

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

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

3 036 286

21 N° d'enregistrement national : 15 54428

51 Int Cl⁸ : A 61 K 36/185 (2016.01), A 61 K 8/97, A 61 P 17/00,
A 61 Q 19/00

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 18.05.15.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 25.11.16 Bulletin 16/47.

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 :

Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : LABORATOIRES DE BIOLOGIE
VEGETALE YVES ROCHER Société anonyme — FR.

72 Inventeur(s) : LAPERDRIX CELINE et LUBRANO
CHRISTIAN.

73 Titulaire(s) : LABORATOIRES DE BIOLOGIE VEGE-
TALE YVES ROCHER Société anonyme.

74 Mandataire(s) : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES.

54 PROCEDE D'OBTENTION D'UN EXTRAIT D'UN MATERIAU VEGETAL ET EXTRAIT OBTENU A CAPACITE
D'ASSIMILATION OPTIMISEE.

57 La présente invention se rapporte à un procédé d'ob-
tention d'un extrait d'un matériau végétal présentant une ca-
pacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par
la peau optimisées, dans lequel:

(a) le matériau végétal est soumis, soit (i) à l'état frais,
ou à l'état séché, ou à l'état congelé, soit (ii) à l'état lyophilisé,
respectivement à une extraction par pression sans solvant pour les cas (i) ou à une extraction au moyen d'un
solvant choisi parmi la glycérine, l'éthanol et l'eau pour le cas (ii),

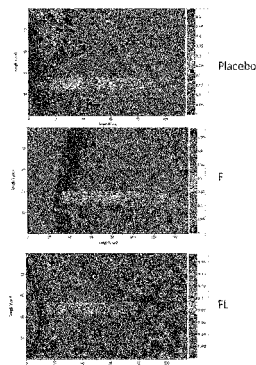
(b) la biomasse végétale ainsi extraite est séparée de la
phase liquide par filtration et/ou centrifugation,

(c) le produit obtenu à l'étape (b) est maintenu à l'abri de
la lumière et/ou de l'oxygène,

(d) l'extrait est obtenu à l'issue de l'étape (c) et présente
une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimila-
tion par la peau optimisée(s).

Elle se rapporte également à un extrait d'un matériau vé-
gétal présentant une capacité de pénétration dans la peau
et/ou d'assimilation par la peau optimisées, susceptible
d'être obtenu par la mise en oeuvre d'un procédé de l'inven-
tion, ainsi qu'à une composition cosmétique ou dermatolo-
gique comprenant l'extrait d'un matériau végétal, à

l'utilisation cosmétique de la composition ou de l'extrait, au
procédé de traitement cosmétique non thérapeutique com-
prenant l'application sur la peau ou les muqueuses de la
composition cosmétique ou dermatologique ou de l'extrait et
à une trousse pour le traitement cosmétique non thérapeu-
tique de la peau ou des muqueuses comprenant une com-
position cosmétique ou dermatologique ou l'extrait.



FR 3 036 286 - A1



PROCEDE D'OBTENTION D'UN EXTRAIT D'UN MATERIAU VEGETAL ET EXTRAIT OBTENU A CAPACITE D'ASSIMILATION OPTIMISEE

DESCRIPTION

5

Domaine technique

La présente invention se rapporte à un procédé d'obtention d'un extrait d'un matériau végétal présentant une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées, ainsi qu'à l'extrait obtenu et son utilisation dans une composition cosmétique ou dermatologique.

10

La présente invention trouve son application dans le domaine de la cosmétique notamment.

15

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

Etat de la technique

De nombreux extraits naturels de plantes sont employés depuis des millénaires en cosmétique et thérapeutique en raison de leurs vertus cosmétiques et thérapeutiques. Grâce aux techniques analytiques modernes, les molécules actives naturelles contenues dans ces extraits ont été identifiées, et de nombreux analogues chimiques de ces molécules actives naturelles ont été synthétisés et sont actuellement employés à la place des molécules naturelles dans les produits cosmétiques et pharmaceutiques. Cependant des différences structurales et fonctionnelles existent.

25

D'un point de vue chimique, les molécules sont les mêmes, mais d'un point de vue stéréochimique, les plantes synthétisent préférentiellement des molécules portant des centre de chiralité L, alors que la synthèse chimique

30

s'oriente plus vers des formes D ou des mélanges racémiques. En parallèle et depuis les récents progrès en cristallographie, l'importance de représentations tridimensionnelles des molécules dans leurs mécanismes d'action et/ou leur reconnaissance avec leurs récepteurs cellulaires associés est reconnue.

Par ailleurs, dans le domaine alimentaire, il est maintenant admis que la stabilité, le rendement et les effets à court terme et à long terme des nutriments et/ou des vitamines sont plus importants et plus profitables à l'organisme si ceux-ci proviennent d'une source naturelle. La notion d'assimilation prend tout son sens dans ce domaine. C'est d'ailleurs une voie importante de recherche, liée à la pharmacocinétique, dans le domaine de l'alimentation et de la pharmacie systémique.

En pharmacologie, la pharmacocinétique est l'étude du devenir d'une substance active dans l'organisme. Elle comprend 4 grandes étapes : l'absorption, la diffusion dans l'organisme, sa métabolisation et son élimination.

L'absorption (ou résorption) est le processus par lequel la substance passe de son site d'administration (voie orale, sublinguale, intraveineuse, cutanée etc...) à la circulation générale. La biodisponibilité est la quantité / la fraction du médicament administré qui parvient à son site d'action et la vitesse à laquelle il y accède.

La diffusion (ou distribution) dans l'organisme : une fois dans la circulation sanguine, le médicament va se diffuser dans l'organisme pour atteindre les cibles biologiques (tissus et organes).

La métabolisation (ou biotransformation) est la/les transformation(s) du médicament, par une/des réaction(s) enzymatique(s), en un ou plusieurs autres composés (appelés métabolites) actifs ou inactifs d'un point de vue pharmacologique.

L'élimination hors de l'organisme d'un médicament se fait par le foie via le système biliaire et les reins.

Tous les tissus d'interface (souvent des épithéliums, par définition) sont doués de ces facultés : des tissus comme la peau, les poumons, les reins, les intestins peuvent réaliser ces processus.

5 La peau, et l'épiderme en particulier, est capable de réaliser ces processus d'absorption, de diffusion et de métabolisation des matières actives apposées à sa surface, et d'assimiler des molécules actives.

Comme en pharmacologie, c'est une donnée qui doit être prise en compte pour ajuster et optimiser l'efficacité d'un actif cosmétique. Elle consiste en une succession d'étapes de pénétration transcutanée, de transformations,
10 de diffusion et d'utilisation par la cible.

Ainsi, la préparation d'actifs cosmétiques plus assimilables (ou présentant une capacité d'assimilation optimisée) par la peau serait une avancée majeure dans le domaine de la cosmétique pour améliorer l'efficacité des produits cosmétiques.

15 Les matériaux végétaux dont on extrait les constituants sont généralement des plantes, des fruits ou des graines, ou bien des organes ou éléments constitutifs de plantes, de fruits ou de graines, tels que des feuilles, des racines, des tiges ou des fleurs.

A l'heure actuelle, il existe différentes méthodes permettant d'extraire des
20 composés, en particulier des molécules ou des macromolécules, présentes au sein de ces matériaux végétaux.

