

(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
11 janvier 2007 (11.01.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/003773 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A61P 17/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2006/001529

(22) Date de dépôt international : 29 juin 2006 (29.06.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0507047 1 juillet 2005 (01.07.2005) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : SOCI-
ETE D'EXTRACTION DES PRINCIPES ACTIFS SA
(VINCIENCE) [FR/FR]; 655 Route du Pin Montard, BP
212, F-06904 Sophia Antipolis (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DAL
FARRA, Claude [FR/FR]; 30 chemin de San Peyre,
F-06650 Opio (FR). DOMLOGE, Nouha [FR/FR]; 10
traverse du Barri, F-06560 Valbonne (FR). PEYRONEL,
Dominique [FR/FR]; 25 avenue des Lys, F-13014 Mar-
seille (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

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

(54) Title: USE OF A YEAST EXTRACT IN THE FORM OF AN ACTIVE AGENT FOR INDUCING A SYNTHESIS OF SIRT
PROTEINS IN SKIN CELLS

(54) Titre : UTILISATION D'UN EXTRAIT DE LEVURE EN TANT QU'AGENT ACTIF INDUCTEUR DE LA SYNTHÈSE
DES PROTÉINES SIRT DANS LES CELLULES DE LA PEAU

(57) Abstract: The invention relates to the use of a yeast extract in the form of an active agent for inducing an endogenic synthesis
of SIRT proteins in skin cells in a cosmetic or pharmaceutical composition or for the production thereof.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet l'utilisation d'un extrait de levures en tant qu'agent actif inducteur de la synthèse
endogène des protéines SIRT dans les cellules de la peau, dans ou pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceu-
tique.



WO 2007/003773 A2

UTILISATION D'UN EXTRAIT DE LEVURE EN TANT QU'AGENT ACTIF INDUCTEUR DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES SIRT DANS LES CELLULES DE LA PEAU

5 L'invention concerne le domaine de la cosmétique et de la pharmaceutique, notamment le domaine de la dermatologie. La présente invention a pour objet l'utilisation d'un extrait de levures en tant qu'agent actif inducteur de la synthèse endogène des protéines SIRT dans les cellules de la peau, dans ou pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique.

10

Les protéines SIRT font partie de la famille des Sirtuines, ce sont des protéines nucléaires, NAD⁺ dépendantes, jouant un rôle important dans la désacétylation des histones. Les gènes SIR (Silent Information Regulators), codant pour les protéines SIR, ont, pour la première fois, été décrits chez *S. cerevisiae* en 1979 (*Rine J et Al., Genetics* 15 *1979*). Plus tard, il a été démontré qu'une surexpression de la protéine SIR2P, chez *C. elegans*, permettait d'augmenter la durée de vie de cet organisme (*Tissenbaum et Al., Nature* 2001), suggérant que ces protéines seraient liées à la longévité.

La protéine SIRT1 est la sirtuine humaine la mieux caractérisée, interagissant avec de nombreux régulateurs de la transcription. La protéine humaine SIRT1 a été décrite 20 comme étant impliquée dans la régulation de p53 (*Cheng HL et Al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003*) ; et, plus récemment, comme un modulateur de la sénescence cellulaire (*Langley E et Al., EMBO J. 2002*). D'autres protéines humaines SIRT ont été découvertes (SIRT2, SIRT3, SIRT4-7). La protéine humaine SIRT2 a été peu étudiée, quelques études ont cependant démontré son rôle dans le contrôle de l'activité mitotique (*Dryden SC et Al.,* 25 *Mol Cell Biol. 2003*) ainsi que son implication dans la régulation de la protéine p53 (*Vaziri H et Al., Cell. 2001*). A ce jour, les histones désacétylases sont considérées comme une famille d'enzymes occupant un rôle important dans la régulation du cycle et de la mort cellulaire (*Porcu M. and Chiarugi A., Trends Pharmacol Sci., 2005*).

Plusieurs études chez des organismes aussi divers que *C. Elegans* ou les mammifères 30 ont montré qu'il existait une relation entre l'apport énergétique et la durée de vie et que la protéine SIRT était responsable de ce couplage. Ainsi une réduction de l'apport calorique augmente la durée de vie de la levure (*Tissenbaum et Al, Nature, 2001*). Par ailleurs, des études récentes ont montré que SIRT1 provoque la mobilisation des graisses dans les

adipocytes (*Picard F. et al, Nature, 2004*). Les protéines SIRT sont considérées à ce jour comme des cibles thérapeutiques potentielles pour traiter des dysfonctionnements ou des maladies liées, entre autres, à l'obésité, au diabète ou encore à l'hyperlipidémie (WO 03/061681, US 2005/0164969).

