Acide ascorbique 2-Glucoside	2%
Acétate de tocophéryle	0,1%
Glycérine	4%
Gomme xanthane	0,1%
Parfum	qs
Conservateurs	qs
Eau	qsp 100%

La composition A a été appliquée de manière biquotidienne par 32 volontaires durant 56 jours, dans les conditions normales d'utilisation, afin d'évaluer son effet anti-tâches.

Une synthèse des résultats est présentée dans le tableau 9 ci-dessous.

Tableau 9 : Variations de la taille des taches et de leur couleur, après 28 (J28) et 56 jours (J56) d'utilisation biquotidienne du produit, en comparaison à l'état initial

	Jour	Moy +/- sem	% moy	p
Taille	J28	0,0 +/- 0,0	-1	na

moyenne des taches	J56	-0,5 +/- 0.2	-10	***
Couleur moyenne des taches	J28	-0,7 +/- 0,1	-19	***
	J56	-1,1 +/- 0.2	-32	***

Dans ce tableau « Moy » signifie « moyenne » et « sem » correspond à l'écart-type. « % moy » correspond à « la variation en pourcentage sur les moyennes ». « na » signifie « non applicable ». « p » correspond au seuil de significativité statistique où « *** » correspond à une valeur de p inférieure à 0,001 (extrêmement significatif).

Dans les conditions de cette étude, sur 32 volontaires, après 28 et 56 jours d'utilisation de la composition A, une diminution significative de la couleur moyenne des taches a été observée (respectivement de -19% et -32%) par le dermatologue en charge de l'étude ($p < 0,001$). Cet effet a été observé chez 74% des volontaires à J28 et chez 81% des volontaires à J56.

De plus, après 56 jours d'utilisation, une diminution significative de la taille moyenne des taches a été observée (-10%) par le dermatologue en charge de l'étude ($p < 0,001$).

Exemple 7 : Evaluation clinique de l'effet hydratant de la composition cosmétique

Le taux d'hydratation cutanée de la composition A définie dans l'exemple 6 a été étudié à deux, huit et vingt-quatre heures après une application standardisée unique. Les mesures ont été réalisées 13 fois.

Une synthèse des résultats est présentée dans le tableau 10 ci-dessous.

Tableau 10 : Variations du taux d'hydratation des couches superficielles de l'épiderme après une application standardisée unique du produit, en comparaison à une zone non traitée

Cinétique	Moy +/- sem	% moy	p
t = 2h	23 +/- 2	70	***
t = 8h	10 +/- 2	30	***
t = 24h	5 +/- 1	18	***

Dans ce tableau « Moy » signifie « moyenne » et « sem » correspond à l'écart-type. « % moy » correspond à « la variation en pourcentage sur les moyennes ». « na » signifie « non applicable ». « p » correspond au seuil de significativité statistique où « *** » correspond à une valeur de p inférieure à 0,001 (extrêmement significatif).

Le test statistique utilisé pour cet exemple est un test de student.

En comparaison à une zone non traitée et après une application standardisée unique, la composition A a induit une augmentation significative du taux d'hydratation cutanée des couches superficielles de l'épiderme, deux, huit et vingt-quatre heures après son application : +70% à t=2h, +30% à t=8h et +18% à t=24h.

Exemple 8 : Etude sur l'humeur instantanée (BMIS) après application de la composition cosmétique

Dans cet exemple, une augmentation du score global correspond à une amélioration de l'humeur instantanée des volontaires.

Concernant l'analyse des points « désagréables », une augmentation de score traduit une diminution du ressenti « désagréable ».

Un questionnaire portant sur l'humeur a été complété par 32 volontaires avant et après application du produit.

Ce questionnaire en 16 points s'organise autour de 8 dimensions : le bonheur, l'affection, le calme, l'énergie, la peur, la colère, la fatigue et la tristesse.

Une analyse secondaire en regroupant les émotions agréables (dynamique, heureux, bienveillant, content, énergique, calme, affectueux, vif) et désagréables (triste, fatigué, mélancolique, excité, épuisé, grincheux, nerveux, agacé) est ensuite possible.

Pour chacun d'es 16 adjectifs donnés, les volontaires devaient cocher la case qui correspond au mieux, à l'état qu'ils ressentaient avant et 70 minutes après application de la composition A. Les volontaires ont gradué leurs réponses en fonction de l'intensité émotionnelle qu'ils ressentaient. Les réponses données sont codées de la manière suivante :

20

Tableau 11 : Réponse et scores possible pour l'étude de l'humeur instantané

Réponses possibles	Pas du tout	Un peu	Un peu plus	Tout à fait
Emotions agréables	1	2	3	4
Emotion désagréables	4	3	2	1

Le score global obtenu est la somme des valeurs pour chaque item. Il varie de 16 à 64.

25

Un score global au-dessous de 40 caractérise une humeur plutôt "désagréable" et un score global au-dessus de 40 caractérise une humeur plutôt "plaisante".

Avant application de la composition A, le résultat était de 43,7. 70 minutes après son application, la moyenne des résultats est passée à 48,7.

Ces résultats montrent une augmentation significative du score global a été observée, ce qui caractérise un effet "bien-être" pour les volontaires, 70 minutes après l'application de la composition A.

Exemple 9 : Evaluation des qualités cosmétiques de la composition cosmétique

La composition A définie dans l'exemple 6 a été appliquée de manière biquotidienne par 50 volontaires durant 28 jours, dans les conditions normales d'utilisation, afin d'évaluer ses qualités cosmétiques.

L'ensemble des résultats figure dans le tableau 12 ci-dessous.