Typiquement, pour réaliser une extraction, les matériaux végétaux peuvent être broyés par voie mécanique (le matériau broyé étant ensuite le plus souvent extrait au sein d'un solvant) ou bien, si leur nature le permet, être
25 pressés, ou bien encore être entaillés pour laisser s'écouler le contenu de leurs tissus. Bien que relativement intéressantes pour extraire certains principes actifs végétaux, ces techniques se révèlent limitées, dans la mesure où elles permettent en fait d'extraire un nombre relativement restreint de composés présents dans les matériaux végétaux, aussi bien
30 quantitativement que qualitativement. En particulier, certaines molécules ou macromolécules présentes dans le matériau végétal se révèlent inaccessibles avec ces méthodes. C'est en particulier le cas pour certains

composés intimement emprisonnés au sein des végétaux, et pour de nombreux constituants macromoléculaires constitutifs des parois végétales qui sont par nature insolubles, et qui restent de ce fait emprisonnés dans le matériau végétal avec les méthodes précitées.

5 En vue d'accéder à ces composés, qu'un broyage ou pressage classique ne permet pas d'extraire, il a été décrit des techniques plus spécifiques, qui permettent une extraction plus poussée.

Dans ce cadre, une première technique qui a été proposée consiste à employer une enzymolyse. Selon cette technique, le matériau végétal dont
10 on souhaite extraire les extraits est mis en présence d'une enzyme propre à hydrolyser les zones des plantes où sont emprisonnés les composés ou principes actifs qu'on souhaite extraire (typiquement, on emploie des enzymes qui sont capables d'hydrolyser les parois cellulaires). Cette technique d'enzymolyse s'avère intéressante pour extraire des composés
15 encapsulés ou emprisonnés dans des zones spécifiques du matériau végétal, et elle présente l'avantage de conduire à une extraction plus poussée des constituants présents, notamment dans la mesure où elle permet d'hydrolyser des macromolécules insolubles (macromolécules constitutives des parois cellulaires par exemple) en des molécules de
20 dimensions plus restreintes, et donc plus aisées à extraire).

Une autre méthode qui a été développée pour effectuer une extraction plus poussée des actifs présents dans des matériaux végétaux consiste à employer des méthodes dites de cryobroyage ou "broyage cryogénique", dans lesquelles on effectue un broyage du matériau végétal à extraire en
25 opérant sur un matériau à l'état congelé (typiquement à des températures inférieures à -18.deg.C). Selon ces techniques, l'action conjointe du froid et du broyage conduit à une fragilisation du matériel végétal qui conduit à une qualité de broyage qui s'avère supérieure à un broyage classique. Cette qualité de broyage accrue s'explique au moins en partie par le fait que la
30 congélation induit un éclatement de certaines structures végétales sous l'effet de la congélation des liquides aqueux qu'elles contiennent, une rigidification des tissus induisant une friabilité de ces tissus et la formation

de cristaux solides au sein du matériau végétal, qui sont propres à jouer le rôle d'agents abrasifs lors du broyage. Les techniques d'extraction par cryobroyage permettent, certes, le plus souvent, une extraction plus efficace que les broyages effectués à des températures supérieures à la température de congélation du matériau végétal, mais elles restent néanmoins, elles aussi, relativement limitées et elles permettent d'accéder à un nombre réduit d'actifs. En particulier, elles ne permettent généralement pas parois d'extraire certains composés présents au sein des parois cellulaires.

10 Le document FR2940112 ([1]) décrit une méthode d'extraction optimisée permettant d'obtenir des extraits plus riches en principes actifs que les extraits obtenus avec les méthodes classiques d'extraction.

15 Il reste toutefois un besoin réel d'extraits de matériaux végétaux présentant une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées, en particulier d'un procédé permettant l'obtention de tels extraits végétaux.

Description de l'invention

20 La présente invention a précisément pour but de répondre à ces besoins et inconvénients en fournissant un procédé d'obtention d'un extrait d'un matériau végétal présentant une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées.

25 Les inventeurs de la présente invention sont en effet les tout premiers à avoir démontré qu'un actif cosmétique naturel, un extrait de plante, est assimilable. Ils ont également démontré de manière inattendue que le fait qu'un actif soit naturel ou végétal peut influencer son assimilation par la peau.

30 Les inventeurs de la présente invention sont ainsi les tout premiers à avoir mis en évidence, de manière tout à fait inattendue, qu'un extrait végétal préparé au moyen de ce procédé présente des propriétés améliorées de pénétration transcutanée, de diffusion à travers l'épiderme et le derme et

de métabolisation/activation du métabolisme cellulaire supérieures à un extrait d'un matériau végétal obtenu par les méthodes de l'art antérieur.

Un premier objet de l'invention se rapporte ainsi à un procédé d'obtention d'un extrait d'un matériau végétal présentant une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées, dans lequel:

- (a) le matériau végétal est soumis, soit (i) à l'état frais, ou à l'état congelé, ou à l'état séché, soit (ii) à l'état lyophilisé, respectivement à une extraction par pression sans solvant pour les cas de (i) ou à une extraction au moyen d'un solvant choisi parmi la glycérine, l'éthanol et l'eau pour le cas (ii),
- (b) La biomasse végétale ainsi extraite est séparée de la phase liquide par filtration et/ou centrifugation,
- (c) le produit obtenu à l'étape (b) est maintenu à l'abri de la lumière et/ou de l'oxygène,
- (d) l'extrait est obtenu à l'issue de l'étape (c) et présente une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisée(s).

On entend par « matériau végétal », au sens de la présente invention, toute plante entière, d'une partie de plante comme les graines, les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs ; ou bien de fruits ou d'éléments constitutifs de fruits Ces matériaux végétaux peuvent être utilisés dans leur intégralité ou seulement en partie. De plus ils peuvent être employés seuls ou en mélange. De préférence, le matériau végétal est une plante succulente, par exemple la ficoïde glaciale (*Mesembryanthemum crystallinum*), *Carpobrotus edulis* ou *Sedum spectabile*, ou un organe de plante riche en eau, par exemple les fruits.

On entend par « pénétration », au sens de la présente invention, le transfert de substances exogènes, contenues dans l'extrait, au travers la peau, depuis le milieu extérieur. La pénétration comprend la pénétration proprement dite à travers l'épiderme et la diffusion au niveau de la couche cornée.

On entend par « assimilation », au sens de la présente invention, la transformation et/ou l'intégration par la peau de substances exogènes,

contenues dans l'extrait, en substances endogènes / reconnues par la peau en vue d'une réaction biologique et/ou d'une utilisation favorable par les cellules de la peau dans le but d'initier une réaction biologique cosmétique

- 5 On entend par « optimisé », au sens de la présente invention une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation plus forte et/ou plus complète et/ou plus et/ou mieux ciblée et/ou à la juste dose par rapport à celles constatées avec des extraits des mêmes matériaux végétaux non préparés au moyen du procédé de l'invention.
- 10 La stabilisation de la matière végétale avant extraction est un premier point important, afin de ne pas dénaturer les molécules constitutives.
- On entend par « état frais », au sens de la présente invention, un végétal ou un matériau végétal récolté moins de 2 heures préalablement aux réactions prévues dans l'étape (a). Il peut s'agir par exemple d'un végétal
- 15 ou une matière végétale n'ayant subi aucun traitement et/ou altération de nature physico-chimique, enzymatique, microbiologique et/ou thermique.
- On entend par « état congelé », au sens de la présente invention, un végétal ou un matériau végétal récolté à l'état frais puis congelé sous 2
- 20 heures après récolte. La congélation permet avantageusement de conserver les structures et/ou de préserver les qualités organoleptiques du végétal ou du matériau végétal et de stopper la dégradation microbiologique et enzymatique du végétal ou du matériau végétal.
- On entend par « état séché », au sens de la présente invention, un végétal ou un matériau végétal récolté à l'état frais puis auquel on a fait subir un
- 25 procédé de déshydratation permettant d'enlever au végétal ou au matériau végétal l'eau qu'il renferme. Avantageusement, le séchage est réalisé de façon ménagée et permet de ce fait d'éviter l'altération des plantes, leur fermentation et la perte de leurs principes actifs. Le séchage de façon ménagée est un séchage doux et rapide afin de ne pas les altérer ou même
- 30 les cuire. Il peut être réalisé par tout moyen connu de l'homme du métier, par exemple une lyophilisation, permet de conserver les structures cellulaires avant extraction, un séchage sur claies de façon à que l'air

circule librement, ou à séchoir à température très douce, à une température comprise entre 20 et 40°C, ou par dessiccation.