5

Il a récemment été démontré que les protéines SIRT sont exprimées de manière significative dans la peau et qu'elles y jouent un rôle très important. En effet la protéine SIRT, et plus précisément la protéine SIRT1, est présente dans les cellules de la peau et que son expression est modifiée par les différents stress qui affectent les cellules cutanées.

10 Il a notamment été mis en évidence que l'induction de l'expression de cette protéine par différents agents, permettait de protéger les cellules et de mieux les aider à lutter contre le stress et le vieillissement intrinsèque.

La protéine SIRT1 occupe une fonction très importante dans le vieillissement et la protection cellulaire. Ainsi, une augmentation de son expression permet à la peau de
15 mieux résister aux agressions extérieures. Plus généralement, l'induction de l'expression de cette protéine dans les cellules de la peau rend les mécanismes de protection cellulaire plus efficaces et permettrait d'augmenter la durée de vie cellulaire.

La présence de cette protéine au niveau de la peau, ainsi que les bénéfices de sa
20 surexpression, offre la perspective de nouveaux modes d'action et de nouveaux moyens d'améliorer la survie cellulaire, notamment la survie cellulaire des cellules cutanées ; mais aussi, plus généralement des moyens d'améliorer les propriétés de la peau. Par améliorer les propriétés de la peau, on entend tous les moyens destinés à conserver ou à rétablir un bon fonctionnement de la peau ou encore tout moyen qui sert à préserver ou à améliorer
25 son apparence et/ou son aspect.

Ainsi une augmentation de la synthèse des protéines SIRT permettra à la peau de prévenir les manifestations cutanées du vieillissement, d'être mieux protégée contre les agressions extérieures et contre les stress auxquels elle est soumise. Par ailleurs, et selon une vision plus globale de l'invention, une induction de SIRT permettra d'avoir des effets
30 anti-inflammatoires et anti-irritants tout comme une action positive sur la régénération tissulaire et sur la cicatrisation par une action, par exemple, sur l'augmentation de la synthèse de protéines constitutives de la matrice extra-cellulaire.

La présente invention se rapporte ainsi à l'utilisation d'une quantité efficace d'au moins un extrait de levures, en tant qu'agent actif inducteur de la synthèse endogène des protéines SIRT dans les cellules de la peau. Cet actif pourra être utilisé seul ou en association avec au moins un autre agent actif, dans ou pour la préparation d'une composition cosmétique et/ou dermo-pharmaceutique et/ou dermatologique.

En effet, par leur activité inductrice de la synthèse des protéines SIRT, ces extraits de levures présentent des activités biologiques spécifiques qui les rendent directement utilisables dans des préparations ou compositions cosmétiques, dermatologiques ou pharmaceutiques.

10

L'utilisation d'un extrait de levures, dans le domaine de la cosmétique, a déjà été décrit dans de nombreux brevets, notamment au niveau des soins de la peau, comme par exemple dans le brevet FR 2 826 576. Toutefois, son utilisation en tant qu'agent activateur de la synthèse des protéines SIRT n'a pas encore été exposée.

A ce jour, très peu d'utilisations de composés inducteurs de synthèse de protéines de la famille des SIRT, dans les cellules de la peau, ont été décrites. Parmi ces composés susceptibles d'activer la synthèse des protéines SIRT de la peau, on peut citer différentes molécules dont, par exemple, les polyphénols. Plus particulièrement, on peut citer : des dérivés de trans-stilbène (resveratrol, piceatannol), des dérivés des chalcones (isoliquiritigenine, butéine), des dérivés de flavones (fisteine, luteoline, quercetine).

Ainsi, le principal objet de la présente invention concerne l'utilisation d'un nouveau composé capable d'induire la synthèse des protéines SIRT. L'invention concerne l'utilisation d'une quantité efficace d'au moins un extrait de levures, en tant qu'agent actif inducteur de la synthèse endogène des protéines SIRT dans les cellules de la peau, dans ou pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique. Préférentiellement selon l'invention, les composés activeront une classe de protéines SIRT particulière, les protéines SIRT1.