Tableau 12 : Efficacité et jugement global du produit

EFFICACITE DU PRODUIT		% oui	Sign. (5%)
A1	La texture de la peau est améliorée	88%	Oui
A2	Les pores sont resserrés	80%	Oui
A3	Le grain de peau est affiné	88%	Oui
A4	La peau est plus lisse	94%	Oui
A5	La peau est plus ferme	80%	Oui
A6	La peau semble repulpée/rebondie	74%	Oui
B1	La peau paraît plus dense	82%	Oui
B2	Les ridules sont lissées	78%	Oui
B3	Les rides sont estompées	70%	Oui
B4	Les rides profondes sont moins marquées	72%	Oui
B5	Les traits sont rehaussés	68%	Oui

B6	Les contours du visage sont mieux définis	68%	Oui
B7	L'ovale du visage est plus net	66%	Oui
B8	Les traits sont défatigués	82%	Oui
B9	Les traits sont comme « liftés »	72%	Oui
C1	La peau paraît gainée/ maintenue	72%	Oui
C2	Le visage paraît serein	78%	Oui
C3	La peau est débarrassée du voile terne	84%	Oui
C4	Le cou est plus lisse	76%	Oui
C5	Le cou paraît plus jeune	70%	Oui
C6	Le vieillissement est visiblement retardé	70%	Oui
C7	Le visage paraît visiblement plus jeune	68%	Oui
C8	L'ensemble des signes de l'âge sont atténués	70%	Oui
D1	La peau est revitalisée	90%	Oui
D2	Le relâchement cutané est réduit	84%	Oui
D3	La peau est plus tonique	82%	Oui
D4	La peau est fortifiée	80%	Oui
D5	La peau est reconstruite en profondeur	72%	Oui
D6	La peau est profondément réparée	64%	Oui
D7	La peau est régénérée	82%	Oui
D8	La peau est hydratée pendant toute la journée	96%	Oui
D9	La peau est confortable tout au long de la journée	94%	Oui
JUGEMENT GLOBAL DU PRODUIT		% Accord	Sign. (5%)
E1	Le produit convient-il à votre type de peau ?	80%	Oui
E2	Diriez-vous que cette crème est ?	74%	Oui
E3	Diriez-vous que cette crème est source de Plaisir et/ou de Bien être ?	76%	Oui
E4	Diriez-vous que cette crème est source de nutrition et d'hydratation intense ?	72%	Oui
E5	Quelle note globale donneriez-vous au produit ? (10 étant la meilleure note)	6,8	
F1	Achèteriez-vous cette crème ?	64%	Oui

La composition A a donc été reconnue comme étant très efficace par les utilisateurs.

Listes des références

- 5 **[1]** Lin, S.J., Defossez, P.A. and Guarente, L. (2000)
Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie
restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-
2128
- 10 **[2]** Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A.,
Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney,
M.W. and Guarente, L. (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in
white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429, 771-
776
- 15 **[3]** Michishita, E., Park, JY., Burneskis, JM., Barrett, JC.,
Horikawa, I. (2005) Evolutionarily conserved and nonconserved
cellular localizations and functions of human SIRT proteins.
20 **[4]** FR 01/11224
 [5] FR 06/05953
 [6] Matthieu Bagory. La PCR et RT-PCR quantitative temps-
réel.
- 20 **[7]** David G. Ginzinger. Gene quantification using real-time
quantitative PCR : an emerging technology hits the mainstream.
Experimental Hematology, 30 :503–512, 2002

REVENDICATIONS

1. Une composition cosmétique ou dermatologique comprenant :

- 5 - une huile essentielle de myrte,
- au moins une huile végétale riche en oméga-3 et en oméga-6,
- au moins un minéral, choisi dans le groupe comprenant le sodium, le calcium ou le magnésium,
- 10 - au moins un oligoélément choisi dans le groupe comprenant le zinc, le cuivre ou le fer,
- au moins de la vitamine C ou un dérivé de celle-ci.

2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle
15 l'huile essentielle de myrte est présente en une concentration allant de 0.001% et 2% en poids par rapport au poids total de la composition.

3. Composition selon la revendication 1 ou 2, ladite
20 composition comprenant en outre une huile essentielle d'immortelle.

4. Composition selon l'une quelconque des
25 revendications 1 à 3, dans laquelle l'au moins une huile végétale riche en oméga-3 et -oméga-6 est choisie dans le groupe comprenant l'huile d'échium, l'huile de cameline, l'huile d'onagre ou l'huile de bourrache.

5. Composition selon l'une quelconque des
30 revendications 1 à 4, dans laquelle la vitamine C ou l'un de ses dérivés est présent en une concentration allant de 0,5 %

à 10 % en poids par rapport au poids totale de la composition.

5 6. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, comprenant en outre des sphérulites d'huile essentielle d'immortelle et/ou des sphérulites d'huile essentielle de myrte.

10 7. Composition selon la revendication 6, dans laquelle les shpérulites d'huile essentielle d'immortelle et/ou d'huile essentielle de myrte sont présent à une concentration allant de 0,05 % à 7 % en poids par rapport au poids total de la composition.