L'extraction par pression sans solvant peut être réalisée par toute méthode impliquant un broyage, notamment réalisé au moyen de dispositifs connus de l'homme du métier de type presse, pilon ou broyeur à marteau. Il peut par exemple s'agir d'un cryobroyage ou d'une cryoextraction comme celles décrites dans le document FR2652265 **([2])**. Dans ce mode de réalisation, le matériau végétal est broyé à l'état congelé pour conserver l'intégrité de ses molécules actives, et le broyage peut être réalisé à une température inférieure à la température de congélation du matériau. L'absence de solvant peut permettre d'obtenir un produit particulièrement riche en principes actifs et constitué essentiellement des composés du matériau végétal lui-même, non dilués dans un milieu dispersant, et donc entièrement naturel.

On entend par " filtration ", au sens de la présente invention, tout procédé permettant de retenir les derniers résidus solides, le but étant d'obtenir une solution parfaitement limpide. Tout procédé de filtration connu de l'homme du métier peut être utilisé, comme par exemple une filtration frontale, une filtration sur membrane avec un seuil de coupure défini en fonction de la taille des particules à considérer et/ou une filtration sur résine ou silice, afin d'enrichir en composé d'intérêt, impliquant éventuellement la présence d'adjuvant de filtration de type perlite ou diatomées, cette liste n'étant pas limitative.

On entend par « centrifugation », au sens de la présente invention, tout procédé permettant la séparation des résidus solides et du surnageant, notamment en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge. Par exemple, la biomasse végétale issue de l'étape (a) du procédé de l'invention peut être centrifugée de 1000 à 2000 g pendant 1 à 10 minutes afin d'obtenir un surnageant.

A l'issue de l'étape (c), un milieu liquide est obtenu, qui comprend les composés et/ou principes actifs à l'état dissous ou dispersé.

Avantageusement, le produit obtenu à l'étape (a) peut être soumis à une réaction d'hydrolyse des polymères extractibles. Cette étape supplémentaire est préférentiellement réalisée après l'étape (a). Alternativement, elle peut être réalisée après l'étape (b). De manière
5 avantageuse, elle permet de diminuer la taille desdits polymères extractibles contenus dans ledit produit notamment obtenu à l'étape (a), de préférence avant que celui-ci ne soit soumis à l'étape (b). L'hydrolyse peut être réalisée par tout moyen connu de l'homme du métier. Dans un mode de réalisation, l'hydrolyse peut être réalisée au moyen de protéases et/ou
10 d'hydrolases permettant de dégrader les polysaccharides éventuellement contenus dans le produit obtenu à l'étape (a) ou à l'étape (b). Il peut s'agir de toute protéase ou de toute hydrolase connue de l'homme du métier, par exemple une pectinase, une hémicellulase ou une glucanase. Des enzymes commerciales intéressantes pour la mise en œuvre de l'invention
15 sont notamment les pectinases du type de la pecllyve V extraction liquide ®; et les hémicellulases du type de la Feedlyve AXC 1500L® ou la Feedlyve AGL 1500P®.

Dans un autre mode de réalisation, l'hydrolyse peut consister en une réaction de dégradation thermique contrôlée.

20 Dans le procédé de l'invention, lorsque l'extrait obtenu à l'issue de l'étape (c) contient de l'éthanol, une étape d'élimination de l'éthanol peut être réalisée par évaporation sous vide à une température comprise de 40 à 60°C.

Le procédé de l'invention peut comprendre en outre une étape de
25 stabilisation de l'extrait présentant une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées. Cette étape de stabilisation peut résulter de l'ajout d'une ou plusieurs substances choisie parmi la glycérine, la bétaïne, le saccharose, le fructose, et le sorbitol. Avantageusement, la concentration de la substance ou des substances de
30 stabilisation de stabilisation est d'au moins 60% en poids par rapport au poids total de l'extrait « final » comprenant la ou les substances de stabilisation et l'extrait présentant une capacité de pénétration dans la

peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées. Avantageusement, l'ajout de ces substances permet l'inhibition de la croissance et/ou de la reproduction des bactéries éventuellement présentes dans l'extrait présentant une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées. Par exemple, la stabilisation de l'extrait présentant des capacités de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées peut être obtenue par ajout d'un mélange comprenant la glycérine, la bétaine et l'eau en proportion 60/30/10 (p/p/p).

Un autre objet de l'invention se rapporte à un extrait d'un matériau végétal présentant une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées, susceptible d'être obtenu par la mise en œuvre du procédé de l'invention.

Un autre objet de l'invention se rapporte à une composition cosmétique ou dermatologique comprenant un extrait du matériau végétal présentant une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées tel que défini ci-dessus. La composition peut comprendre un véhicule cosmétiquement ou dermatologiquement acceptable. Il peut notamment s'agir d'un véhicule pour une utilisation en contact avec des cellules humaines cutanées, en particulier les cellules de l'épiderme, sans toxicité, irritation, réponse allergique induite et similaire, et proportionné à un rapport avantage/risque raisonnable.

La composition cosmétique peut comprendre de 0,0001 à 5 % en poids, d'extrait présentant une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées par rapport au poids total de la composition. Par exemple, la composition peut comprendre de 0,0001 à 3 %, ou de 0,001 à 3%, ou de 0,0005 à 0,5%, ou de 0,01 à 1 % en poids de l'extrait par rapport au poids total de la composition. Cette teneur peut être calculée par le rapport de la masse (ou du poids) de la matière sèche comprise dans l'extrait, rapportée à la masse (ou au poids) totale de la composition. L'expression "matière sèche", telle qu'elle est employée dans la présente invention, désigne la masse ou le poids de l'ensemble des composés présents dans l'extrait une fois les solvants éventuels retirés.

La composition de l'invention peut être obtenue par tout procédé approprié connu de l'homme du métier pour la fabrication d'une composition cosmétique. Il peut s'agir, par exemple d'un simple mélange. Il peut s'agir également, par exemple, d'un procédé comprenant une étape
5 d'incorporation d'une phase interne dans une phase externe au moyen d'un émulseur, par exemple d'une turbine de type rotor-stator. Il peut s'agir également par exemple d'un procédé utilisant la Température d'Inversion de Phase (TIP), ce procédé étant classiquement utilisé par l'homme de l'art pour obtenir des émulsions huile dans eau dont les gouttelettes dispersées
10 sont particulièrement fines, par exemple avec un diamètre de 0,1 à 1 μm .