Par agent actif inducteur ou activateur de la synthèse des protéines SIRT, on entend un agent actif apte à induire la synthèse des protéines SIRT dans les cellules de la peau. C'est à dire apte à augmenter la quantité de ces protéines dans les cellules, mais plus particulièrement, on entend essentiellement désigner tous les agents actifs susceptibles de favoriser la production endogène des protéines SIRT ; et tout particulièrement les molécules impliquées dans le contrôle positif des précurseurs tels que l'ADN ou l'ARN.

Le terme "extrait" désigne toute substance isolée, obtenue à partir de la matière première que constituent les levures. L'agent actif peut se définir comme étant une molécule ou un ensemble de molécules susceptibles d'apporter des modifications ou des
5 modulations au fonctionnement d'un système biologique.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'extrait de levures est un extrait de levures du genre *Kluyveromyces* ; d'une manière préférentielle l'extrait selon l'invention est préparé à partir de levures de l'espèce *Kluyveromyces lactis* et/ou *Kluyveromyces marxianus*.

10 L'extrait de levures du genre *Kluyveromyces* doit s'entendre comme un extrait de levures appartenant au genre *Kluyveromyces*. Bien entendu l'extrait peut être préparé à partir de levures d'au moins l'une quelconque des nombreuses variétés et espèces appartenant au genre *Kluyveromyces*.

15 Selon une méthode de réalisation de l'invention actuellement préférée, l'extrait de levures est un extrait aqueux. Par extrait aqueux, on entend tout ensemble de composés soluble dans l'eau ou dans tout solvant constitué totalement ou partiellement d'eau. Les extraits selon l'invention sont notamment des extraits aqueux purifiés. On peut en particulier citer des solvants aqueux. Par solvant aqueux on entend tout solvant constitué
20 totalement ou partiellement d'eau. On peut citer l'eau elle-même, les solvants hydroalcooliques en toutes proportions ou encore les solvants constitués d'eau et d'un composé comme le propylène glycol, le butylène glycol ou le glycérol en toutes proportions. Cet extrait peut être obtenu par dissolution dans l'eau, l'alcool ou l'éther, puis par concentration de cette solution en faisant intervenir l'évaporation ou la distillation.

25 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'extrait de levures est un extrait composé en grande partie de composés de nature peptidique.

Par composés de nature peptidique, on entend désigner tous composés de nature protéique, tels que les fragments de protéines, les peptides mais aussi les acides aminés libres. Les peptides, acides aminés et fragments de protéines sont dosés selon les
30 techniques classiques, bien connues de l'homme du métier.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'extrait de levures contient des composés de nature peptidique de faible poids moléculaire.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, l'extrait de levures contient une quantité de composés de nature peptidique représentant entre 30 et 70 % du poids total de l'extrait sec, plus particulièrement cette quantité est comprise entre 40 et 50 % du poids total de l'extrait sec.

5

Toute méthode d'extraction ou de purification connue de l'homme du métier peut être utilisée pour préparer l'extrait selon l'invention.

Ainsi, dans une première étape, les levures sont mises en culture de manière classique dans un milieu adapté à leur développement, de préférence en présence de lactose. Elles
10 sont récoltées par centrifugation puis mises en suspension dans une solution tampon, préférentiellement un tampon phosphate. Dans une seconde étape, ces cellules sont lysées mécaniquement à l'aide d'une presse de french ou à l'aide d'un broyeur à bille, la majorité des composants membranaires insolubles étant éliminés par centrifugation ou par filtration.

15 Un filtrat riche en protéines peut être alors recueilli et remis en solution. Une fraction, riche en composés de nature peptidique, peut alors être isolée par précipitation en milieu alcoolique ou par une solution saline. Les composants solubles et les acides nucléiques sont ainsi éliminés. Selon une variante du procédé d'obtention de l'extrait selon l'invention, une étape de dialyse ainsi qu'une étape d'hydrolyse par un cocktail de
20 protéases peuvent être ajoutées afin d'obtenir une fraction riche en composés de nature peptidique.

Une étape supplémentaire de purification par un procédé de type chromatographique peut être envisagée.

