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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
6 mars 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/018730 A1

(51) Classification internationale des brevets[7] : C11B 9/00, A61K 35/78, 7/48

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/02954

(22) Date de dépôt international : 28 août 2002 (28.08.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/11224 29 août 2001 (29.08.2001) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **L'OCCITANE** [FR/FR]; Z.I. Saint-Maurice, F-04100 Manosque-en-Provence (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **MILLOU, Yves** [FR/FR]; Vallon des Lèves, F-04210 Valensole (FR). **FONTES, Katia** [FR/FR]; 540, chemin des Plâtrières, F-13090 Celony (FR). **TOUREL, Cécile** [FR/FR]; 238, Le Logisson, F-04180 Villeneuve (FR).

(74) Mandataires : **BREESÉ, Pierre** etc.; Breesé-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(81) États désignés *(national)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(régional)* : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale*

— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 03/018730 A1

(54) Title: COSMETIC COMPOSITION COMPRISING AN ESSENTIAL OIL EXTRACTED FROM HELICHRYSUM ITALICUM

(54) Titre : COMPOSITION COSMETIQUE COMPRENANT UNE HUILE ESSENTIELLE EXTRAITE D'HELICHRYSUM ITALICUM

(57) Abstract: The invention concerns a cosmetic composition, in particular an anti-wrinkle or anti-aging or hydrating composition, comprising an essential oil extracted from the flowery tops of Helichrysum italicum. Said composition is particularly designed for body and face care.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une composition cosmétique, notamment anti-rides ou anti-âge ou hydratante, comprenant une huile essentielle extraite des sommités fleuries d'Helichrysum italicum. Ladite composition est tout particulièrement destinée aux soins du corps et du visage.

COMPOSITION COSMETIQUE COMPRENANT UNE HUILE ESSENTIELLE EXTRAITE D'HELICHRYSUM ITALICUM

La présente invention a pour objet une huile essentielle extraite Helichrysum italicum, sa préparation et les compositions cosmétiques et dermatologiques la contenant.

Il existe environ 500 espèces d'hélichryses. Très polymorphes, il est difficile de les distinguer les unes des autres. Elles sont encore très mal connues et l'extraction de l'essence par distillation est peu courante.

Il a toutefois déjà été rapporté dans l'art antérieur la préparation d'une huile essentielle d'Hélichrysum italicum comprenant de l'acétate de néryle (28,9 %) (Satta M. et al., CAS, vol. 132, no.17, 24 Avril 2000).

Il a par ailleurs été décrit l'isolement de flavonoïdes d'Hélichrysum italicum et leur activité de protection vis-à-vis du processus de dégénération de la peau (Maffei Facino R. et al., CAS, vol . 115, no. 1991). Mais les flavonoïdes n'ont rien à voir avec l'acétate de néryle.

Il a enfin été indiqué que l'huile essentielle d'Hélichrysum italicum présente des propriétés anti-microbiennes (Chirkina N. N. et al., CAS, vol. 81, no. 9, 2 Septembre 1994) et peut être utilisée dans des compositions antiseptiques pour favoriser la cicatrisation (brevet US 5 785 972)

Les travaux réalisés par la Demanderesse dans le cadre de la présente invention ont concerné la préparation de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation ou à

l'aide d'un fluide d'extraction de préférence à l'état super critique ou proche, de la matière végétale des sommités fleuries, d'une plante de la famille des astéracées : Helichrysum italicum variété serotinum aussi nommée Helichrysum angustifolium D.C.

La Demanderesse a maintenant mis en évidence les propriétés cosmétiques et dermatologiques remarquables d'une huile essentielle d'Helichrysum italicum. En effet, l'acétate de néryle présent à fort pourcentage dans l'huile essentielle d'hélichrysum italicum, lui confère des propriétés très particulières dans ces domaines :

- activité anti-radicalaire très élevée ;
- multiplication très significative de la production de collagène I, de l'ordre de 6 fois ;
- augmentation de la production de VEGF de l'ordre de 2 fois ;
- accroissement des échanges cellulaires ;
- activation de la micro-circulation cutanée ayant pour corollaire de faciliter l'élimination des déchets, donc revitaliser les cellules et dynamiser la biologie cutanée ;
- propriétés décongestionnantes et protectrices permettant de renforcer les équilibres et les défenses au niveau de la peau ;
- action antiseptique et dermopurifiante contribuant à assainir l'environnement cellulaire.

L'invention a donc pour objet une composition cosmétique, notamment anti-rides ou anti-age ou hydratante, comprenant une huile essentielle extraite des sommités

fleuries d'Helichrysum italicum, plus particulièrement de la variété serotinum aussi nommée Helichrysum angustifolium D.C. La composition selon l'invention est tout particulièrement destiné aux soins du visage et du corps.

La composition de l'invention est utile pour le soin de la peau, elle présente un intérêt tout particulier pour lutter contre le vieillissement de la peau (anti-age) et notamment pour traiter ou prévenir les rides, pour hydrater la peau ou la protéger des effets néfastes de l'environnement comme le soleil (composition solaire).

Avantageusement, l'huile essentielle est obtenue par hydrodistillation ou à l'aide d'un fluide d'extraction de préférence à l'état super critique ou proche.

La composition de l'huile essentielle d'Hélichrysum italicum de Corse est très originale. Son constituant principal, l'acétate de néryle, y est en forte proportion, de 40 à 50 % en moyenne et jusqu'à 70 % dans les monts de la Balagne, région située au nord-ouest de la Corse. Il est à remarquer que l'acétate de néryle est en forte proportion lorsqu'on distille les sommités fleuries ; lorsqu'on distille la plante entière, le taux tombe à 5 % environ.

Tout préférentiellement, l'invention concerne l'utilisation non thérapeutique de l'huile essentielle d'hélichrysum italicum comme définie précédemment, dans une composition cosmétique pour le soin de la peau, notamment en luttant contre les rides et/ou en hydratant la peau et plus généralement en luttant contre les effets du vieillissement.

Plus particulièrement, l'invention se rapporte à l'utilisation de l'huile essentielle d'hélichrysum italicum

comme agent antiradicalaire polyvalent pour la préparation d'une composition cosmétique ou dermatologique pour le soin de la peau, notamment en luttant contre les rides et/ou en hydratant la peau et plus généralement en luttant contre les effets du vieillissement.

Les travaux réalisés par la Demanderesse dans le cadre de l'invention ont également permis de mettre en évidence la capacité de cette huile essentielle à augmenter la production de collagène I et de VEGF ce qui s'est avéré particulièrement utile pour lutter contre les rides et plus généralement contre le vieillissement de la peau.