La composition cosmétique peut être sous la forme d'onguent, de crème, d'huile, de lait, de pommade, de poudre, de tampon imbibé, de solution, de gel, de spray, de lotion, de suspension, de savon ou de shampooing. De préférence, la composition est sous forme de gel aqueux ou
15 hydroalcoolique, de crème aqueuse ou hydroalcoolique, d'huile, ou de lotion aqueuse ou hydroalcoolique. La composition peut également être sous la forme d'émulsion huile dans eau, eau dans huile, ou multiple. Idéalement la composition cosmétique comprenant un extrait d'un matériau végétal présentant une capacité de pénétration dans la peau et/ou
20 d'assimilation par la peau optimisées, sera elle aussi optimisée afin que la capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau de l'extrait d'un matériau végétal soit encore améliorée. Cette optimisation par des formulations optimisées d'émulsion, de gel, des systèmes de vectorisation ou des formules favorisant l'occlusion par exemple.

25 L'application de la composition selon l'invention est généralement effectuée par voie topique. Toutefois, la composition peut également être administrée par voie orale, notamment lorsqu'elle est sous forme de complément alimentaire.

30 Un autre objet de l'invention se rapporte à une utilisation cosmétique de la composition de l'invention, ou de l'extrait de l'invention.

Un autre objet de l'invention se rapporte à un procédé de traitement cosmétique non thérapeutique comprenant l'application sur la peau ou les

muqueuses d'une composition cosmétique ou dermatologique selon l'invention ou d'un extrait selon l'invention.

Un autre objet de l'invention se rapporte à une trousse pour le traitement cosmétique non thérapeutique de la peau ou des muqueuses comprenant
5 une composition cosmétique ou dermatologique selon l'invention ou d'un extrait selon l'invention. La trousse peut comporter un manuel et/ou une notice d'utilisation et/ou un support comportant des instructions pour l'emploi de la composition sur la peau ou les muqueuses. La trousse peut être par exemple un conditionnement. Le support, le manuel ou la notice
10 peut avoir notamment pour fonction d'expliquer à l'utilisateur la manière et la fréquence d'application sur la peau de la composition ou de l'extrait de la présente invention. Selon l'invention, la trousse de soin cosmétique peut également comprendre un applicateur, par exemple une spatule, une brosse, un applicateur dynamique, par exemple un dispositif de massage
15 imprégné de la composition cosmétique de l'invention.

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.

20

Brève description des figures

- La figure 1 représente une cellule de diffusion de type Franz.
- La figure 2 représente la concentration en acide oxalique (exprimée en ppm) après application des 4 traceurs (A) et d'une
25 formule enrichie en acide oxalique (C) dans l'épiderme, le derme et le liquide récepteur.
- La figure 3 représente la concentration en acide citrique (exprimée en ppm) après application des 4 traceurs (A) et d'une
30 liquide récepteur.

- La figure 4 représente la teneur de potassium (exprimée en $\mu\text{g/g}$) après application des 4 traceurs (A) et d'une formule enrichie en potassium (D) dans l'épiderme, le derme et le liquide récepteur.
- La figure 5 représente le spectre caractéristique du cryoextrait de ficoïde (tracé X = cryoextrait sous forme liquide ; tracé Y = cryoextrait après lyophilisation).
- La figure 6 représente une superposition d'une image d'une coupe de peau en contraste de phase et la pénétration de la formule sur l'explant en échelle chromatique pour le placebo, le cryoextrait (F) et le cryoextrait lyophilisé (FL).
- La figure 7 représente le schéma directeur de fractionnement.
- La figure 8 représente la comparaison de l'effet de 2 extraits fractionnés de ficoïde glaciale, à concentration équivalentes, sur la consommation du glucose par des kératinocytes humains normaux. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin, pour un total de 0,1%, un concentrat de 0,1%, un concentrat HS (concentrat ayant subi une hydrolyse visant à libérer des sucres) de 0,5%, un concentrat HP (concentrat ayant subi une hydrolyse visant à libérer des peptides) de 0,25%, un filtrat de 0,1%, un filtrat HS de 0,5%, un filtrat HP de 0,25% pour l'essai PG40, et un total de 0,2%, un concentrat de 0,2%, un concentrat HS de 1%, un concentrat HP de 1%, un filtrat de 0,2%, un filtrat HS de 1% et un filtrat HP de 1% pour l'essai avec le cryoextrait enzymatique.
- La figure 9 représente la comparaison de l'effet d'un extrait fractionné de ficoïde glaciale et de ses molécules témoins, à concentrations équivalentes, sur la consommation du glucose par des kératinocytes humains normaux. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin, pour un total de 0,2%, un concentrat de 0,2%, un concentrat HS de 1%, un concentrat HP de 1%, un filtrat de 0,2%, un filtrat HS de 1%, un filtrat HP de 1% pour le cryoextrait enzymatique, et une concentration en glucose de 0,04%, une

concentration d'acide citrique de 0,01%, et une concentration en acide oxalique de $8.10^{-3}\%$.

– La figure 10 représente les effets de 2 extraits fractionnés de ficoïde glaciale sur la synthèse protéique par des kératinocytes humains normaux. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin, pour un total de 0,1, 0,5 et 2,5%, un concentrat à 0,02, 0,1 et 0,5%, %, un concentrat HS de 0,05, 0,5 et 5%, un concentrat HP de 0,25, 0,5 et 1,0%, un filtrat à 0,1, 0,5 et 2,5%, un filtrat HS à 0,05, 0,5 et 5%, un filtrat HP à 0,25, 0,5 et 1,0% pour l'essai PG40, et un total de 0,2, 1 et 5%, un concentrat à 0,2, 1 et 5%, un concentrat HS à 0,2, 1 et 5%, un concentrat HP à 0,04, 0,2 et 1%, un filtrat à 0,2, 1 et 5%, un filtrat HS à 0,2, 1 et 5% et un filtrat HP à 0,04, 0,2 et 1% pour l'essai avec le cryoextrait enzymatique.

– La figure 11 représente la comparaison de 2 extraits fractionnés de ficoïde glaciale, à concentration équivalentes sur l'activité mitochondriale des fibroblastes. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin, pour, à J1, J2, J3 et J6, un total de 0,2%, un concentrat de 0,2%, un concentrat HS de 1%, un concentrat HP de 1%, un filtrat de 0,2%, un filtrat HS de 1%, un filtrat HP de 1% pour l'essai PG40, et un total de 1%, un concentrat de 1%, un concentrat HS de 5%, un concentrat HP de 2,5%, un filtrat de 1%, un filtrat HS de 5% et un filtrat HP de 1% pour l'essai avec le cryoextrait enzymatique.

– La figure 12 représente la comparaison d'un extrait fractionné de ficoïde glaciale et de ses molécules témoins à concentration optimum sur l'activité mitochondriale des fibroblastes. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin, à J1, J2, J3 et J6, pour un total de 1%, un concentrat de 1%, un concentrat HS de 5%, un concentrat HP de 2,5%, un filtrat de 1%, un filtrat HS de 5%, un filtrat HP de 1% pour le cryoextrait enzymatique, et une concentration en glucose de 1%, en acide citrique de 0,04% et en acide oxalique de $2.10^{-4}\%$.

– La figure 13 représente la comparaison de l'effet de 2 extraits fractionnés de ficoïde glaciale, à concentration équivalentes sur la consommation du glucose par des fibroblastes dermiques humains normaux. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin, à 24 heures, 48 heures et 72 heures, pour un total de 0,2%, un concentrat de 0,2%, un concentrat HS de 1%, un concentrat HP de 1%, un filtrat de 0,2%, un filtrat HS de 1%, un filtrat HP de 1% pour l'essai PG40, et un total de 0,2%, un concentrat de 0,2%, un concentrat HS de 1%, un concentrat HP de 1%, un filtrat de 0,2%, un filtrat HS de 1% et un filtrat HP de 1% pour l'essai avec le cryoextrait enzymatique.