Selon un autre mode de réalisation de l'extrait de levure selon l'invention, l'étape
25 d'hydrolyse peut être réalisée directement sur les levures récoltées après centrifugation ou sur les fractions obtenues après lyse cellulaire. Des étapes de filtrations et de stérilisation sont par la suite réalisées.

L'utilisation de l'extrait selon l'invention, apte à activer la synthèse des protéines
30 SIRT1 dans les cellules de la peau, se fera préférentiellement sous la forme d'une composition adaptée à l'administration par voie topique externe, principalement sur la peau, les muqueuses et/ou les phanères, comprenant un milieu cosmétiquement ou dermatologiquement acceptable.

La quantité efficace de principe actif correspond à la quantité nécessaire pour obtenir le résultat désiré. Ainsi, selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le principe actif précité est utilisé, dans les compositions, à une concentration comprise entre 0,00001 % et 20 % environ, et préférentiellement à une concentration comprise entre
5 0,001 % et 10 % environ en poids par rapport au poids total de la composition finale.

Lesdits extraits selon l'invention sont aussi avantageusement utilisés afin de lutter de manière curative et/ou préventive contre les manifestations du vieillissement cutané, mais aussi afin d'améliorer l'aspect de la peau et/ou des phanères. Par les soins de la peau et/ou
10 des phanères, on entend toutes les actions destinées à conserver ou à rétablir un bon fonctionnement de la peau et/ou des phanères ou encore tout moyen qui sert à préserver ou à améliorer leur apparence et/ou leur aspect. Ainsi le soin inclut l'hydratation, l'apaisement, la protection contre tous types d'agressions, notamment la protection solaire, la lutte et la prévention des manifestations du vieillissement. Par manifestations cutanées
15 du vieillissement on entend toutes modifications de l'aspect extérieur de la peau dues au vieillissement comme, par exemple, les rides et ridules, la peau flétrie, la peau molle, la peau amincie, le manque d'élasticité et/ou de tonus de la peau, la peau terne et sans éclat mais également toutes modifications internes de la peau qui ne se traduisent pas systématiquement par un aspect extérieur modifié comme, par exemple, toutes
20 dégradations internes de la peau consécutives à une exposition aux rayonnements ultra-violets. Par l'expression "améliorer l'aspect de la peau", on entend tous les phénomènes qui sont susceptibles d'avoir pour conséquence une amélioration visuelle de l'état de la peau. La peau présentera une meilleure apparence ; elle sera, par exemple, beaucoup plus belle, ferme et/ou lisse. Toutes les petites imperfections seront diminuées ou supprimées.
25 L'aspect papyracé de la peau sera, par exemple, atténué.

De plus, l'extrait selon l'invention, ou la composition le contenant, peut être destiné à protéger les substrats kératiniques, et plus particulièrement à protéger la peau et/ou les phanères contre tous les types d'agressions extérieures. L'utilisation de ces extraits, ou d'une composition les contenant, va permettre aux substrats kératiniques d'être protégés et
30 de mieux résister au stress que produit sur eux l'environnement. On entend par le terme "agression extérieure" les agressions que peut produire l'environnement. Ces agressions peuvent être d'origine chimique, physique, biologique ou thermique.

Selon un autre aspect, les extraits selon l'invention seront avantageusement utilisés afin de diminuer et/ou de prévenir les réactions inflammatoires et/ou irritantes cutanées. En effet, les extraits selon l'invention, destinés à activer la synthèse endogène des protéines SIRT, et plus particulièrement des protéines SIRT1, ont des effets anti-inflammatoires et anti-irritants. L'utilisation des propriétés de ces actifs permet donc
5 d'avoir une peau plus protégée et nettement moins sensible aux diverses agressions qu'elle peut rencontrer. La peau est ainsi apaisée.

Par ailleurs, les extraits selon l'invention tels que définis précédemment, stimulent le fonctionnement métabolique des cellules de la peau. Ils permettent ainsi d'augmenter la
10 synthèse de protéines essentielles à son fonctionnement, notamment en augmentant la synthèse de protéines constitutives de la matrice extra-cellulaire. Les extraits selon l'invention, ou la composition les contenant, possèdent ainsi une action positive sur la régénération tissulaire. Les extraits selon l'invention sont tout particulièrement efficaces afin de traiter les troubles de la cicatrisation.