En effet, comme indiqué précédemment, l'huile essentielle, son utilisation et les compositions la contenant présente des propriétés remarquables pour :

- hydrater la peau ;
- accroître les échanges cellulaires ;
- activer la micro-circulation cutanée et ainsi faciliter l'élimination des déchets et revitaliser les cellules ;
- décongestionner, protéger et ainsi renforcer les équilibres et les défenses au niveau de la peau ;
- assainir l'environnement cellulaire.

Les compositions selon l'invention comprennent une quantité efficace de ladite huile pour obtenir les effets anti-radicalaires, pro collagène I et VEGF mis en évidence. Cette quantité représente de 0,1 à 5%, de préférence de 0,1 à 2,1% en poids de ladite huile par rapport au poids de la composition.

Les compositions cosmétiques et dermatologiques selon l'invention peuvent comprendre d'autres actifs comme par exemple à titre non limitatif : perhydrosqualène naturel, sucroesters, huile de bourrache, huile d'onagre, huile de pépins de raisins, vitamine A, vitamine E, allantoïne.

Les compositions cosmétiques et dermatologiques selon l'invention comprennent généralement aussi un ou plusieurs agents de formulation, comme des agents tensioactifs, des agents conservateurs, des agents solubilisants, des agents gélifiants, des additifs gras non végétaux, du propylène glycol, du sorbitol, du glycérol, de la triéthanolamine, des bases de parfum, de l'eau en quantité suffisante pour 100.

Les compositions 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 celles de la compatibilité avec l'huile de l'invention et pour l'application sur la peau.

L'huile selon l'invention peut être libre ou incluse dans des nanosphères à libération retardée de façon à créer un effet de rémanence. A titre d'exemples de telles nanosphères, on peut citer les sphérulites ou celles décrites dans la demande de brevet internationale WO00/35577.

Ainsi, l'invention a pour objet une méthode de soin cosmétique consistant à appliquer sur la peau une quantité adéquate de la composition ci-dessus.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent concernant la préparation et les propriétés de l'huile essentielle d'Helichrysum angustifolium D.C.

I - Préparation de l'huile essentielle d'Helichrysum angustifolium D.C.

L'extraction de l'huile essentielle pour ce type de végétal s'effectue classiquement 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 reliée à un dispositif de maintien de pression régulée.

Les fluides d'extraction sont 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. Cette technique a été souvent décrite dans la littérature spécialisée.

II - Pouvoir anti-radicalaire de l'huile essentielle d'Helichrysum angustifolium D.C.

Le radical hydroxyle est une molécule très réactive dont la production est activée par les différents stress subits par la peau (pollution, UV, variations de température, etc.). Il est responsable de nombreux dégâts dans la cellule et notamment de la dégradation des membranes par le phénomène de péroxydation lipidique.

L'objectif de la présente étude a été d'apprécier le pouvoir anti-radicalaire d'un produit cosmétique par la méthode *in vitro* des dienes conjugués.

Cette méthode permet de tester l'action protectrice du produit sur des liposomes (analogues de membrane) soumis à une attaque de radicaux hydroxyles (OH-)

1) Principe.

L'action des radicaux libres sur les acides gras polyinsaturés des membranes est une péroxydation qui conduit à la formation de dienes conjugués absorbant à 233 nm.

L'activité des antioxydants est donc dosée par leur capacité à empêcher la péroxydation d'acides gras polyinsaturés contenus dans des liposomes (modèle *in vitro* se rapprochant le plus de la réalité *in vivo*).

Cette péroxydation est caractérisée par un pic d'absorption à 233 nm. La méthode et le protocole utilisés sont par exemple décrits dans la littérature.

2) Résultats.

Au terme de l'essai, il apparaît que le produit Huile essentielle d'Helichrysum italicum inhibe la péroxydation lipidique de 82 % + 2 % dans les conditions expérimentales.

Ce résultat est remarquablement satisfaisant.

Testée dans les mêmes conditions opératoires une huile essentielle de lavande inhibe la péroxydation lipidique de 19 % + 2 %.

Cette activité anti-radicalaire est essentielle dans la lutte contre le vieillissement accéléré.

Les cibles privilégiées des radicaux libres sont les lipides des membranes cellulaires. En les agressant, ils

viennent perturber leur minutieuse organisation, la membrane perd de sa fluidité et de sa cohésion.

A la longue, elle finit par se fissurer et ne peut plus jouer son rôle de barrière protectrice. Le tissu conjonctif, constitué essentiellement de collagène, se trouve également touché, ce qui accélère le vieillissement.

Pour mieux comprendre ce phénomène du vieillissement accéléré, il convient de rappeler deux notions simples :

- Un atome est un ensemble d'éléments en équilibre, électriquement neutre.

- Un radical libre est un atome possédant un électron célibataire lui donnant une très grande réactivité dans la recherche d'un autre électron afin de retrouver un état stable.

Dans la recherche d'un état stable, les radicaux libres sont très actifs et induisent d'importantes modifications réactionnelles au sein de la cellule, modifications pouvant atteindre l'ADN, les acides aminés. Ils dépolymérisent les constituants glucoprotéiniques de la substance fondamentale comme l'acide hyaluronique.

Les radicaux libres provoquent de profondes altérations des lipides, des protéines et des autres composants des membranes cellulaires.

Les agressions des membranes cellulaires, dues au processus de péroxydation, augmentent avec l'âge.

Les travaux étudiant l'interférence de l'auto-oxydation des tissus cérébraux et rénaux de 24 espèces animales montrent l'existence d'une relation directe entre la longévité de chaque espèce et le potentiel de production des péroxydes et des radicaux libres.

Ces travaux montrent également toute l'importance des anti-oxydants dans ce processus de longévité.

En effet, la cellule animale ou végétale se protège contre les agents d'oxydation grâce à des systèmes enzymatiques et par des anti-oxydants naturels.

L'huile essentielle d'Hélichrysum italicum se révèle être un efficace anti-oxydant naturel.

III - Exemple de composition pour le visage.