– La figure 14 représente la comparaison de l'effet d'un extrait fractionné de ficoïde glaciale et de ses molécules témoins, à concentration équivalentes sur la consommation du glucose par des fibroblastes dermiques humains normaux. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin, à 24 heures, 48 heures et 72 heures, pour un total de 0,2%, un concentrat de 0,2%, un concentrat HS de 1%, un concentrat HP de 1%, un filtrat de 0,2%, un filtrat HS de 1%, un filtrat HP de 1% pour le cryoextrait enzymatique, et une concentration en glucose de 0,04%, en acide citrique de 0,04% et en acide oxalique de $2 \cdot 10^{-4}\%$.

– La figure 15 représente les effets de 2 extraits fractionnés de ficoïde glaciale sur la voie mTOR. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin, pour un total de 0,1, 0,5 et 2,5%, un concentrat à 0,02, 0,1 et 0,5%, %, un concentrat HS de 0,05, 0,5 et 5%, un concentrat HP de 0,25, 0,5 et 1,0%, un filtrat à 0,1, 0,5 et 2,5%, un filtrat HS à 0,05, 0,5 et 5%, un filtrat HP à 0,25, 0,5 et 1,0% pour l'essai PG40, et un total de 0,2, 1 et 5%, un concentrat à 0,2, 1 et 5%, un concentrat HS à 0,2, 1 et 5%, un concentrat HP à 0,04, 0,2 et 1%, un filtrat à 0,2, 1 et 5%, un filtrat HS à 0,2, 1 et 5% et un filtrat HP à 0,04, 0,2 et 1% pour l'essai avec le cryoextrait enzymatique.

– La figure 16 représente les effets d'un extrait fractionné de ficoïde glaciale et de ses molécules témoins sur la voie mTOR. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin, pour un total de 0,2, 1 et 5%, un concentrat à 0,2, 1 et 5%, %, un concentrat HS de 0,2, 1 et 5%, un concentrat HP de 0,04, 0,2 et 1,0%, un filtrat à 0,2, 1 et 5%, un filtrat HS à 0,2, 1 et 5%, un filtrat HP à 0,04, 0,2 et 1,0% pour le cryoextrait enzymatique, et un NH glucose (glucose non hydrolysé) de 0,04, 0,2 et 1%, un sol HS glucose (glucose ayant subi une hydrolyse visant à libérer des sucres) à 0,2, 1 et 5%, un NH acide citrique à 4.10^{-4} , 2.10^{-3} et 0,01%, et un NH acide oxalique à $3,2.10^{-4}$, $1,6.10^{-3}$ et $8.10^{-3}\%$.

15

EXEMPLES OU MODES DE REALISATION

Exemple 1 : Préparation d'un extrait de ficoïde glaciale

La ficoïde glaciale (parties aériennes) est récoltée au centre agronomique de La Gacilly puis elle est broyée à l'état congelé (-18°C) pour conserver l'intégrité de ses molécules actives. Le broyage est réalisé sous un courant d'azote liquide (-196°C) à une température de -70°C. Cette technique de broyage est appelée cryobroyage. L'action conjointe du froid et du broyage conduit à une fragilisation du matériel végétal ce qui permet une qualité de broyage supérieure à un broyage classique.

Cette congélation induit en effet un éclatement de certaines structures végétales sous l'effet de la congélation des liquides aqueux qu'elles contiennent et la formation de cristaux solides au sein du végétal. De plus, ce cryobroyage de la plante fraîche permet de préserver les constituants de la plante et d'éviter leur dégradation. Contrairement à ce que l'on observe suite à des techniques de séchage et de broyage classiques des

plantes, dans ce cas, aucun échauffement, aucun processus oxydatif n'ont lieu. Grâce à ce procédé, les actifs végétaux restent intègres.

Certaines molécules ou macromolécules présentes dans la plante restent inaccessibles par cryobroyage. C'est en particulier le cas pour de nombreux constituants macromoléculaires constitutifs des parois végétales, qui sont par nature insolubles et qui restent de ce fait emprisonnés dans le végétal.

En vue d'accéder à ces composés, les chercheurs ont réalisé une étape supplémentaire d'hydrolyse enzymatique.

10 La ficoïde préalablement cryobroyée est mise en présence d'enzymes propres à hydrolyser les tissus des plantes et notamment les parois cellulaires.

Cette technique présente l'avantage de conduire à une meilleure extraction des constituants présents, notamment dans la mesure où elle permet d'hydrolyser des macromolécules insolubles (macromolécules constitutives des parois cellulaires comme la cellulose) en des molécules de dimensions plus restreintes, et donc plus aisées à extraire.

D'un point de vue efficacité biologique, le cryoextrait de ficoïde glaciale stimule la protéine mTOR. Cette voie centrale au niveau de la cellule induit toute une cascade de bénéfices cellulaires intéressants dans le domaine de l'anti-âge et de l'anti-rides. Ainsi, son assimilation potentielle par la peau et ses cellules, aussi au regard d'un extrait « classique » (plante sèche + solvant), est étudiée. Cette étude s'est donc déroulée en plusieurs temps : pénétration transcutanée et diffusion, simulation de la transformation de l'extrait par les cellules de la peau et métabolisation.

Exemple 2 : Etude de la pénétration transcutanée et de la diffusion de l'extrait

Pour étudier la pénétration transcutanée, les cellules de diffusion de type Franz sont utilisées. Cette démarche est combinée à la microscopie confocale Raman, qui permet d'obtenir des informations sur la structure de la peau et la pénétration de l'actif de façon simultanée.

Les cellules de diffusion de type Franz

Le cryoextrait, de par son procédé, est un mélange complexe de différentes molécules composant la ficoïde glaciale. Il y a peu de molécules majoritaires et toutes ont une importance vis-à-vis de l'efficacité.

5 Il a donc été décidé de tracer le glucose, l'acide oxalique, l'acide citrique et le potassium, le cryoextrait se décomposant comme décrit dans le Tableau 1.

Tableau 1 :

10

| Composition de l'extrait liquide (%) | | | |
|--------------------------------------|------|---|------|
| Peptides/acides aminés | 0,36 | Acides aminés libres | 0,09 |
| | | Oligo-peptides | 0,27 |
| minéraux | 0,69 | magnésium | 0,03 |
| | | sodium | 0,16 |
| | | potassium | 0,48 |
| Acides organiques | 0,93 | Acide oxalique | 0,34 |
| | | Acide citrique | 0,59 |
| sucre | 1,52 | Monosaccharides libres | 0,40 |
| | | Oligosaccharides (500-5000 Da) valeur théorique | 0,86 |
| | | Polysaccharides (>5000 Da) | 0,26 |
| Matière sèche | 3,5 | | |

4 formules de produits finis ont été réalisées. La formule A permet de mesurer la pénétration des 4 traceurs dans la formule finale, contenant 0,4% de cryoextrait. Les formules B, C et D ont été enrichies respectivement en glucose, acide oxalique/sodium, et en acide

15

citrique/potassium pour s'affranchir des limites de détection. Les formules ont pu donc être comparées deux à deux pour attester le passage, indépendamment de la dose appliquée, dans une formule cosmétique.

5 Les résultats montrent que l'acide oxalique pénètre jusque dans le milieu receveur avec une forte répartition au niveau du derme (cf. Figure 2).

Il en est de même pour l'acide citrique, avec cependant une répartition et/ou un effet stock plus homogène entre le derme et l'épiderme (cf. Figure 3).