15

Ces extraits, aptes à activer la synthèse endogène des protéines SIRT, pourront être utilisés, d'une manière plus générale afin de traiter des affections dermatologiques.

Par affections dermatologiques, on entend toutes les maladies affectant la peau et ayant ou non des conséquences visibles. A ce titre, on peut citer par exemple : des
20 désordres liés à des problèmes de différenciations et de proliférations cellulaires, des problèmes liés à la kératinisation, des troubles inflammatoires ou allergiques, des troubles liés aux fonctions sébacées, des proliférations dermiques ou épidermiques (bénignes ou malignes) ; des désordres cutanés dus à une exposition aux rayonnements U.V., des pathologies associées au vieillissement chronologique ou actinique.

25 Ainsi selon un autre aspect, les composés selon l'invention, tels que décrit précédemment, destinée à activer la synthèse endogène des protéines SIRT dans les cellules de la peau, pourront être utilisés pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des affections dermiques.

30 Selon un autre aspect, la présente invention a pour objet l'utilisation d'extraits selon l'invention, destinés à activer la synthèse endogène des protéines SIRT dans les cellules de la peau, seuls ou en association avec au moins un autre agent actif, pour produire un effet

amincissement localisé après application sur la peau, et plus particulièrement pour réduire, éliminer ou prévenir les surcharges graisseuses sous-cutanées.

Le tissu adipeux hypodermique constitue le plus grand réservoir énergétique de l'organisme. Si un déséquilibre s'installe dans l'organisme entre les processus de lipogénèse et de lipolyse, le volume et le nombre des adipocytes peut augmenter ; on parle d'hypertrophie et d'hyperplasie adipocytaire, qui peut s'accompagner d'une hyperviscosité de la substance fondamentale et d'un ralentissement de la circulation veineuse et lymphatique. On parle alors de cellulite, qui se manifeste par une surcharge de tissus adipeux, en particulier chez la femme, au niveau des hanches, des cuisses, des fesses, des genoux et des avants-bras. La peau prend un aspect matelassé et capitonné et au stade le plus avancé l'aspect de « peau d'orange », qui se caractérise par une succession de dépressions provoquées par un étirement excessif des travées conjonctives et l'attraction de l'épiderme vers les tissus profonds.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'agent actif précité est préalablement solubilisé dans un ou plusieurs solvants cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables comme l'eau, l'éthanol, le propanol ou l'isopropanol, le propylène glycol, le butylène glycol, le dipropylène glycol, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, le glycérol ou tout mélange de ces solvants.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, l'agent actif précité est préalablement solubilisé dans un vecteur cosmétique ou pharmaceutique comme les liposomes ou adsorbés sur des polymères organiques poudreux, des supports minéraux comme les talcs et bentonites, et plus généralement solubilisés dans ou fixés sur, tout vecteur cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.

Quelle que soit la forme de l'invention, la composition selon l'invention peut être ingérée, injectée ou appliquée sur la peau (sur toute zone cutanée du corps), les cheveux, les ongles ou les muqueuses. Selon le mode d'administration, la composition selon l'invention peut se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées. Préférentiellement, les compositions selon la présente invention se présenteront sous une forme galénique adaptée à l'administration par voie topique cutanée. Elles couvrent toutes les formes cosmétiques ou dermatologiques. Ces compositions doivent donc contenir un milieu cosmétiquement acceptable, c'est-à-dire compatible avec la peau, les poils ou les cheveux.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de traitement cosmétique pour les soins de la peau destiné à augmenter la synthèse endogène des protéines SIRT dans les cellules de la peau, caractérisé par le fait que l'on applique sur la
5 peau une composition contenant l'agent actif tel que défini précédemment, afin d'obtenir l'action désirée.

Des modes de réalisation particuliers de ce procédé de traitement cosmétique résultent également de la description précédente.

Le procédé de traitement cosmétique de l'invention peut être mis en œuvre notamment
10 en appliquant les compositions cosmétiques telles que définies ci-dessus, selon la technique d'utilisation habituelle de ces compositions, par exemple : application de crèmes, de gels, de sérums, de lotions, de laits, de shampooings ou de compositions anti-solaires, sur la peau ou sur les cheveux, ou encore application de dentifrice sur les gencives.

15

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples donnés à titre illustratif et non limitatif.