Pour mettre en avant l'activité anti-rides, la formule suivante d'un produit pour le visage contenant 0,7 % d'huile essentielle d'Helichrysum italicum a été préparée :

Huile essentielle Helichrysum italicum	0,7
Huile de pépins de raisin	80,02
Huile de Bourrache	1
Perhydrosqualène naturel	18
Vitamine E naturelle	0,2
Extrait de romarin	0,05
Huile essentielle Géranium	0,03

L'étude du relief cutané a été réalisée par la méthode des empreintes. Le test a été réalisé sur 20 sujets volontaires. Toute application de cosmétiques ou autres produits topiques a été arrêtée 48 heures avant le début de l'expérimentation. On a procédé chaque matin à une application du produit durant 4 semaines et l'on a évalué les paramètres suivants :

. Surface totale ridée :

Ce paramètre donne une information sur la surface totale des rides (mm2)

Moyenne T 0 = 4,571 mm2

Moyenne T 4s = 2,843 mm2

Soit : - 37,8%

. Nombre de rides :

Moyenne T 0 = 61,3

Moyenne T 4s = 52,7

Soit : - 14 %

. Profondeur moyenne des rides (en tenant compte du nombre de rides disparues après traitement) :

- 19,8 %

Ces trois paramètres sont très satisfaisants et montrent la propriété anti-rides remarquable des compositions selon l'invention.

IV - Étude des propriétés biomécanique de la peau avec la composition de l'exemple III.

Vingt utilisatrices ont été sollicitées pour une application quotidienne durant quatre semaines.

Résultat : UR/UB = R5 : fermeté à une contrainte : + 14,7% + 0,11

La composition de l'exemple III ci-dessus assure une bonne fermeté cutanée.

V - Évaluation de l'hydratation par la méthode des empreintes avec la composition de l'exemple III.

Vingt utilisatrices ont été sollicitées pour une application quotidienne durant quatre semaines.

Résultat : Le paramètre RA = Rugosité moyenne diminue de - 8,9 %, ce qui traduit un lissage cutané, soit un effet hydratant.

VI - Encapsulation de l'huile essentielle hélichrysum italicum dans des nanosphères.

Pour optimiser l'activité de l'huile essentielle hélichrysum italicum, celle-ci a été incorporée dans des nanosphères. Cette méthode présente l'avantage d'augmenter la biodisponibilité des actifs. La libération contrôlée des actifs augmente la chronodisponibilité au niveau des cellules cutanées. Pratiquement, l'huile essentielle d'hélichrysum italicum a été encapsulée dans des Sphérulites. Les sphérulites sont des vésicules multilamellaires d'environ un micron qui imitent la structure d'un oignon. La centaine de membranes qui les composent est formée d'une alternance de bicouches contenant des sucroester et un taux d'huile essentielle optimisé.

Les sphérulites grâce à une libération lente et contrôlée de l'actif permettent de réduire le pourcentage d'huile essentielle tout en gardant la même efficacité. Le bénéfice est une tolérance très améliorée, une hypoallergénicité, une activation de la micro-circulation.

La formule de crème pour le visage ci-dessous a été élaborée :

Sphérulites Hélichrysum italicum	2
Alcool gras	4
Huile de pépins de raisin	5
Glycérol	5

Extrait de romarin
0,05
Vitamine A 0,2
Vitamine E naturelle 0,2
Agents tensioactifs 5
Agents conservateurs 0,9
Base parfumée 0,5
Eau déminéralisée
Q.S.

Une étude du relief cutané par la méthode des empreintes a été réalisée. Les expérimentations ont été menées sur 20 sujets volontaires. Toute application de cosmétiques ou autres produits topiques a été arrêtée 48 heures avant le début de l'expérimentation. On a procédé chaque matin à une application du produit durant 4 semaines et l'on a évalué les paramètres suivants :

- Surface totale ridée :

Ce paramètre donne une information sur la surface totale des rides (mm2).

Moyenne T 0 = 4,571 mm2
Moyenne T 4s = 2,843 mm2
Soit : - 37,8%

- Nombre de rides :

Moyenne T 0 = 61,3
Moyenne T 4s = 52,7
Soit : - 14 %

- Profondeur moyenne des rides (en tenant compte du nombre de rides disparues après traitement) :

19,8 %

Ces trois paramètres sont très satisfaisants et montrent la propriété anti-rides remarquable des compositions selon l'invention.

VII - Étude des propriétés biomécanique de la peau avec la composition de l'exemple VI.

Vingt utilisatrices ont été sollicitées pour une application quotidienne durant quatre semaines.

Résultat : UR/UB = R5 : fermeté à une contrainte. + 14,7% + 0,11

La composition de l'exemple VI ci-dessus assure une bonne fermeté cutanée.

VIII - Étude des propriétés biomécanique de la peau avec la composition de l'exemple VI.

Vingt utilisatrices ont été sollicitées pour une application quotidienne durant quatre semaines.

Résultat : Le paramètre RA = Rugosité moyenne diminue de - 8,9 %, ce qui traduit un lissage cutané, soit un effet hydratant.

IX - Étude de l'effet de la composition de l'exemple III sur la synthèse de collagène de type 1.

1) Introduction.

- Les fibres du derme : Les fibres du derme comprennent les fibres de collagène et les fibres élastiques. Elles représentent quantitativement les protéines de structure les plus importantes du derme, soit respectivement 75 % et 5 % de leur poids sec. Leur proportion relative et leur disposition sont différentes selon les zones superficielles ou profondes du derme.

- Les fibroblastes : Les fibroblastes sont responsables de la synthèse et de l'entretien du matériel extracellulaire. Ce sont des cellules d'origine mésenchymateuse, qui synthétisent le collagène, l'élastine, la substance fondamentale et les glycoprotéines de structure.

- Les fibres de collagène : Les collagènes forment une très grande famille. Ce sont des molécules de la matrice extracellulaire composées de trois chaînes polypeptidiques portant la répétition de trois acides aminés : -Gly-X-Y, où X et Y sont souvent des prolines ou des hydroxyprolines. Les fibres de collagène du derme sont constituées respectivement de collagène I et de collagène III, autour d'un axe composé du collagène V. Ces collagènes appartiennent au groupe des collagènes fibrillaires. Chez l'adulte, le collagène I est en moyenne six fois plus abondant que le collagène III.

- Collagènes et vieillissement : Le rapport collagène I /collagène III diminue au cours du vieillissement. On assiste à une augmentation exponentielle de pontages chimiques entre les fibres de collagène dus à la réaction de glycation non enzymatique de Maillard. Ce pontage chimique du collagène aboutit à une rigidification des fibres. Sa dégradation et son renouvellement sont ainsi ralentis.