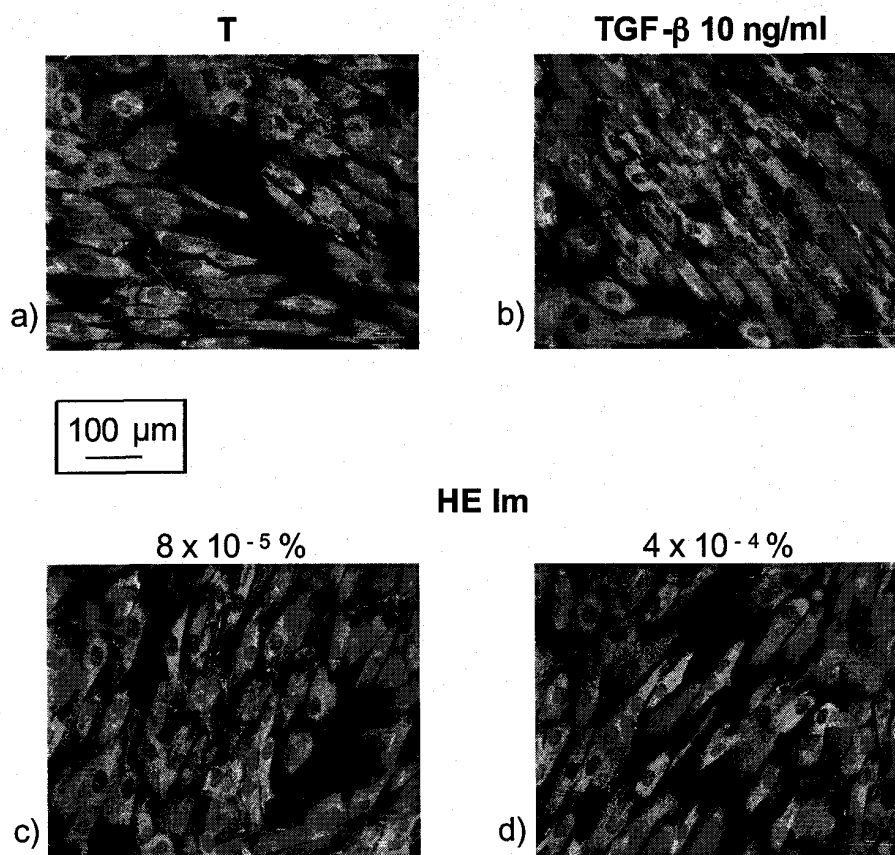
15

20 8. Utilisation cosmétique d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, pour améliorer la régénération cutanée, la longévité cellulaire, l'éclat de la peau, l'uniformité du teint, diminuer la taille des taches de pigmentation de la peau et/ou diminuer la couleur des taches de pigmentation de la peau.

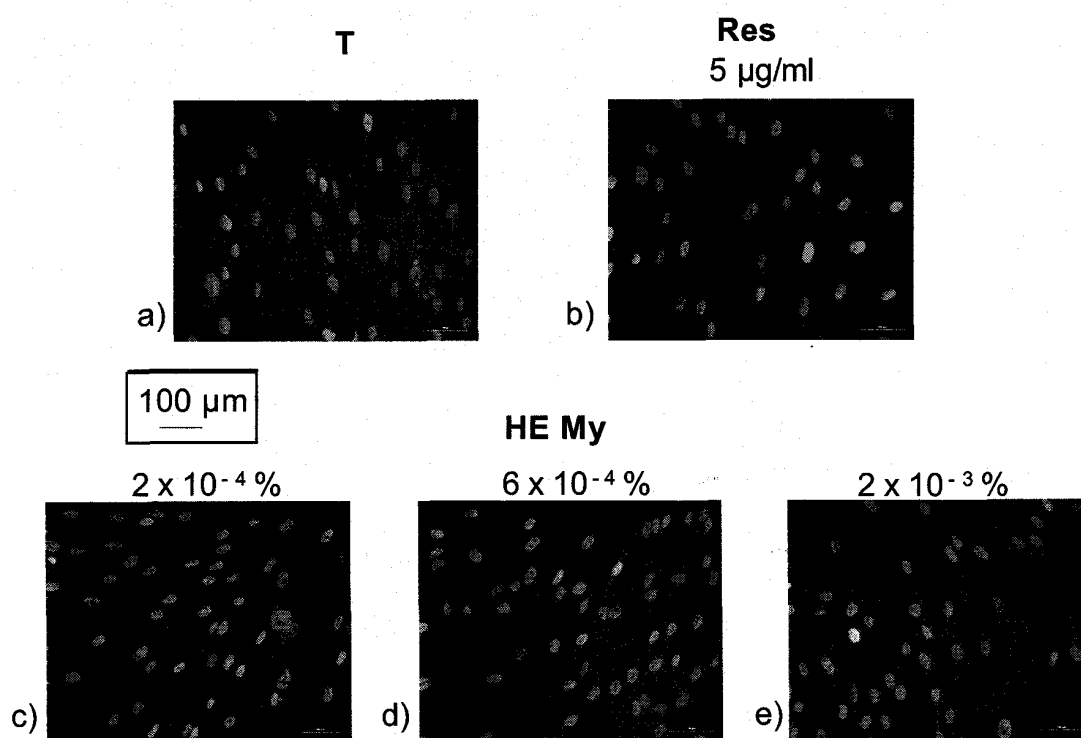
25

9. Méthode de soin cosmétique comprenant une étape d'application sur la peau d'un sujet d'une quantité efficace d'une composition telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 7.

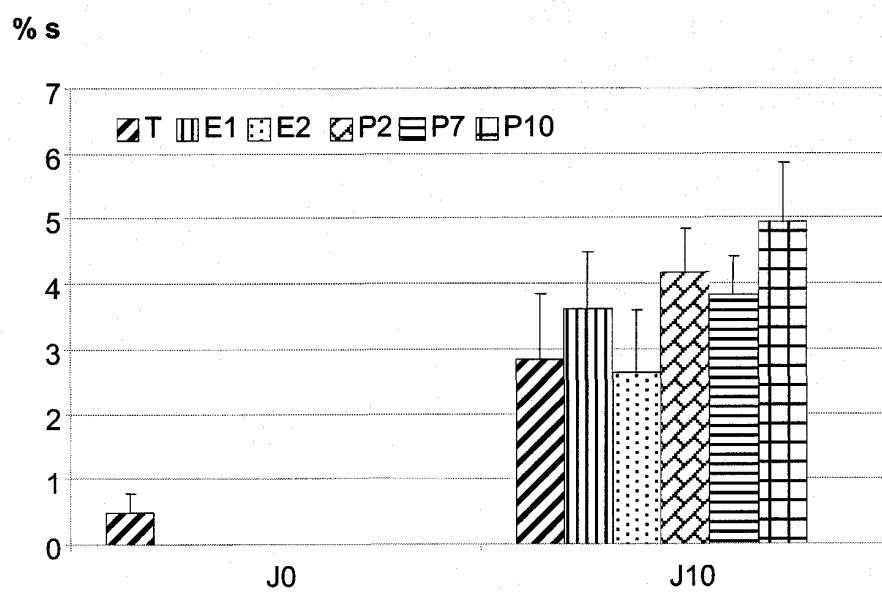
1/3

**Figure 1**

2/3

**Figure 2**

3/3

**Figure 3**

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> L'OCCITANE
 Millou, Yves
 Pierrisnard, Jean-Louis
 Fontes, Katia
 Tourel, Cécile