Exemple 1 : Mise en évidence de l'effet de l'extrait selon l'invention sur les
20 **fibroblastes.**

Le but de l'étude est de déterminer l'influence de l'extrait de levure sur la synthèse des protéines SIRT1 par les fibroblastes, par la technique d'immunofluorescence et par la technique de western-blot. Les techniques d'immunofluorescence et de western-blot sont
25 des techniques semi-quantitatives qui permettent d'apprécier le taux des protéines présentes dans les cellules.

Des fibroblastes humains sont maintenus en culture à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂. Pour les études d'immunofluorescence, les fibroblastes ont été cultivés sur des lames 8 puits ; pour le western-blot, les cellules ont été cultivées
30 dans boîtes de 100 mm de diamètre. Les cellules sont ensuite incubées durant 24 ou 48 heures avec l'extrait selon l'invention mis en solution à 0,5 %; une condition contrôle ne contenant pas d'extrait est réalisée.

▪ Etudes par immunofluorescence

Après élimination des surnageants et rinçage des cultures, les cellules sont fixées avec du méthanol pendant 4 minutes à 4°C puis rincées avec du tampon PBS. Des anticorps de lapin anti-SIRT1 humaine, dilués à 1/100, sont alors ajoutés (Santa Cruz Biotechnology).
5 L'incubation dure 3 heures à température ambiante ; les surnageants sont ensuite éliminés et les cellules sont rincées au PBS. Puis un anticorps secondaire (anti-lapin, Molecular Probes), couplé à un marqueur fluorescent (Alexa 488) est additionné. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, les surnageants sont éliminés et les cellules sont rincées au PBS. Les lames sont alors montées puis examinées au microscope à Epi-
10 fluorescence (Nikon Eclipse E600 microscope).

La quantité de protéines SIRT1, synthétisées par les cellules, est proportionnelle à l'intensité de la fluorescence. Les résultats ainsi obtenus démontrent une augmentation significative de l'expression des protéines SIRT1 au niveau du noyau de la cellule après application de l'extrait selon l'invention durant 24 et 48 heures.

15 ▪ Etudes par Western-blot

Les cellules sont lavées et récoltées dans un tampon d'extraction (20mM Tris, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 0,2 % Triton X100) enrichi d'un cocktail d'inhibiteur de protéases (*Sigma*). Les protéines ainsi extraites sont centrifugées à 4°C à 10000 rpm durant 10 minutes et les échantillons ainsi obtenus sont stockés à -80°C.

20 Après standardisation des échantillons selon leur charge en protéines (kit de dosage de protéines BCA, Pierce), les lysats cellulaires sont séparés par électrophorèse sur un gel NuPAGE 4-12% (Invitrogen) et transférés sur une membrane de nitrocellulose (PAL corporation). Les membranes sont incubées toute une nuit avec un anticorps de lapin anti-SIRT1 humaine (Santa Cruz Biotechnology), dilué à 1/200, suivi par une incubation avec
25 un anticorps anti-lapin IgG-peroxydase, dilué à 1/5000, (Beckman Coulter). La révélation est effectuée avec un substrat chimioluminescent.

Afin de doser les protéines SIRT1 présentes dans les cellules, les signaux luminescents émis par les bandes isolées présentes dans le gel sont quantifiés en utilisant un logiciel ChimiImager (Alpha Innotech Corporation, USA).

30 La quantité des protéines est exprimée en pourcentage d'intensité lumineuse, comparée à la condition contrôle, c'est-à-dire comparée aux cellules qui n'ont pas reçu l'extrait selon l'invention.

intensité %	Incubation durant 24 heures	Incubation durant 48 heures
Contrôle	100	100
Extrait à 0,5 %	117.5	276

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que lorsque les cellules sont incubées en présence de l'extrait selon l'invention, on observe une augmentation importante de l'intensité lumineuse, après 24 et 48 heures de traitement par rapport aux
5 cellules non traitées. Les résultats permettent de conclure que l'ajout de l'extrait selon l'invention dans le milieu de culture des fibroblastes a pour effet d'augmenter la synthèse des protéines SIRT1 par les cellules.

Exemple 2 : Mise en évidence *ex vivo* de l'effet selon l'extrait selon l'invention.

10

Des études *ex vivo* par immunomarquage ont permis de mettre en évidence l'expression des protéines SIRT1 sur des échantillons de peau.