- Modification des fibroblastes : Le fibroblaste est une cellule clef du tissu conjonctif qui intervient dans la formation et la stabilisation des fibres élastiques, mais aussi dans leur dystrophie et leur lyse. Lors du vieillissement, le fibroblaste diminue son activité et cette cellule au repos est appelé fibrocyte. Il devient globuleux avec diminution de son cytoplasme et raréfaction de son reticulum endoplasmique dont les vésicules sont très dispersées. Cette cellule n'est plus en contact avec le collagène.

2) Principe de l'étude.

La modification favorisant la perte d'élasticité et de fermeté de la peau du fait de la désorganisation et la raréfaction du collagène a été étudiée de façon à démontrer l'efficacité des compositions de l'invention.

Ainsi, l'activité de la composition de l'exemple II sur la sécrétion du collagène I dans le milieu de culture par les fibroblastes a été évaluée.

Le modèle expérimental retenu consiste en une culture de fibroblastes humains normaux jusqu'à confluence. Les cellules sont incubées avec la composition de l'exemple III à 0,05 % (concentration révélée non cytotoxique pour les cellules au test MTT). Par la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), qui présente l'avantage d'une mise en œuvre facile, sensible et spécifique, nous dosons le collagène de type 1 au niveau du milieu de culture.

- Matériel et méthode : Dans un premier temps des cultures de fibroblastes ont été établies par la méthode des explants à partir de prélèvements de peau caucasienne saine (plastie abdominale). Les fibroblastes sont cultivés jusqu'à confluence, à 37°C dans un milieu MEM (Minimum Essential Medium) contenant 2 mM de L-Glutamine et 10 % de sérum de veau fœtal dans une atmosphère saturée en humidité avec 5 % de CO2. Puis, après décollement par une solution isotonique tamponnée pH 7.2 de trypsine à 0,1 % et d'EDTA 0,02 %, les cellules sont ensemencées dans des microplaques de 96 puits (Falcon) à 10^4 cellules par puits dans le milieu susnommé. Après 24 heures, ce milieu est remplacé, pour une incubation de 48 heures par le même milieu sans sérum contenant 0,15 mM d'ascorbate de sodium (milieu d'incubation) avec ou sans le complexe d'actifs à tester.

Un type de fibroblastes a été choisi pour l'étude. Il s'agit de fibroblastes au 4ème passage ou repiquage de culture, représentant des cellules ayant des caractéristiques normales (aspect fusiforme ou étoilé,

bonne activité métabolique, bonne capacité d'étalement, etc.).

- Dosage du collagène : La quantité de collagène de type I sécrétée dans le milieu après incubation avec ou sans le complexe d'actifs a été déterminée à l'aide d'un test ELISA. Cette méthode permet de détecter certaines molécules non radioactives à de très faibles doses. Une méthode directe a été choisie consistant en l'absorption de l'antigène (collagène de type I) à une phase solide (plastique d'une plaque de microtitration réservée à l'ELISA).

- Procédure : Le milieu d'incubation est collecté et transféré dans les puits d'une plaque de microtitration. Une incubation de 24 heures à + 4°C permet l'adhésion du collagène au plastique. La plaque est ensuite rincée au PBS (Phosphate Buffer Saline). Après 24 heures d'incubation à + 4°C avec de la sérum albumine (2% dans PBS) pour éviter les liaisons anticorps-plastique non spécifiques, des anticorps de souris anticollagène I (sigma) (dilution 1:2000) conjugués à une phosphatase alcaline (2 heures à TA), qui en présence du phosphate de paranitrophényl, produira du paranitrophénol absorbant à 405 nm (1 heure à TA). Les densités optiques obtenues sont converties en ng de collagène grâce à une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions expérimentales avec du collagène de type I.

3) Résultats (figure 1).

La composition de l'exemple III utilisée à 0,05% dans le milieu de culture permet aux fibroblastes de synthétiser jusqu'à 6 fois plus de collagène de type I par rapport au témoin (milieu de culture seul).

La composition de l'exemple III initie et dynamise les programmes de synthèse d'un des composants majoritaires de la matrice extracellulaire du derme, le collagène de

type I. Il agit donc en excellent "booster" de la réorganisation des fibres de collagène.

La composition de l'exemple III permet d'améliorer la tonicité de la peau.

X - Étude de la capacité angiogène de la composition de l'exemple III.

1) Introduction.

L'angiogénèse est un processus fondamental par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés. Un grand nombre d'événements y sont impliqués parmi lesquels :

- la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire
- la migration et la prolifération des cellules endothéliales
- la formation d'une nouvelle matrice extracellulaire
- la formation de tubules et d'anastomoses des vaisseaux néoformés.

Ces actions dépendent du VEGF. Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est un facteur angiogénique et un mitogène pour les cellules endothéliales. C'est un facteur chimiotactique pour les monocytes et les ostéoblastes. Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, c'est un facteur de prolifération vasculaire, de production de néovaisseaux, ce qui permet une revascularisation.

2) Principe de l'étude.

Les modèles *in vitro* d'approche expérimentale de l'angiogénèse considèrent seulement de manière individualisée les différents composants du processus d'angiogénèse en étudiant la prolifération des cellules endothéliales ou leur migration ou encore leur capacité à s'associer en tubules lorsqu'elles sont au contact des protéines de la matrice extracellulaire. Aucun de ces

modèles n'est cependant le reflet de l'angiogénèse dans sa globalité.

Le modèle *in vitro* utilisé pour cette étude est le kit AngioKit (Biopredic - réf.ZHA-1000- lot n° 25173T) qui approche une vision plus globale de l'angiogénèse.

Dans ce modèle, des cellules endothéliales humaines sont ensemencées dans un milieu spécifique en co-culture avec un autre type de cellules humaines. Dans la phase initiale, les cellules endothéliales forment de petits îlots. Ils commencent ensuite à proliférer puis entrent dans une phase de migration qui conduit à la formation de structures en forme de tubules filamenteux dans la matrice. Au bout de 10 à 12 jours, les connexions établies forment un réseau de tubules anastomosés. La coloration des tubules est obtenue par marquage spécifique de l'antigène de surface CD 31 (PECAM-1), qui est exprimé par les cellules endothéliales.

Le test est validé par la coloration des tubules et par vérification de l'action inhibitrice et activatrice de 2 composés pharmacologiques connus pour agir sur l'angiogénèse. L'action sur l'angiogénèse des actifs testés est évaluée par analyse d'images quantitative.

Matériel et méthode : Les cellules sont cultivées en plaque de 24 puits, dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO2. Au 1er jour de l'expérimentation, l'observation microscopique montre les cellules au stade initial de croissance avec quelques petits îlots de cellules endothéliales (photo de la figure 2).