<120> COMPOSITION COSM...TIQUE OU DERMATOLOGIQUE A BASE D'HUILE
 ESSENTIELLE D'IMMORTELLE ET D'HUILE ESSENTIELLE DE MYRTE ET SON
 UTILISATION

<130> BIP201052FR00

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amorce gauche; Position 8477-8495 de HSPG2

<400> 1
 tctggctcaa gtgctgtcc 19

<210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Amorce droite; Position 8530-8547 de HSPG2

<400> 2
 gaggaggagg gctcgatg 18

<210> 3
 <211> 14294
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gcgcggagcg agcgagcgag agagcggcgc gggccgggcc atggggtggc gggcggcggg 60

cgcgctgctg ctggcgctgc tgctgcacgg gcggctgctg gcggtgaccc atgggctgag	120
ggcatacgat ggcttgtctc tgcctgagga catagagacc gtcacagcaa gccaaatgcg	180
ctggacacat tcgtaccttt ctgatgatga ggacatgctg gctgacagca tctcaggaga	240
cgacctgggc agtggggacc tgggcagcgg ggacttccag atggtttatt tccgagccct	300
ggtgaatttc actcgctcca tcgagtacag ccctcagctg gaggatgcag gctccagaga	360
gttccgagag gtgtccgagg ctgtggtaga cacgctggag tcggagtact tgaaaattcc	420
cggagaccag gttgtcagtg tgggtttcat caaggagctg gatggctggg tttttgtgga	480
gctggatgtg ggctcggag ggaatgcgga tggggctcag attcaggaga tgctgctcag	540
ggcatctccc agcggctctg tggcctccta cgtcacctct ccccagggat tccagtccg	600
acgcctgggc acagtgcgcc agttcccaag agcctgcacg gaggccgagt ttgcctgcc	660
cagctacaat gagtgtgtgg ccctggagta tcgctgtgac cggcggcccg actgcaggga	720
catgtctgat gagtcaatt gtgaggagcc agtcctgggt atcagcccca cattctctct	780
ccttgtggag acgacatctt taccgccccg gccagagaca accatcatgc gacagccacc	840
agtcacccac gctcctcagc ccctgcttcc cggttccgtc agggccctgc cctgtgggcc	900
ccaggaggcc gcatgccga atgggcaactg catccccaga gactacctct gcgacggaca	960
ggaggactgc gaggacggca gcgatgagct agactgtggc cccccgccac cctgtgagcc	1020
caacgagttc ccctgcggga atggacattg tgccctcaag ctgtggcgct gcgatggtga	1080
ctttgactgt gaggaccgaa ctgatgaagc caactgcccc accaagcgtc ctgaggaagt	1140
gtgcgggccc acacagttcc gatgcgtctc taccaacatg tgcattcccag ccagcttcca	1200
ctgtgacgag gagagcgact gtcctgaccg gagcgacgag tttggctgca tgcccccca	1260
ggtggtgaca cctccccggg agtccatcca ggcttcccgg ggccagacag tgaccttcac	1320
ctgcgtggcc attggcgctc ccacccccat catcaattgg aggtcaact ggggccacat	1380
cccctctcat cccagggtga cagtgaccag cgagggtggc cgtggcacac tgatcatccg	1440
tgatgtgaag gagtcagacc agggcgccta cacctgtgag gccatgaacg cccggggcat	1500
ggtgtttggc attcctgacg gtgtccttga gctcgtccca caacgaggcc cctgcctga	1560

cggccacttc tacctggagc acagcgccgc ctgcctgccc tgcttctgct ttggcatcac	1620
cagcgtgtgc cagagcaccc gccgcttccg ggaccagatc aggctgcgct ttgaccaacc	1680
cgatgacttc aaggggtgtga atgtgacaat gcctgcgcag cccggcacgc caccctctc	1740
ctccacgcag ctgcagatcg acccatccct gcacgagttc cagctagtcg acctgtcccg	1800
ccgcttcctc gtccacgact ctttctgggc tctgcctgaa cagttcctgg gcaacaagg	1860
ggactcctat ggaggctccc tgcgttaca cgtgcgctac gagttggccc gtggcatgct	1920
ggagccagtg cagcggccgg acgtggctct catgggtgcc gggtagcgcc tcctctccc	1980
aggccacaca cccacccaac ctggtgctct gaaccagcgc caggctccagt tctctgagga	2040
gcactgggtc catgagtctg gccggccggt gcagcgcgcg gagctgctgc aggtgctgca	2100
gagcctggag gccgtgctca tccagaccgt gtacaacacc aagatggcca gcgtgggact	2160
tagcgacatc gccatggata ccaccgtcac ccatgccacc agccatggcc gtgcccacag	2220
tgtggaggag tgcagatgcc ccattggcta ttctggcttg tcctgcgaga gctgtgatgc	2280
ccacttcaact cgggtgcctg gtgggcccta cctgggcacc tgctctggtt gcaattgcaa	2340
tggccatgcc agctcctgtg accctgtgta tggccactgc ctgaattgcc agcacaacac	2400
ggagggggcca cagtgaaca agtgcaaggc tggttctttt ggggacgcca tgaaggccac	2460
ggccacttcc tgccggccct gccctgccc atacatcgat gcctcccgca gattctcaga	2520
cacttgcttc ctggacacgg atggccaagc cacatgtgac gcctgtgccc caggctacac	2580
tggccgccgc tgtgagagct gtgcccccg atacgagggc aaccccatcc agcccggcgg	2640
gaagtgcagg cccgtcaacc aggagattgt gcgctgtgac gagcgtggca gcatggggac	2700
ctccggggag gcctgccgct gtaagaacaa tgtggtgggg cgcttgatga atgaatgtgc	2760
tgacggctct ttcacactga gtacccgaaa ccccgatggc tgctcaagt gcttctgcat	2820
gggtgtcagt cgccactgca ccagctcttc atggagccgt gccagttgc atggggcctc	2880
tgaggagcct ggtcacttca gcctgaccaa cgccgaagc acccacacca ccaacgaggg	2940
catcttctcc cccacgcccg gggaactggg attctcctcc ttccacagac tcttatctgg	3000
accctacttc tggagcctcc cttcacgctt cctgggggac aaggtagcct cctatggagg	3060