Des échantillons de peau humaine sont mis en culture à l'interface air/liquide. L'extrait selon l'invention est appliqué topiquement sur ces échantillons, au niveau de l'épithélium,
15 puis les échantillons sont incubés durant 24 heures.

Ces échantillons de peau sont ensuite fixés avec du formaldéhyde puis inclus dans la paraffine. Des coupes de 2 à 3 µm d'épaisseur sont alors réalisées. L'immunomarquage est effectué après plusieurs étapes de déparaffinage et démasquage des sites antigéniques. L'immunomarquage proprement dit est réalisé avec un anticorps polyclonal de lapin anti-
20 SIRT1 humaine (IBL Co), dilué au 1/50, puis avec un anticorps secondaire (anti-lapin, Molecular Probes), couplé à un marqueur fluorescent. Les coupes de peau sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Nikon Eclipse E600 microscope).

Les résultats obtenus démontrent que les peaux traitées avec l'extrait selon l'invention expriment une quantité de protéines SIRT1 nettement supérieure aux peaux non traitées
25 avec l'extrait. Ainsi, l'extrait selon l'invention permet, au niveau cutané, d'augmenter l'expression des protéines SIRT1.

Exemple 3 : Préparation de compositions cosmétiques.

Les quantités indiquées sont données en pourcentage de poids.

30

1 - Crème de soin anti-rides :

Noms commerciaux	Noms INCI	% massique
<i>PHASE A</i>		
Montanov 68	Cetearyl Alcohol (and) Cetearyl Glucoside	6,00
Squalane	Squalane	3,00
Cetiol SB 45	Butyrospermum Parkii (Shea Butter)	2,00
Waglinol 250	Cetearyl Ethylhexanoate	3,00
Amerchol L- 101	Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol	2,00
Abil 350	Dimethicone	1,50
BHT	BHT	0,01
<i>PHASE B</i>		
Eau déminéralisée	Aqua (Water)	QSP 100
Butylene Glycol	Butylene Glycol	2,00
Glucam E10	Methyl Gluceth-10	1,00
Allantoin	Allantoin	0,15
Carbopol Ultrez 10	Carbomer	0,20
<i>PHASE C</i>		
Huile d'Avocat	Persea Gratissima (Avocado) Oil	1,25
Phenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	0,75
<i>PHASE D</i>		
TEA	Triethanolamine	0,18
<i>PHASE E</i>		
Extrait selon l'invention		3,00
Parfum	Parfum (Fragrance)	QSP 100
Colorant		QSP 100

Les constituants de la phase A et de la phase B sont chauffés séparément à une température comprise entre 65°C et 70°C, la phase C est incorporée, puis la phase A est émulsionnée dans la phase B. Le Carbomer est neutralisé avec la phase D à une température aux alentours de 45°C. La phase E est ensuite additionnée sous agitation et le refroidissement est poursuivi jusqu'à 25°C.

2 -Crème- Crème apaisante :

<i>Noms commerciaux</i>	<i>Noms INCI</i>	<i>% massique</i>
PHASE A		
Eau déminéralisée	Aqua (Water)	qsp 100
Glycerine	Glycerin	5.00
Hydrolyte 5	Pentylene Glycol	2.00
Carbopol Ultrez 21	Acrylates/C10/30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0.20
PHASE B		
Abil EM 97	Dimethicone Copolyol (and) Cyclopentanesiloxane	10.00
Cetiol SB45	Butyrospermum Parkii (Shea Butter)	3.00
Lanette 16	Cetyl Alcohol	2.00
Simulsol 165	PEG-100 Stearate (and) Glyceryl Stearate	3.00
Squalane	Squalane	6.50
DC 345 Fluid	Cyclomethicone	1.30
DUB ININ	Isononyl Isononanoate	8.00
PHASE C		
Sepicide HB	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	0.30
PHASE D		
AMP-95	Aminomethylpropanol	0.15

<i>Noms commerciaux</i>	<i>Noms INCI</i>	<i>% massique</i>
PHASE E		
Extrait selon l'invention		1.50

- Les ingrédients de la phase A et de la phase B sont pesés et chauffés séparément à 60°C. Lorsque la phase B atteint 60°C, y introduire la phase C. Emulsionner ensuite la phase B dans la phase A. Le Carbopol est neutralisé avec la phase D à une température aux alentours de 45°C. Le refroidissement est poursuivi jusqu'en dessous de 40°C. La phase E est alors additionnée sous agitation.