Le milieu de culture spécifique est éliminé et les cellules sont placées dans les différentes conditions de l'expérimentation :

- Témoin : milieu de culture
- Contrôle négatif : SURAMINE, agent inhibant la formation des tubules - concentration finale : 20 µM

- Contrôle positif : VEGF, agent activateur de l'angiogénèse - concentration finale : 2 ng/ml

- Composition de l'exemple III : Cette composition d'huiles essentielles n'étant pas miscible dans le milieu de culture, elle est solubilisée dans l'éthanol absolu et testée à 3 concentrations (dont on a vérifié au préalable le caractère non cytotoxique par contact 24H sur fibroblastes humains normaux) : 0,005% - 0,01% - 0,05% (v/v)

- Contrôle solvant : l'éthanol pouvant avoir des effets sur l'angiogénèse, il est testé à la concentration finale requise pour la solubilisation de la composition d'huiles essentielles : 0,1% (v/v).

Chaque condition est réalisée en duplicate.

Chaque jour, l'observation microscopique des cellules permet de contrôler l'évolution de la formation des tubules comme montré sur la photo de la figure 2.

Les milieux sont éliminés et les conditions renouvelées au 3ème, 6ème et 9ème jour de l'expérimentation.

Au 10ème jour, les cellules sont fixées et colorées : après rinçage au tampon PBS, les cellules sont fixées dans une solution d'éthanol à 70% refroidie à -20°C pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite incubées 1 heure à 37°C avec l'anticorps ZIS -3090 (TCS CellWorks) anti-CD-31 humain. Après lavages, une seconde incubation d'une heure à 37°C est effectuée avec un anti-corps anti-igG de souris conjugué à la phosphatase alcaline. Après rinçage, l'ajout de substrat BCIP/NBT provoque la coloration violet foncé des tubules après une incubation de 10 à 15 minutes.

- Évaluation du pouvoir angiogène : L'évaluation du pouvoir angiogène du composé testé est quantifiée par analyse d'images (OLYMPUS IX70 système Analysis Auto) en mesurant la longueur des tubules développés (en µm) et le nombre de jonctions établies au sein du réseau anastomosé.

Les résultats correspondent aux valeurs moyennes obtenues en analysant 8 images pour chaque condition.

3) Résultats.

La figure 3 présente pour chaque condition une image prise au 10ème jour d'expérimentation, du réseau tubulaire anastomosé néoformé après fixation et coloration.

L'évaluation du pouvoir angiogène de la composition de l'exemple III est réalisée par l'analyse de deux critères : la longueur du réseau tubulaire et le nombre de jonctions présentes dans celui-ci.

La figure 4 présente les résultats de l'analyse quantitative relative à la longueur des tubules néoformés.

Les résultats obtenus pour les composés pharmacologiques utilisés comme référence interne montrent en présence de suramine une inhibition de 49 % quant à la longueur du réseau tubulaire par rapport au témoin. Le VEGF a quant à lui un effet stimulateur de 54 %. Le solvant éthanol interagit également sur l'angiogénèse avec un effet inhibiteur de 11 % par rapport au témoin. Les résultats obtenus avec la composition Elixir "Immortelle" seront donc calculés par rapport au témoin solvant.

La composition de l'exemple III montre un léger effet de stimulation quant à la longueur du réseau tubulaire formé par rapport à la condition solvant. Il s'élève respectivement de 6 % à la concentration 0,005 %, de 11% à la concentration 0.01 % et de 6 % pour la concentration 0,05 %. Ces variations ne sont cependant pas statistiquement significatives.

La figure 5 présente les résultats de l'analyse quantitative concernant le nombre de jonctions établies dans le réseau tubulaire.

En présence de suramine, le nombre de jonctions est diminué d'un facteur 5,7 par rapport au témoin. Avec le VEGF, il est au contraire augmenté d'un facteur 1,7. Le

solvant éthanol interagit également en diminuant d'un facteur 2 le nombre de jonctions présentes dans le réseau.

En présence de la composition de l'exemple III, on observe, pour chacune des concentrations une forte augmentation du nombre de jonctions par rapport à la condition solvant : augmentation d'un facteur 1,5 à la concentration 0,005%, d'un facteur 2 à la concentration 0,01%, d'un facteur 1,6 à la concentration 0,05%. Il convient de noter que ces effets de stimulation ont une intensité proche voir supérieure à ceux obtenus avec la référence positive (VEGF).

La composition de l'Exemple III n'inhibe pas l'angiogénèse, au contraire elle Induit une stimulation d'un facteur 2 du nombre d'anastomoses effet comparable sinon supérieur au VEGF. Elle exerce donc un rôle dynamisant sur un des paramètres essentiels de l'angiogénèse.

REVENDICATIONS

1) Composition cosmétique, notamment anti-rides ou anti-age ou hydratante, caractérisée en ce qu'elle comprend une huile essentielle extraite des sommités fleuries d'Helichrysum italicum.

2) Composition cosmétique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est destinée aux soins du corps et du visage.

3) Composition cosmétique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'huile essentielle est obtenue par hydrodistillation ou à l'aide d'un fluide d'extraction de préférence à l'état super critique ou proche.

4) Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'huile essentielle comprend en poids de 40 à 70 % d'acétate de néryle.

5) Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend de 0,1 à 5% et de préférence de 0,1 à 2,1% en poids de ladite huile par rapport au poids de la composition.

6) Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'huile

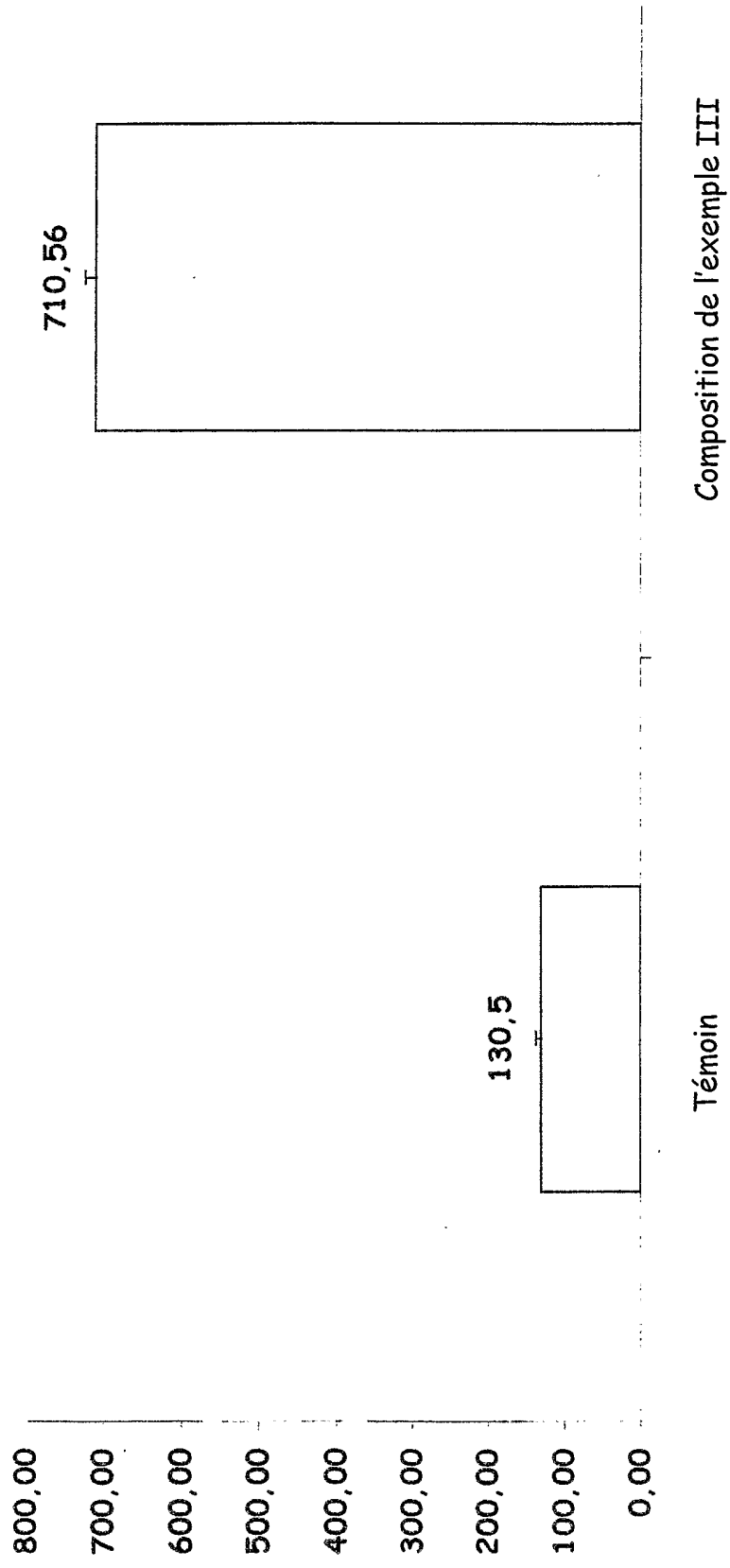
essentielle est incluse dans des nanosphères à libération retardée.

7) Utilisation non thérapeutique d'une l'huile essentielle d'hélichrysum italicum comme définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans une composition cosmétique pour le soin de la peau en luttant contre les rides et/ou en hydratant la peau ou plus généralement en luttant contre les effets du vieillissement.

8) Utilisation non thérapeutique d'une l'huile essentielle d'hélichrysum italicum comme définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, comme agent antiradicalaire polyvalent pour la préparation d'une composition cosmétique ou dermatologique pour le soin de la peau, notamment en luttant contre les rides et/ou en hydratant la peau ou plus généralement en luttant contre les effets du vieillissement.

9) Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'huile essentielle constitue en outre un agent capable d'augmenter la production de collagène I et de VEGF.

10) Méthode de soin cosmétique consistant à appliquer sur la peau une quantité adéquate d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

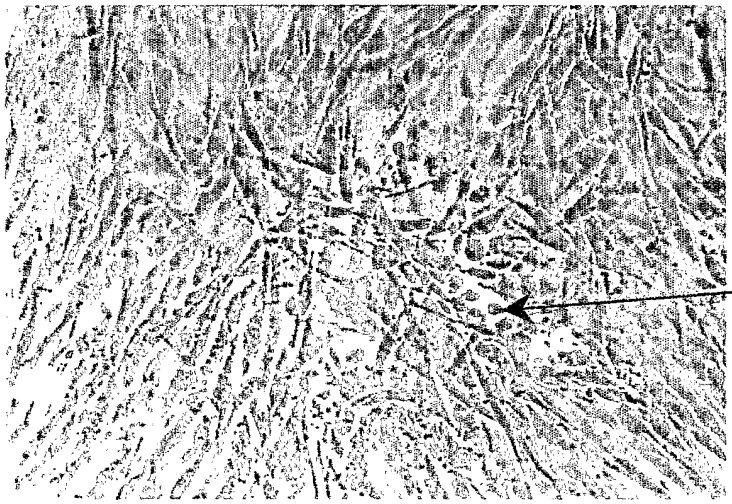


* Fibroblastes 34 ans 4ème passage

** Concentration maximale non cytotoxique

Figure 1

Figure 2A



Culture au stade initial (jour 1)