agagctgcgc ttcacagtga cccagaggtc ccagccgggc tccacacccc tgcacgggca	3120
gccgttggtg gtgctgcaag gtaacaacat catcctagag caccatgtgg cccaggagcc	3180
cagccccggc cagcccagca ccttcattgt gcctttccgg gagcaagcat ggacgcggcc	3240
cgatgggcag ccagccacac gggagcacct gctgatggca ctggcaggca tcgacaccct	3300
cctgatccga gcatactacg cccagcagcc cgctgagagc agggctctctg gcatcagcat	3360
ggacgtggct gtgcccaggg aaaccggcca ggaccccgcg ctggaagtgg aacagtgtc	3420
ctgccccacc ggggtaccgtg ggccgtcctg ccaggactgt gacacaggct acacacgcac	3480
gcccagtggc ctctacctgg gtacctgtga acgctgcagc tgccatggcc actcagaggc	3540
ctgcgagcca gaaacagggtg cctgccaggg ctgccagcat cacacggagg gccctcggtg	3600
tgagcagtgc cagccaggat actacgggga cgcccagcgg gggacaccac aggactgcca	3660
gctgtgcccc tgctacggag accctgtctg cggccaggct gcccacactt gttttctgga	3720
cacagacggc cccccacct gtgatgcgtg ctccccaggc cacagtgggc gtcactgtga	3780
gagggtgcgc cctggctact atggcaaccc cagccagggc cagccatgcc agagagacag	3840
ccaggtgcca gggcccatag gctgcaactg tgaccccca ggcagcgta gcagccagt	3900
tgatgctgct ggtcagtgcc agtgcaaggc ccagggtgga ggcctcactt gcagccactg	3960
ccggccccac cacttccacc tgagtgccag caaccacagc ggctgcctgc cctgcttctg	4020
tatgggcata acccagcagt gcgccagctc tgccacaca cgccacctga tctccacca	4080
ctttgcccct ggggacttcc aaggctttgc cctggtgaac ccacagcgaa acagccgcct	4140
gacaggagaa ttcactgtgg aaccctgtcc cgagggtgcc cagctctctt ttggcaactt	4200
tgcccaactc ggccatgagt ctttctactg gcagctgccg gagacatacc agggagacaa	4260
gggtggcgcc tacggtggga agttgcgata caccctctcc tacacagcag gccacaggg	4320
cagcccactc tctgaccccg atgtgcagat cacgggcaac aacatcatgc tagtggcctc	4380
ccagccagcg ctgcagggcc ctgagaggag gagctacgag atcatgttcc gagaggaatt	4440
ctggcgccgg cccgatgggc agccggccac acgcgagcac ctctgatgg cactggccga	4500
cctggatgag ctctgatcc gggccacgtt ctctccgtg ccgctggcgg ccagcatcag	4560

cgcagtcagc ctggaggctc cccagccggg gccctcaaac agaccccgcg ccctcgaggt	4620
ggaggagtgc cgctgcccgc caggctacat cggctctgtcc tgccaggact gtgcccccg	4680
ctacacgcgc accgggagtg ggctctacct cggccactgc gagctatgtg aatgcaatgg	4740
ccactcagac ctgtgccacc cagagactgg ggcctgctcg caatgccagc acaacgccgc	4800
aggggagttc tgcgagcttt gtgcccctgg ctactacgga gatgccacag ccgggacgcc	4860
tgaggactgc cagccctgtg cctgcccact gaccaacca gagaacatgt tttcccgac	4920
ctgtgagagc ctgggagccg gcgggtaccg ctgcacggcc tgcgaacccg gctacactgg	4980
ccagtactgt gagcagtgtg gcccaggtta cgtgggtaac cccagtgtgc aagggggcca	5040
gtgcctgccg gagacaaacc aagccccact ggtggctcag gtccatcctg ctggaagcat	5100
agtgccccaa ggtggctccc actccctgcg gtgtcaggtc agtgggagcc caccacctta	5160
cttctattgg tcccgtaggg atgggcggcc tgtgccagc ggcaccagc agcgacatca	5220
aggctccgag ctccacttcc ccagcgtcca gccctcggat gctggggtct acatttgac	5280
ctgccgtaat ctccaccaat ccaataccag ccgggcagag ctgctggtca ctgaggctcc	5340
aagcaagccc atcacagtga ctgtggagga gcagcggagc cagagcgtgc gccccggagc	5400
tgacgtcacc ttcattctga cagccaaaag caagtcccca gcctataccc tgggtgtggac	5460
ccgcctgcac aacgggaaac tgcccacccg agccatggat ttcaatggca tcctgaccat	5520
tcgcaacgtc cagctgagtg atgcaggcac ctacgtgtgc accggctcca acatgtttgc	5580
catggaccag ggcacagcca ctctacatgt gcaggcctcg ggcaccttgt ccgccccgt	5640
ggtctccatc catccgccac agctcacagt gcagcccggg caactggcgg agttccgctg	5700
cagcgccaca gggagcccca cggccaccct cgagtggaca gggggccccg gcggccagct	5760
ccctgcgaag gcacaaatcc acggcggcat cctgcgcctg ccagctgtcg agccacgga	5820
tcaggcccag tacttgtgcc gagccacag cagcgtggg cagcagggtg ccagggtgt	5880
gctccacgtg catgggggcg gtgggccag agtccaagt agccagaga ggaccaggt	5940
ccacgcaggc cgcaccgtca ggctgtactg cagggtgca ggcgtgccta gcgccacat	6000
cacctggagg aaggaagggg gcagcctccc accacaggcc cggtcagagc gcacagacat	6060