3 - Gel Raffermissant – Amincissant – anti-cellulite :

<i>Noms commerciaux</i>	<i>Noms INCI</i>	<i>% massique</i>
Carbopol Ultrez 10 (2%)	Carbomer	25.00
Eau déminéralisée	Aqua (Water)	QSP 100
DUB DIOL	Methyl Propanediol	3.00
EDTA	Tetrasodium EDTA	0.10
Glydant Plus Liquid	DMDM Hydantoïn (and) Iodopropynyl butylcarbamate	0.20
Extrait selon l'invention		0.5
TEA	Triethanolamine	0.50
Parfum	Parfum (Fragrance)	QSP 100
Colorant hydrosoluble		QSP 100

- 10 Le gel de Carbopol est préparé à 2 %. Les ingrédients sont ajoutés dans l'ordre énuméré ci-dessus, sous agitation. Le mélange est ensuite neutralisé avec la TEA. Le parfum et les colorants sont ajoutés si nécessaire.

REVENDICATIONS

1. Extrait de levures de l'espèce *Kluyveromyces lactis* ou *Kluyveromyces marxianus* dans ou pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée à une administration topique externe, ledit extrait formant agent actif inducteur de la synthèse endogène des protéines SIRT dans les cellules de la peau, caractérisé en ce qu'il contient une quantité de composés de nature peptidique représentant entre 30 et 70% du poids total de l'extrait sec, et en ce qu'il est préparé selon un procédé comprenant des étapes de mise en culture, de récolte et de lyse des levures ; d'hydrolyse enzymatique ; et selon lequel on recueille une fraction riche en composés peptidiques, des acides nucléiques et des composants membranaires étant éliminés.
2. Extrait selon la revendication 1, caractérisé en ce que les levures sont récoltées par centrifugation puis mises en suspension dans une solution tampon.
3. Extrait selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'une majorité des composants membranaires insolubles sont éliminés par centrifugation ou par filtration.
4. Extrait selon l'une des revendications 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que les acides nucléiques sont éliminés par précipitation en milieu alcoolique ou par une solution saline.
5. Extrait selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les protéines SIRT sont les protéines SIRT1.
6. Composition cosmétique ou pharmaceutique pour administration topique externe, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité efficace entre 0,001% et 10% en poids d'un extrait selon l'une des revendications 1 à 5.
7. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un autre agent actif.

8. Utilisation d'une quantité efficace d'un extrait selon l'une des revendications 1 à 5, dans ou pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique selon l'une des revendications 6 ou 7.
- 5 9. Utilisation d'une quantité efficace d'un extrait selon l'une des revendications 1 à 5, dans ou pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique selon l'une des revendications 6 ou 7, la composition étant destinée à lutter de manière curative et/ou préventive contre les manifestations du vieillissement cutané.
- 10 10. Utilisation d'une quantité efficace d'un extrait selon l'une des revendications 1 à 5, dans ou pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique selon l'une des revendications 6 ou 7, la composition étant destinée à protéger la peau et/ou les phanères contre tous les types d'agressions extérieures.
- 15 11. Utilisation d'une quantité efficace d'un extrait selon l'une des revendications 1 à 5, dans ou pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique selon l'une des revendications 6 ou 7 pour produire un effet amincissement localisé après application sur la peau, et plus particulièrement pour réduire, éliminer ou prévenir les surcharges graisseuses sous-cutanées.
- 20 12. Procédé de traitement cosmétique de la peau destiné à augmenter la synthèse endogène de protéines SIRT dans les cellules de la peau, caractérisé par le fait que l'on applique sur la peau une composition contenant comme principe actif, au moins un extrait de levure tel que défini selon l'une des revendications 1 à 5.
- 25 13. Procédé de soin cosmétique destiné à réduire, éliminer et/ou prévenir les surcharges graisseuses sous-cutanées ; et/ou destiné à lutter contre la cellulite ; et/ou à lutter contre le phénomène de peau d'orange, caractérisé en ce que l'on applique sur la peau une composition contenant, comme principe actif, au moins un extrait de levure tel que
- 30 défini selon l'une des revendications 1 à 5.