10 Le potassium et le glucose passent très facilement jusque dans le milieu receveur avec peu de rétention au niveau des tissus cutanés (cf. Figure 4).

Ces résultats montrent que les 4 traceurs majoritaires, dans la formule finale, pénètrent la barrière épidermique et le derme, jusque dans le milieu receveur et se répartissent dans le tissu dermique. Il est aussi important de noter que, quelle que soit la dose incorporée, les teneurs en traceurs sont
15 du même ordre et sont comparables. La dose formulée dans A semble donc optimum pour une distribution utile des traceurs.

Cette étude utilisant la méthode de Franz, montre que les quatre molécules majoritaires du cryoextrait de ficoïde glaciale sont capables de pénétrer la barrière cutanée et de diffuser au travers de l'épiderme et du
20 derme.

La microscopie confocale RAMAN

Le spectre caractéristique du cryoextrait de ficoïde a été obtenu (Figure 5). Des lors, la présence de l'extrait dans les différentes profondeurs de
25 l'épiderme était potentiellement traçable.

Les formulateurs ont donc travaillé des formules (de type « lait démaquillant ») de façon à limiter les interférences possibles lors de la méthodologie. Elles contiennent le cryoextrait de ficoïde glaciale, ce même cryoextrait lyophilisé et, comme précédemment, le glucose, l'acide
30 oxalique, le sodium, le potassium et l'acide citrique, pour améliorer la limite de détection. Un essai placebo a également été réalisé.

La technique développée par le Pr Manfait (Tfaily et al. : « Monitoring caffeine and resveratrol cutaneous permeation by confocal Raman microspectroscopy », J. Biophotonics 1-6 (2013) ([3])) permet d'obtenir une signature spectrale de chaque formule à différents niveaux dans l'épiderme jusqu'à une profondeur de 110 voire 140 μm . Les logiciels employés permettent de superposer une image de la coupe de la peau en contraste de phase et la pénétration de la formule sur cet explant en échelle chromatique. Ces corrélations ont été réalisées pour le placebo, le cryoextrait (F) et le cryoextrait lyophilisé (FL) (cf. Figure 6).

Ces images de « fitting » montrent qu'une partie de la formule placebo pénètre dans les couches supérieures de l'épiderme, a priori jusqu'à la limite entre les couches épineuses et granuleuses. Le cryoextrait de ficoïde glaciale pénètre jusqu'à 140 μm , ce qui correspond à la couche basale, alors que la forme lyophilisée (donc modifiée par rapport à l'extrait natif) stagne au niveau de la couche cornée.

Cette étude utilisant la microscopie confocale RAMAN, montre que le cryoextrait de ficoïde glaciale est capable de pénétrer la barrière cutanée.

La combinaison de la méthode de Franz et de la méthode RAMAN montre que :

- Le cryoextrait de ficoïde glaciale pénètre la barrière cutanée et diffuse à travers l'épiderme et le derme.
- La cryoextraction favorise cette pénétration.

Exemple 3 : Etude de la métabolisation de l'extrait

Comme évoqué précédemment, la pénétration physique d'un actif peut s'accompagner aussi de transformations physiques (blocage par la taille des espaces intercornéocytaires) et/ou enzymatiques (« déglycosilation » et lyses de liaisons peptidiques par les enzymes endogènes).

Ces modifications enzymatiques et les fragmentations qui en résultent sont significatives et doivent être prises en compte pour le reste de l'étude concernant la métabolisation. L'étude permet de plus de comparer la métabolisation du cryoextrait par rapport à un extrait « classique »

(extraction de la plante sèche broyée par action d'un solvant cosmétique (mélange propylène glycol/eau) à 50°C = extrait PG40), le but étant de démontrer l'intérêt de la cryoextraction aussi pour cette dernière séquence de l'assimilation.

- 5 En préambule de cette étude, ces transformations vont être reproduites ou approchées pour mimer au mieux la situation réelle, sur les différents extraits.

Chaque extrait va donc subir des filtrations pour mimer une sélection par la taille et permettre d'engendrer plusieurs types de fractions. Une unité de
10 filtration a été utilisée pour réaliser un seuil de coupure réel à 7kDa (cf annexe 11). Dans le texte, le concentrât est la fraction supérieure à 7kDa et le filtrat est la fraction inférieure à 7kDa.

Chaque fraction va ensuite subir différentes digestions enzymatiques et/ou chimiques pour libérer des fragments oligopeptidiques ou peptidiques et
15 libérer des fragments d'oligosaccharides et monosaccharides. Dans le texte, HS correspond à la lyse qui permet de libérer des sucres et HP, à celle qui libère des peptides.

Le schéma directeur de ces différents fractionnements est représenté en Figure 7.

- 20 Sur toutes ces fractions, y compris sur le cryoextrait et l'extrait PG40 des tests de métabolisation ont été réalisés. Il a été opté pour la synthèse de protéines et la consommation de glucose pour les kératinocytes (cellules épidermiques) d'une part et d'autre part, l'activité mitochondriale et la consommation de glucose pour les fibroblastes dermiques.

25 3.1. La consommation de glucose pour les kératinocytes (cellules épidermiques)

Le glucose est l'un des nutriments essentiel pour le bon fonctionnement cellulaire. Suivre sa présence et/ou sa consommation est un excellent indicateur de l'activité cellulaire, notamment des synthèses nécessaires
30 pour les cellules, en suivant une cinétique particulière après l'introduction d'un extrait ou d'un actif. Les cellules ont été traitées par les différentes fractions et la consommation de glucose a été quantifiée après 24, 48 et

72h. La Figure 8 indique les résultats à concentrations « équivalentes », en tenant compte des facteurs de dilution pour la préparation des échantillons. La Figure 8 montre que les extraits totaux ne stimulent pas forcément la consommation de glucose par les cellules, mais que le cryoextrait fragmenté et/ou hydrolysé pour libérer les « groupes protéines » ou les « groupes sucres » permet d'obtenir une stimulation et surtout une stimulation plus homogène que l'extrait PG40 dans les mêmes conditions. Il est donc vraisemblable que lorsque le cryoextrait est transformé par la peau (au cours de la pénétration et de la diffusion) il conserve son niveau d'activation, voire devient plus efficace sur la consommation du glucose dans certains cas, alors que ce n'est pas le cas pour l'extrait PG40. Le cryoextrait « transformé par la peau » permet de stimuler la consommation de glucose et donc d'activer cet aspect du métabolisme des kératinocytes.

En reprenant ces résultats et en les comparant à ceux des molécules majoritaires, glucose, acides citrique et oxalique (cf. Figure 9), il apparaît que ces molécules apportent aussi une stimulation de la consommation de glucose. C'est probablement une explication de l'activité mesurée pour le cryoextrait mais avec un effet de dilution dû à la présence des autres molécules de l'extrait.

3.2. La synthèse de protéines pour les kératinocytes (cellules épidermiques)

La synthèse des protéines est un témoin très direct de la stimulation du métabolisme générale d'une cellule. Suivre les niveaux de synthèse est donc un excellent indicateur de l'activité cellulaire en fonction de l'introduction d'un extrait ou d'un actif. Les cellules ont été traitées (pendant 72h) par les différentes fractions et la synthèse a été quantifiée par incorporation de leucine tritiée pendant les dernières 24 heures. La Figure 10 indique les résultats à toutes les concentrations testées.

La Figure 10 montre que les extraits totaux stimulent les synthèses protéiques, le cryoextrait plus faiblement. Cependant le fractionnement permet nettement d'améliorer la différence en faveur du cryoextrait. Les

digestions permettant de libérer les « groupes peptidiques » ou les « groupes sucres » permet d'obtenir une stimulation plus importante et plus homogène que l'extrait PG40 dans les mêmes conditions. Tout porte donc à croire que lorsque le cryoextrait est transformé par la peau (au cours de la pénétration et de la diffusion) il devient plus efficace sur les synthèses.