cgcgacactg ctcacccag ccatcacgac tgctgacgcc ggcttctacc tctgctggc	6120
caccagccct gcaggcactg cccaggcccc gatccaagt gttgtcctt cagcctcaga	6180
tgccagccca ccgccgtca agattgagtc ctcacgcct tctgtgacag aagggcaaac	6240
actcgacctc aactgtgtgg tggcagggtc agcccatgcc caggtcacct ggtacaggcg	6300
agggggtagc ctgcctcccc acaccaggt gcacggctcc cgtctgcggc tccccaggt	6360
ctcaccagct gattctggag aatatgtgtg ccgtgtggag aatggatcgg gccccagga	6420
ggcctccatt actgtgtctg tgctccacgg caccattct ggccccagct acacccagt	6480
gcccggcagc acccgcccc tccgcatcga gccctcctcc tcacacgtgg cggaaggga	6540
gacctggat ctgaactgcg tgggtccccg gcaggccac gccagggtca cgtggcaca	6600
gcgtgggggc agcctccctg cccggcacca gaccacggc tcgtgtctgc ggctgcacca	6660
ggtgaccccg gccgactcag gcgagtatgt gtgccatgtg gtgggcacct ccggccccct	6720
agaggcctca gtctgtgtca ccatcgaagc ctctgtcatc cctggacca tccacctgt	6780
caggatcag tcttcactct ccacagtggc cgagggccag accctggatc tgagctcgt	6840
ggtggcaggg caggccacg cccaggtcac atggtacaag cgtgggggca gcctccctgc	6900
ccggcaccag gttcgtggct cccgcctgta catcttcag gcctcacctg ccgatgcggg	6960
acagtacgtc tgccgggcca gcaacggcat ggaggcctcc atcacgggtca cagtaactgg	7020
gaccagggg gccaaacttag cctaccctgc cggcagcacc cagcccatcc gcacgagcc	7080
ctcctcctcg caagtggcgg aagggcagac cctggatctg aactgcgtgg tgccgggca	7140
gtcccatgcc caggtcacgt ggcacaagcg tgggggcagc ctccctgtcc ggcaccagac	7200
ccacggctcc ctgctgagac tctaccaagc gtccccgcc gactcgggcg agtacgtgtg	7260
ccgagtgttg ggcagctccg tgctctaga ggcctctgtc ctggtcacca ttgagcctgc	7320
gggctcagt cctgcacttg gggtcacccc cacggctcgg atcgagtcac cgtcttcgca	7380
agtggccgag gggcagaccc tggacctgaa ctgcctcgtt gctggtcagg cccatgcccc	7440
ggtcacgtgg cacaagcgcg ggggcagcct cccggccccg caccaggtgc atggctcag	7500
gctacgcctg ctccaggtga cccagctga ttcaggggag tacgtgtgcc gtgtggctcg	7560

cagctcaggt acccaggaag cctcagtcct tgtcaccatc cagcagcgcc ttagtggtc	7620
ccactcccag ggtgtggcgt acccgtccg catcgagtcc tcctcagcct ccctggccaa	7680
tggacacacc ctggacctca actgcctggg tgcagccag gctccccaca ccatcacctg	7740
gtataagcgt ggaggcagct taccagccg gcaccagatc gtgggctccc ggctgcggat	7800
ccctcaggtg actccggcag actcgggcga gtacgtgtgt cacgtcagta acggtgcagg	7860
ctccgggag acctcgctca tcgtcaccat ccagggcagc ggttcctccc acgtgccag	7920
cgtctcccca ccgatcagga tcgagtcgtc ttccccacg gtggtggaag ggcagacctt	7980
ggatctgaac tgcgtggtcg ccaggcagcc ccaggctatc atcacatggt acaagcgtgg	8040
gggcagcctt ccctcccgac accagacca tggtcccac ctgcggttg accaaatgtc	8100
tgtggctgac tcgggcgagt atgtgtgccg ggccaacaac aacatcgatg ccctggaggc	8160
ctccatcgtc atctccgtct cccctagcgc cggcagcccc tccgcccctg gcagctccat	8220
gcccatacaga attgagtcac cctcctcaca cgtggccgaa ggggagaccc tggatctgaa	8280
ctgcgtggtc cccgggcagg cccatgcccc ggtcacttg cacaagcgtg ggggcagcct	8340
ccccagtcac catcagaccc gcggctcacg gctgcggctg caccatgtgt ccccgccga	8400
ctcgggtgaa tacgtgtgcc gggatgagg cagctctggc cccctggagg cctcagtcct	8460
ggtcaccatc gaagcctctg gctcaagtgc tgtccacgtc cccgccccag gtggagcccc	8520
acccatccgc atcgagccct cctcctccg agtggcagaa ggcagaccc tggatctgaa	8580
gtgcgtggg cccgggcagg cccacgcccc ggtcacgtg cacaagcgtg gaggaacct	8640
ccctgcccgg caccaggtcc acggccact gctgaggctg aaccaggtgt ccccggtga	8700
ctctggcgag tactcgtgcc aagtgaccgg aagctcaggc accctggagg catctgtcct	8760
ggtcacaatt gagccctcca gccaggacc cattcctgct ccaggactgg cccagcccat	8820
ctacatcgag gcctcctctt cacacgtgac tgaaggcag actctggatc tgaactgtgt	8880
ggtgcccggg caggcccatg cccaggtcac gtggtacaag cgcgggggca gcctccccgc	8940
ccggcaccag acccatggct cccagctgcg gctccacctc gtctcccctg ccgactcagg	9000
cgagtatgtg tgtcgtgcag ccagcggccc aggcctgag caagaagcct ccttcacagt	9060