Figure 2B



Culture au jour 6

Figure 3A Contrôle solvant



Figure 3B Composition exemple III 0,005 %



Figure 3C Suramine



Figure 3D Composition exemple III 0,01 %

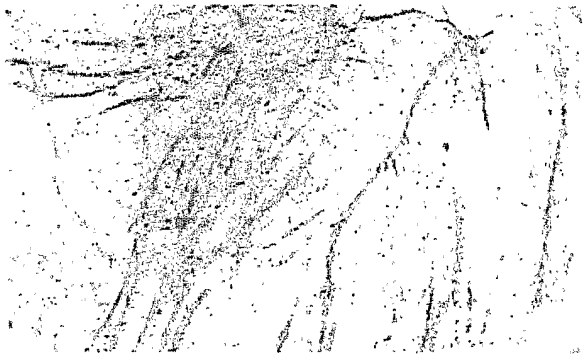


Figure 3E VEGF



Figure 3F Composition exemple III 0,05 %

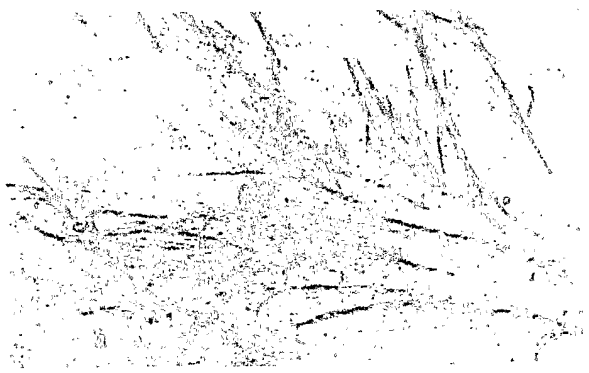
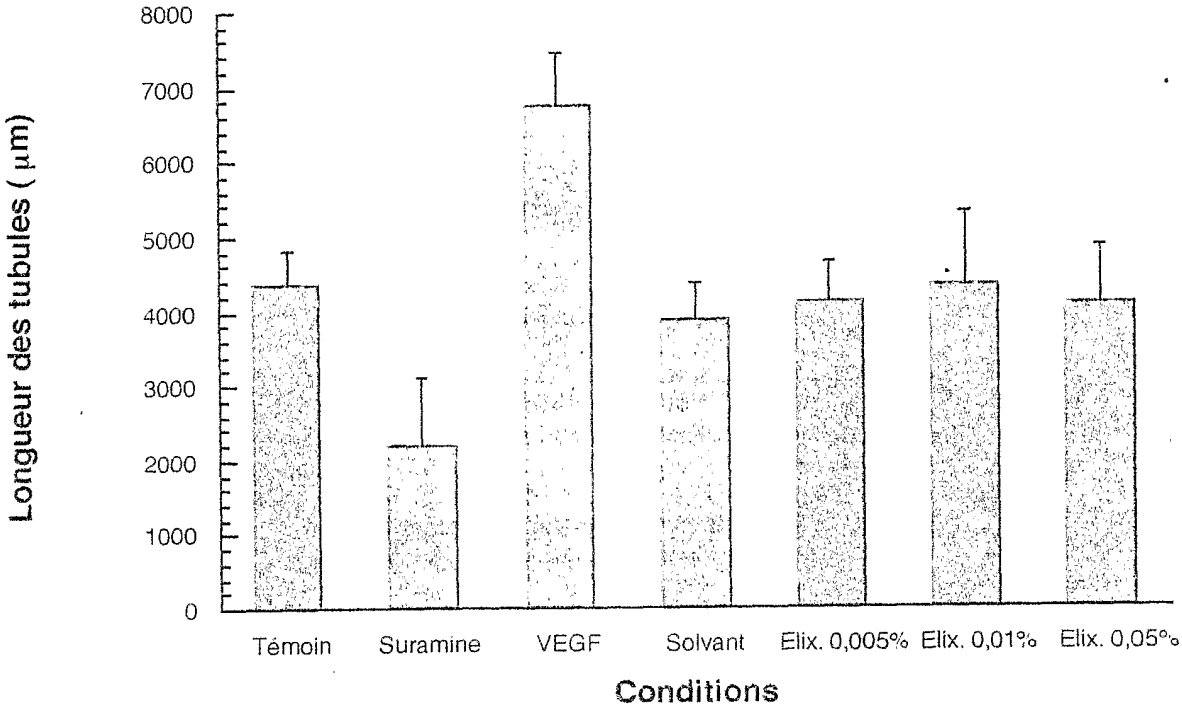
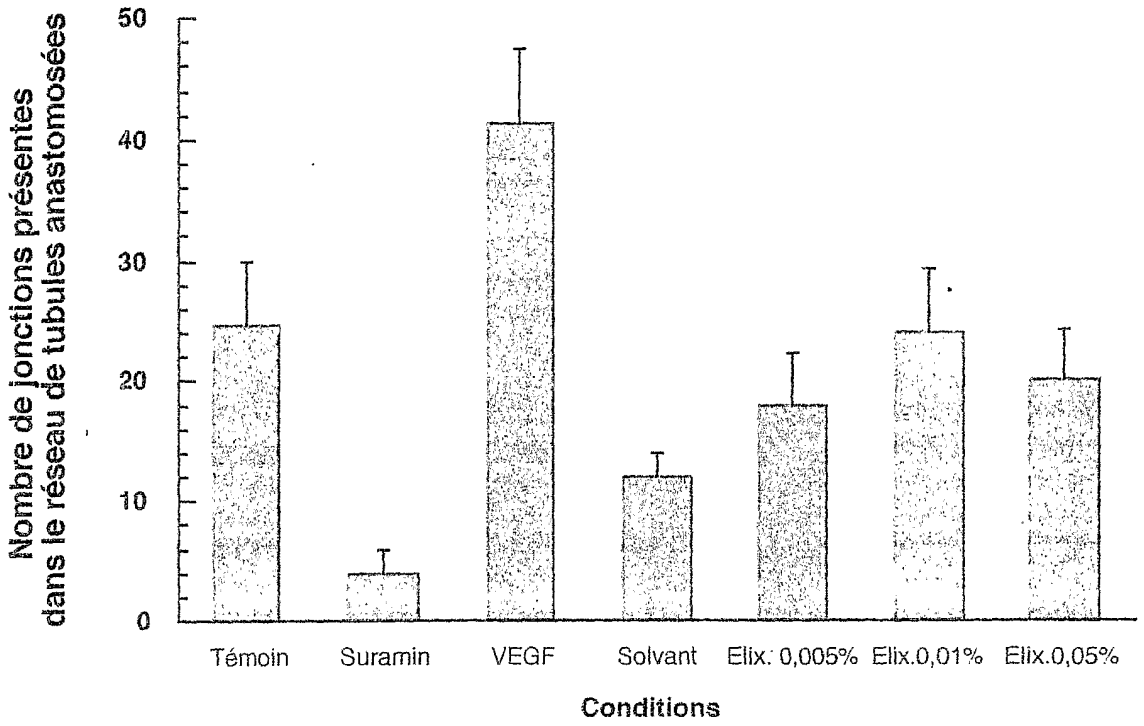


Figure 4



Conditions	Facteurs de modulation de la longueur des tubules (% du témoin ou solvant)
Suramine	- 49 %
VEGF	+ 54 %
Composition exemple III 0,005 %	+ 6 % (NS)
Composition exemple III 0,01 %	+ 11 % (NS)
Composition exemple III 0,05 %	+ 6 % (NS)

Figure 5



Conditions	Facteurs de modulation du nombre des jonctions par rapport au témoin/solvant
Suramine	- 5,7
VEGF	+ 1,7
Composition exemple III 0,005 %	+ 1,5
Composition exemple III 0,01 %	+ 2
Composition exemple III 0,05 %	+ 1,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No
PCT/FR 02/02954