Le cryoextrait, ainsi que ses formes « transformées par la peau » stimulent les synthèses protéiques et donc activent cet aspect du métabolisme des kératinocytes.

En reprenant ces résultats et en les comparant à ceux des molécules majoritaires, glucose, acides citrique et oxalique (cf. Figure 11), il apparaît que ces molécules ne semblent pas stimuler particulièrement les synthèses protéiques, excepté le glucose dans une proportion assez faible. L'augmentation des synthèses provient probablement des autres molécules présentes dans le cryoextrait.

3.3. L'activité mitochondriale pour les fibroblastes dermiques.

L'activité mitochondriale est un élément clé et très précoce du métabolisme cellulaire : le rôle des mitochondries est de transformer l'oxygène en énergie disponible pour la cellule. Suivre cette activité de base est un excellent indicateur de l'activité cellulaire. Les cellules ont été traitées 24h après leur ensemencement et pendant 6 jours. L'activité mitochondriale a été mesurée à J1, J2, J3 et J6, par hydrolyse au MTT (Methylthiazol tetrazolium).

La Figure 11 montre que le cryoextrait stimule fortement l'activité des mitochondries tout au long de la cinétique, beaucoup plus fortement que l'extrait PG40. Il en est de même pour les fractions libérant ou non les groupes « sucres » et « peptides ».

Le cryoextrait, ainsi que ses formes « transformées par la peau » stimulent l'activité des mitochondries. Ils activent donc cet aspect du métabolisme des fibroblastes.

En reprenant ces résultats et en les comparant aux molécules majoritaires, glucose, acides citrique et oxalique (cf. Figure 12), il apparaît que ces molécules apportent aussi une stimulation des mitochondries.

C'est probablement une explication de l'activité mesurée pour le cryoextrait.

3.4. La consommation de glucose pour les fibroblastes dermiques.

5 Le glucose est l'un des nutriments essentiel pour le bon fonctionnement cellulaire. Suivre sa présence et/ou sa consommation est un excellent indicateur de l'activité cellulaire, notamment des synthèses nécessaires pour les cellules, en suivant une cinétique particulière après l'introduction d'un extrait ou d'un actif. Les cellules ont été traitées par les différentes fractions et la consommation de glucose a été quantifiée après 24, 48 et 10 72h. Le graphique suivant indique les résultats à concentrations « équivalentes », en tenant compte des facteurs de dilution pour la préparation des échantillons.

La Figure 13 montre que les extraits totaux ne stimulent pas forcément la consommation de glucose par les cellules, mais que le cryoextrait 15 fragmenté et/ou hydrolysé pour libérer les « groupes peptides » ou les « groupes sucres » permet d'obtenir une stimulation et surtout une stimulation plus importante et plus homogène que l'extrait PG40 dans les mêmes conditions. Tout porte donc à croire que lorsque le cryoextrait est transformé par la peau (au cours de la pénétration et de la diffusion) il 20 devient plus efficace sur la consommation du glucose.

Le cryoextrait, ainsi que ses formes « transformées par la peau » stimulent la consommation de glucose. Ils activent donc cet aspect du métabolisme des fibroblastes.

En reprenant ces résultats et en les comparant aux molécules majoritaires, 25 glucose, acides citrique et oxalique (cf. Figure 14), il apparaît que ces molécules apportent aussi une stimulation de la consommation de glucose. C'est probablement une explication de l'activité mesurée pour le cryoextrait.

Ces différents tests sur l'activité mitochondriale, la consommation de 30 glucose et sur les synthèses de protéines réalisés sur les cellules majoritaires de la peau (kératinocytes et fibroblastes) montrent que :

- Le cryoextrait active le métabolisme cellulaire

- Le cryoextrait même sous forme « transformée par la peau » active le métabolisme, voire même plus que le cryoextrait « brut »

5 - Le cryoextrait « brut » ou sous forme « transformées par la peau » active plus le métabolisme que l'extrait PG40. La cryoextraction améliore la métabolisation des actifs de la ficoïde glaciale.

Pour résumer ces trois derniers chapitres : le cryoextrait (ainsi que ces molécules majoritaires considérées séparément) pénètre la barrière cutanée, diffuse et active le métabolisme cellulaire. Les tests réalisés in vitro montrent donc le cryoextrait est assimilable par la peau.

10

Exemple 4 : Efficacité de l'extrait sur la cible mTOR

Le cryoextrait de ficoïde glaciale s'était avéré être un stimulateur de la voie mTOR. Il a été montré une culture de fibroblastes en monocouche dans le milieu témoin ; la même culture mais après un traitement avec le cryoextrait de ficoïde glaciale montre une augmentation de cette fluorescence correspondant à mTOR qui est quantifiée de façon informatique à +32%.

15

Des tests similaires ont été réalisés, sur des kératinocytes, avec les différentes fractions produites pour démontrer l'assimilation (cf. Figure 15). Ces résultats montrent que le cryoextrait (« brut ») active la voie mTOR et l'active plus que l'extrait PG40. Les fractions par taille et par nature (peptides ou sucres) affichent de plus une efficacité supérieure sur cette voie, que la forme brute. Comparées deux à deux, les fractions du cryoextrait sont par ailleurs plus efficaces.

20

25

Même sous forme « transformée par la peau » le cryoextrait de ficoïde glaciale stimule la voie mTOR.

La cryoextraction améliore son efficacité sur cette voie.

En reprenant ces résultats et en les comparant aux molécules majoritaires, glucose, acides citrique et oxalique (cf. Figure 16), il apparaît que ces molécules provoquent également une stimulation de la voie mTOR. C'est probablement une explication de l'activité mesurée pour le cryoextrait.

30

Cette ultime vérification par rapport aux molécules majoritaires montre qu'elles sont en partie responsables de l'efficacité du cryoextrait. Elle justifie en outre leur choix en tant que traceurs de pénétration transcutanée.

Listes des références

1. FR2940112.
2. FR2652265.
- 5 3. Tfaili et al. : « Monitoring caffeine and resveratrol cutaneous permeation by confocal Raman microspectroscopy », J. Biophotonics 1-6 (2013).

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention d'un extrait d'un matériau végétal présentant une
5 capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau
optimisées, dans lequel:
- (a) le matériau végétal est soumis, soit (i) à l'état frais, ou à l'état
séché, ou à l'état congelé, soit (ii) à l'état lyophilisé, respectivement à une
10 extraction par pression sans solvant pour les cas (i) ou à une extraction au
moyen d'un solvant choisi parmi la glycérine, l'éthanol et l'eau pour le cas
(ii),
- (b) la biomasse végétale ainsi extraite est séparée de la phase
liquide par filtration et/ou centrifugation,
- (c) le produit obtenu à l'étape (b) est maintenu à l'abri de la lumière
15 et/ou de l'oxygène,
- (d) l'extrait est obtenu à l'issue de l'étape (c) et présente une
capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau
optimisée(s).
- 20 2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le produit obtenu à l'étape
(a) est soumis à une réaction d'hydrolyse des polymères extractibles pour
diminuer la taille desdits polymères extractibles contenus dans ledit produit
obtenu à l'étape (a), avant d'être soumis à l'étape (b).
- 25 3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel, lorsque l'extrait obtenu à
l'issue de l'étape (b) contient de l'éthanol, une étape d'élimination de
l'éthanol est réalisée par évaporation sous vide à une température
comprise de 40 à 60°C.
- 30 4. Procédé selon la revendication 1 à 3, comprenant en outre une étape de
stabilisation de l'extrait présentant une capacité de pénétration dans la
peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées par ajout d'une ou

plusieurs substances choisie parmi la glycérine, la bétaine, le saccharose, le fructose, et le sorbitol.