caccgtcccc cccagtgagg ggtcttccta ccgccttagg agcccgggtca tctccatcga	9120
cccgccccagc agcaccgtgc agcagggcca ggatgccagc ttcaagtgcc tcatccatga	9180
cggggcagcc cccatcagcc tcgagtggaa gacccggaac caggagctgg aggacaacgt	9240
ccacatcagt cccaatggct ccatcatcac catcgtgggc acccggccca gcaaccacgg	9300
tacctaccgc tgcgtggcct ccaatgccta cgggtgtggcc cagagtgtgg tgaacctcag	9360
tgtgcacggg cccctacag tgtccgtgct ccccagggc cccgtgtggg tgaaagtggg	9420
aaaggctgtc accctggagt gtgtcagtgc cggggagccc cgctcctctg ctcgttgga	9480
ccggatcagc agcaccctg ccaagttgga gcagcggaca tatgggctca tggacagcca	9540
cgcggtgctg cagatttcat cagctaaacc atcagatgcg ggcacttatg tgtgccttgc	9600
tcagaatgca ctaggcacag cacagaagca ggtggagggtg atcgtggaca cggcgccat	9660
ggccccaggg gccctcagg tccaagctga agaagctgag ctgactgtgg aggctggaca	9720
cacggccacc ttgcgtgct cagccacagg cagccccgcg cccaccatcc actggtccaa	9780
gctgcgttcc ccaactgcct ggagcaccg gctggaaggt gacacactca tcataccccg	9840
ggtagcccag caggactcgg gccagtacat ctgcaatgcc actagccctg ctgggcacgc	9900
tgaggccacc atcatcctgc acgtggagag cccaccatat gccaccacgg tcccagagca	9960
cgcttcggtg caggcagggg agacgggtgca gctccagtgc ctggctcacg ggacaccccc	10020
actcaccttc cagtggagcc gcgtgggcag cagccttcct gggagggcga ccgccaggaa	10080
cgagctgctg cactttgagc gtgcagcccc tgaggactca ggccgctacc gctgccgggt	10140
caccaacaag gtgggctcag ccgaggcctt tgcccagctg ctcgtccaag gccctcccgg	10200
ctctctccct gccacctcca tcccagcagg gtccacgccc accgtgcagg tcacgcctca	10260
gctagagacc aagagcattg gggccagcgt tgagttccac tgtgctgtgc ccagcgaccg	10320
gggtacccag ctccgttggt tcaaggaagg gggtcagctg cctccgggtc acagcgtgca	10380
ggatgggggtg ctccgaatcc agaacttga ccagagctgc caaggacgt atatatgcca	10440
ggcccatgga ccttggggga aggccaggc cagtgccag ctggttatcc aagccctgcc	10500
ctcggtgctc atcaacatcc ggacctctgt gcagaccgtg gtggttgcc acgccgtgga	10560

gttcgaatgc ctggcactgg gtgaccccaa gcctcaggtg acatggagca aagttggagg	10620
gcacctgcgg ccaggcattg tgcagagcgg aggtgtcgtc aggatcgccc acgtagagct	10680
ggctgatgcg ggacagtatc gctgcactgc caccaacgca gctggcacca cacaatccca	10740
cgtcctgctg cttgtgcaag ccttgcccca gatctcaatg cccaagaag tccgtgtgcc	10800
tgctggttct gcagctgtct tcccctgcat agcctcaggc taccctactc ctgacatcag	10860
ctggagcaag ctggatggca gcctgccacc tgacagccgc ctggagaaca acatgctgat	10920
gctgccctca gtccgacccc aggacgcagg tacctacgtc tgcaccgcca ctaaccgcca	10980
gggcaaggtc aaagcctttg cccacctgca ggtgccagag cgggtggtgc cctacttcac	11040
gcagaccccc tactccttcc taccgctgcc caccatcaag gatgcctaca ggaagttcga	11100
gatcaagatc accttcgggc ccgactcagc cgatgggatg ctgctgtaca atgggcagaa	11160
gcgagtccca gggagcccca ccaacctggc caaccggcag cccgacttca tctccttcgg	11220
cctcgtgggg ggaaggcccg agttccggtt cgatgcaggc tcaggcatgg ccaccatccg	11280
ccatcccaca ccaactggccc tgggccattt ccacaccgtg accctgctgc gcagcctcac	11340
ccagggctcc ctgattgtgg gtgacctggc cccggtcaat gggacctccc agggcaagtt	11400
ccagggcctg gatctgaacg aggaactcta cctgggtggc tatcctgact atggtgccat	11460
cccaaggcg gggctgagca gcggcttcat aggtgtgtc cgggagctgc gcatccaggg	11520
cgaggagatc gtcttccatg acctcaacct cacggcgcac ggcatctccc actgccccac	11580
ctgtcgggac cggccctgcc agaatggcgg tcagtgccat gactctgaga gcagcagcta	11640
cgtgtgcgtc tgcccagctg gcttcaccgg gagccgctgt gagcactcgc aggccctgca	11700
ctgccatcca gaggcctgtg ggcccgcgc cacctgtgtg aaccggcctg acggtcgagg	11760
ctacacctgc cgctgccacc tgggccgctc ggggttgagg tgtgaggaag gtgtgacagt	11820
gaccaccccc tcgctgtcgg gtgctggctc ctacctggca ctgcccggcc tcaccaacac	11880
acaccacgag ctacgcctgg acgtggagtt caagccactc gccctgacg gggtcctgct	11940
gttcagcggg ggaagagcg ggcctgtgga ggacttcgtg tccctggcga tgggtggcgg	12000
ccacctggag ttccgctatg agttggggtc agggctggcc gttctgcgga gcgccgagcc	12060