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C11B9/00 A61K35/78 A61K7/48

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C11B A61K A61Q

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AMRITA: "helichrysum italicum" AMRITA, 'Online! 1999, XP002224497 Retrieved from the Internet: <URL:htpp:/www.amrita.net/aromatherapyinfo /helichrysum.html> 'retrieved on 2002-04-22! page 1, paragraph 7 --- -/--	1-10

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 December 2002	02/01/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Dauksch, H

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 132, no. 17, 24 April 2000 (2000-04-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 219523a, SATTA M. ET AL: "Analysis of the essential oil of Helichrysum italicum" page 399; XP002197960 cited in the application abstract & JOURNAL OF ESSENTIAL OIL RESEARCH, vol. 11, no. 6, 1999, pages 711-715, GB	1-10
Y	WO 98 05294 A (HYLDGAARD JOERGEN ;JENSEN ANETTE SEVERIN (DK); LARSEN JIMMI (DK);) 12 February 1998 (1998-02-12) abstract page 25, line 11	1-10
Y	WO 00 35577 A (HENKEL KGAA) 22 June 2000 (2000-06-22) cited in the application abstract	1,6
P,X	FR 2 819 718 A (CODIF INTERNAT SA) 26 July 2002 (2002-07-26) abstract page 3, paragraph 3	1-10
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200222 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2002-167345 XP002224498 & JP 2001 302532 A (KANEBO LTD), 31 October 2001 (2001-10-31) abstract	1-10
A	US 5 785 972 A (TYLER KATHLEEN A) 28 July 1998 (1998-07-28) cited in the application the whole document	1-10

-/--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 81, no. 9, 2 September 1974 (1974-09-02) Columbus, Ohio, US; abstract no. 45837s, CHIRKINA N.N. ET AL: "Antimicrobialproperties of essential oils from everlasting flowers..." page 75; XP002197962 cited in the application abstract & BIOL. NAUKI, vol. 17, no. 1, 1974, pages 86-89, ussr	1-10
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 5, 1991 Columbus, Ohio, US; abstract no. 41926t, MAFFEI FACINO R. ET AL: "Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from Helichrysum italicum G. Don" XP002197961 cited in the application abstract & PHARMACOLOGICAL RESEARCH, vol. 22, no. 6, 1990, pages 709-721, ACADEMIC PRESS ; LONDON	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte onal Application No
PCT/FR 02/02954

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9805294 A	12-02-1998	AU	3692097 A	25-02-1998
		BR	9711019 A	17-08-1999
		CN	1226816 A	25-08-1999
		WO	9805294 A1	12-02-1998
		EP	0915693 A1	19-05-1999
		US	6342208 B1	29-01-2002
WO 0035577 A	22-06-2000	DE	59902890 D1	31-10-2002
		WO	0035577 A1	22-06-2000
		EP	1144105 A1	17-10-2001
FR 2819718 A	26-07-2002	FR	2819718 A1	26-07-2002
		WO	02056856 A1	25-07-2002
JP 2001302532 A	31-10-2001	NONE		
US 5785972 A	28-07-1998	NONE		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der Internationale No
PCT/FR 02/02954

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C11B9/00 A61K35/78 A61K7/48

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C11B A61K A61Q

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

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	AMRITA: "helichrysum italicum" AMRITA, 'en ligne! 1999, XP002224497 Extrait de l'Internet: <URL:htpp:/www.amrita.net/aromatherapyinfo /helichrysum.html> 'extrait le 2002-04-22! page 1, alinéa 7 --- -/--	1-10

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

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

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

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

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

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
11 décembre 2002	02/01/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Dauksch, H

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec,le cas échéant, l'indicationdes passages pertinents	no. des revendications visées
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 132, no. 17, 24 avril 2000 (2000-04-24) Columbus, Ohio, US; abstract no. 219523a, SATTA M. ET AL: "Analysis of the essential oil of Helichrysum italicum" page 399; XP002197960 cité dans la demande abrégé & JOURNAL OF ESSENTIAL OIL RESEARCH, vol. 11, no. 6, 1999, pages 711-715, GB	1-10
Y	WO 98 05294 A (HYLDGAARD JOERGEN ;JENSEN ANETTE SEVERIN (DK); LARSEN JIMMI (DK);) 12 février 1998 (1998-02-12) abrégé page 25, ligne 11	1-10
Y	WO 00 35577 A (HENKEL KGAA) 22 juin 2000 (2000-06-22) cité dans la demande abrégé	1,6
P,X	FR 2 819 718 A (CODIF INTERNAT SA) 26 juillet 2002 (2002-07-26) abrégé page 3, alinéa 3	1-10
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200222 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2002-167345 XP002224498 & JP 2001 302532 A (KANEBO LTD), 31 octobre 2001 (2001-10-31) abrégé	1-10
A	US 5 785 972 A (TYLER KATHLEEN A) 28 juillet 1998 (1998-07-28) cité dans la demande le document en entier	1-10

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e internationale No
PCT/FR 02/02954

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec,le cas échéant, l'indicationdes passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 81, no. 9, 2 septembre 1974 (1974-09-02) Columbus, Ohio, US; abstract no. 45837s, CHIRKINA N.N. ET AL: "Antimicrobialproperties of essential oils from everlasting flowers..." page 75; XP002197962 cité dans la demande abrégé & BIOL. NAUKI, vol. 17, no. 1, 1974, pages 86-89, ussr ---	1-10
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 5, 1991 Columbus, Ohio, US; abstract no. 41926t, MAFFEI FACINO R. ET AL: "Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from Helichrysum italicum G. Don" XP002197961 cité dans la demande abrégé & PHARMACOLOGICAL RESEARCH, vol. 22, no. 6, 1990, pages 709-721, ACADEMIC PRESS ; LONDON -----	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der e internationale No
PCT/FR 02/02954

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9805294	A	12-02-1998	AU	3692097 A	25-02-1998
			BR	9711019 A	17-08-1999
			CN	1226816 A	25-08-1999
			WO	9805294 A1	12-02-1998
			EP	0915693 A1	19-05-1999
			US	6342208 B1	29-01-2002
WO 0035577	A	22-06-2000	DE	59902890 D1	31-10-2002
			WO	0035577 A1	22-06-2000
			EP	1144105 A1	17-10-2001
FR 2819718	A	26-07-2002	FR	2819718 A1	26-07-2002
			WO	02056856 A1	25-07-2002
JP 2001302532	A	31-10-2001	AUCUN		
US 5785972	A	28-07-1998	AUCUN		