gctggccctg ggccgctggc accgtgtgtc tgcagagcgt ctcaacaagg acggcagcct	12120
gcgggtgaat ggtggacgcc ctgtgctgcg ctcctcgccc ggcaagagcc agggcctcaa	12180
cctgcacacc ctgtcttacc tgggggggtgt ggagccttcc gtgccactgt ccccgccac	12240
caacatgagc gctcacttcc gcggctgtgt gggcgagggtg tcagtgaatg gcaaaccgct	12300
ggacctcacc tacagtttcc taggcagcca gggcatcggg caatgctatg atagctcccc	12360
atgtgagcgc cagccttgcc aacatggtgc cacgtgcatg cccgctggcg agtatgagtt	12420
ccagtgcctg tgctgagatg gattcaaagg agacctgtgt gagcacgagg agaaccctg	12480
ccagctccgt gaaccctgtc tgcattggggg cacctgccag ggcacccgct gcctctgcct	12540
ccctggcttc tctggccac gctgccaaca aggtcttga catggcatag cagagtccga	12600
ctggcatctt gaaggcagcg ggggcaatga tgcccctggg cagtacggag cctatttcca	12660
cgatgatggc ttcctgcct tccctggcca tgtcttctcc aggagcctgc ccgaggtgcc	12720
cgagaccatc gagctggagg ttcggaccag cacagccagt ggcctcctgc tctggcaggg	12780
tgtggagggtg ggagaggccg gccaaaggcaa ggacttcac agcctcgggc ttcaagacgg	12840
gcacctgtc ttcaggtacc agctgggtag tggggaggcc cgcctggtct ctgaggaccc	12900
catcaatgac ggcgagtggc accgggtgac agcactgcgg gagggccgca gaggttccat	12960
ccaagtgcac ggtgaggagc tggtcagcgg ccggtcccca ggtcccaacg tggcagtcaa	13020
cgccaagggc agcgtctaca tcggcggagc ccctgacgtg gccacgctga ccgggggcag	13080
attctctca ggcacacag gctgtgtcaa gaacctggtg ctgcactcgg cccgaccgg	13140
cgccccgcc ccacagcccc tggacctgca gcaccgcgc caggccgggg ccaacacacg	13200
cccctgcccc tcgtaggcac ctgcctgccc cacacggact cccgggccac gcccagccc	13260
gacaatgtcg agtatattat tattaatatt attatgaatt tttgtaagaa accgaggcga	13320
tgccacgctt tgctgctacc gccctgggct ggactggagg tggcatgcc accctcacac	13380
acacagctgg gcaaagccac aaggctggcc agcaaggcag gttggatggg agtgggcacc	13440
tcagaaagtc accaggactt ggggtcagga acagtggctg ggtgggcca gaactgcccc	13500
cactgtcccc ctaccaccg atggagcccc cagatagagc tgggtggcct gtttctgcag	13560

cccttgggca gttctcactc ctaggagagc caacctcggc ttgtgggctg gtgccccaca	13620
gctacctgag acgggcatcg caggagtctc tgccaccac tcaggattgg gaattgtctt	13680
tagtgccggc tgtggagcaa aaggcagctc acccctgggc aggcgggtccc catccccacc	13740
agctcgtttt tcagcacccc caccacctc caccagccc ctggcacctc ctctggcaga	13800
ctccccctcc taccacgtcc tcctggcctg cattcccacc ccctcctgcc agcacacagc	13860
ctgggggtccc tcctcaggg gctgtaaggg aaggcccacc ccaactctta ccaggagctg	13920
ctacaggcag agcccagcac tgatagggcc cgcgccaccg ggccccgccc accccaggcc	13980
acatccccac ccatctggaa gtgaaggccc agggactcct ccaacagaca acggacggac	14040
ggatgccgct ggtgctcagg aagagctagt gccttaggtg ggggaaggca ggactcacga	14100
ctgagagaga gaggaggggg atatgaccac cctgccccat ctgcaggagc ctgaagatcc	14160
agctcaagtg ccctcctgcc agtggcccc agactgtggg gttgggacgc ctggcctctg	14220
tgtcctagaa gggaccctcc tgtggtcttt gtcttgattt ttcttaataa acggtgctat	14280
ccccgccaaa aaaa	14294



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 735233
FR 0905904

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	WO 2008/000974 A2 (OCCITANE L [FR]; PIERRISNARD JEAN-LOUIS [FR]; MILLOU YVES [FR]; FONTES) 3 janvier 2008 (2008-01-03) * revendications; exemples *	1-9	A61K8/97 A61K36/61 A61Q19/00 A61P17/00
Y	WO 2008/007004 A2 (SILAB SA [FR]; PAUFIQUE JEAN [FR]) 17 janvier 2008 (2008-01-17) * revendications; exemples *	1-9	
Y	US 2007/134189 A1 (GOLZ-BERNER KARIN [MC] ET AL) 14 juin 2007 (2007-06-14) * alinéa [0006]; revendication 1 *	1-9	
Y	"Myrtle Essential Oil" INTERNET CITATION 9 décembre 2006 (2006-12-09), XP007914115 Extrait de l'Internet: URL: http://web.archive.org/web/20061209181603/http://www.naturalhealthcrafters.com [extrait le 2010-07-26] * page 2, ligne 3-5 *	1-9	
Y	US 2005/153003 A1 (MENON GOPINATHAN K [US] ET AL) 14 juillet 2005 (2005-07-14) * revendications 1,14-16 *	1-9	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Y	FR 2 886 544 A1 (KIOTIS SOC PAR ACTIONS SIMPLIF [FR]) 8 décembre 2006 (2006-12-08) * revendications *	1-9	A61K A61Q

Date d'achèvement de la recherche		Examineur
15 septembre 2010		Miller, Bernhard

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention
X : particulièrement pertinent à lui seul	Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	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.
A : arrière-plan technologique	O : divulgation non-écrite	D : cité dans la demande
P : document intercalaire		L : cité pour d'autres raisons
		& : membre de la même famille, document correspondant

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0905904 FA 735233**

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 **15-09-2010**

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
WO 2008000974	A2	03-01-2008	EP 2038013 A2	25-03-2009
			FR 2903014 A1	04-01-2008
			US 2009269419 A1	29-10-2009

WO 2008007004	A2	17-01-2008	FR 2903601 A1	18-01-2008
			US 2010009018 A1	14-01-2010

US 2007134189	A1	14-06-2007	AT 363266 T	15-06-2007
			CN 1913869 A	14-02-2007
			DE 102004007385 A1	01-09-2005
			EP 1713433 A1	25-10-2006
			WO 2005077328 A1	25-08-2005
			ES 2286785 T3	01-12-2007

US 2005153003	A1	14-07-2005	AU 1985802 A	11-06-2002
			CA 2428921 A1	06-06-2002
			EP 1343460 A1	17-09-2003
			WO 0243681 A1	06-06-2002

FR 2886544	A1	08-12-2006	AUCUN	