- 5 5. Procédé selon la revendication 1 à 3, comprenant en outre une étape de stabilisation de l'extrait présentant des capacités de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées est obtenu par ajout d'un mélange comprenant la glycérine, la bétaine et l'eau en proportion 60/30/10 (p/p/p).
- 10 6. Procédé selon la revendication 2, dans lequel la réaction d'hydrolyse est réalisée par des protéases et/ou des hydrolases permettant de dégrader les polysaccharides.
- 15 7. Procédé selon la revendication 2, dans lequel la réaction d'hydrolyse est une réaction de dégradation thermique contrôlée.
- 20 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite extraction par pression sans solvant de l'étape (a) est une cryoextraction.
- 25 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le matériau végétal est une plante succulente ou un organe de plante riche en eau.
- 30 10. Procédé selon la revendication 9, dans laquelle la plante succulente est choisie dans le groupe consistant en *Mesembryanthemum crystallinum*, *Carpobrotus edulis* et *Sedum spectabile*.
11. Extrait d'un matériau végétal présentant une capacité de pénétration dans la peau et/ou d'assimilation par la peau optimisées, susceptible d'être obtenu par la mise en œuvre d'un procédé défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 10.

12. Composition cosmétique ou dermatologique comprenant un extrait d'un matériau végétal tel que défini à la revendication 11.

5 13. Utilisation cosmétique de la composition définie à la revendication 12, ou de l'extrait tel que défini à la revendication 11.

10 14. Procédé de traitement cosmétique non thérapeutique comprenant l'application sur la peau ou les muqueuses d'une composition cosmétique selon la revendication 12 ou d'un extrait tel que défini à la revendication 11.

15 15. Trousse pour le traitement cosmétique non thérapeutique de la peau ou des muqueuses comprenant une composition cosmétique ou dermatologique selon la revendication 12 ou d'un extrait tel que défini à la revendication 11.

1/16

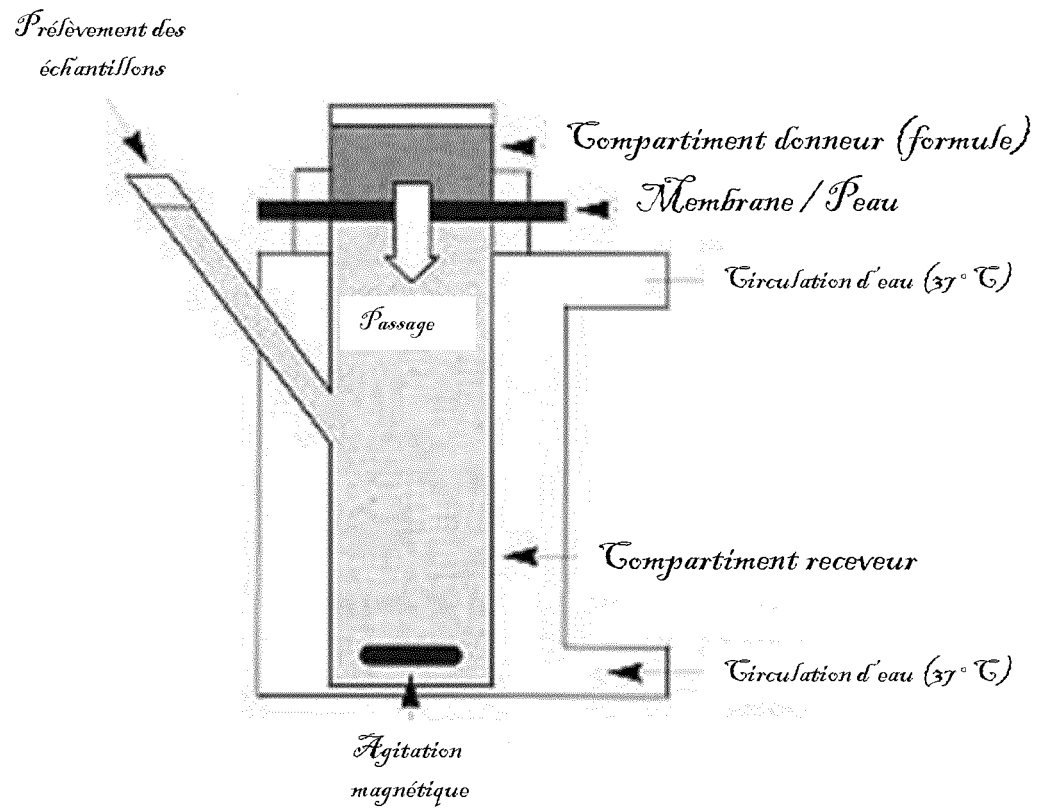


Figure 1

2/16

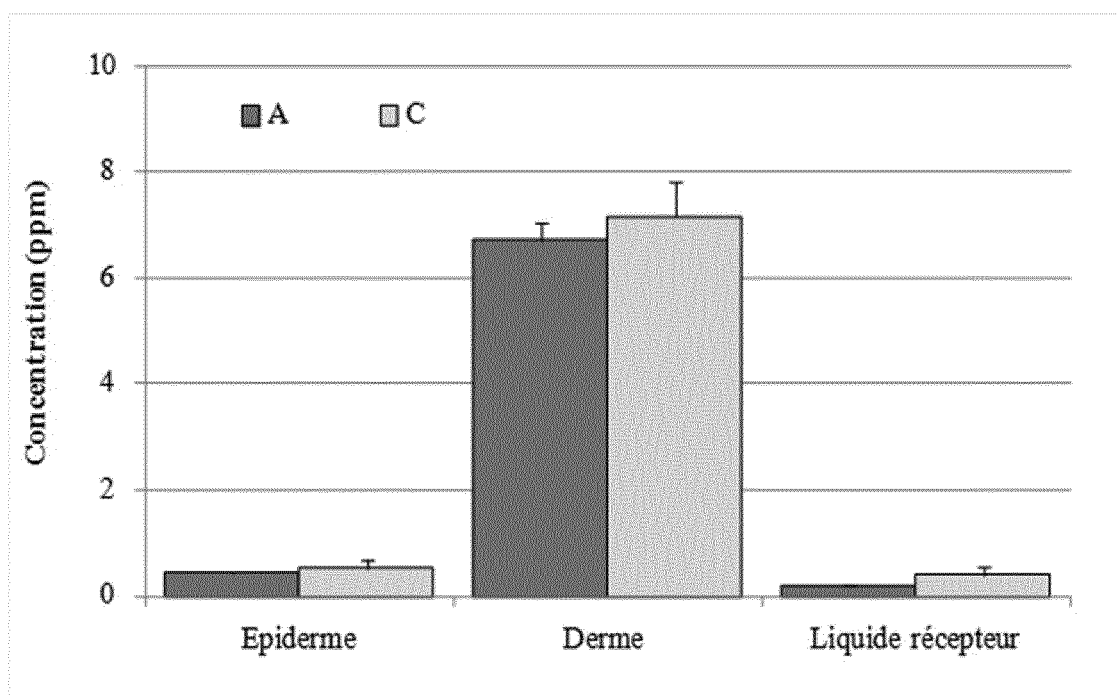


Figure 2

3/16

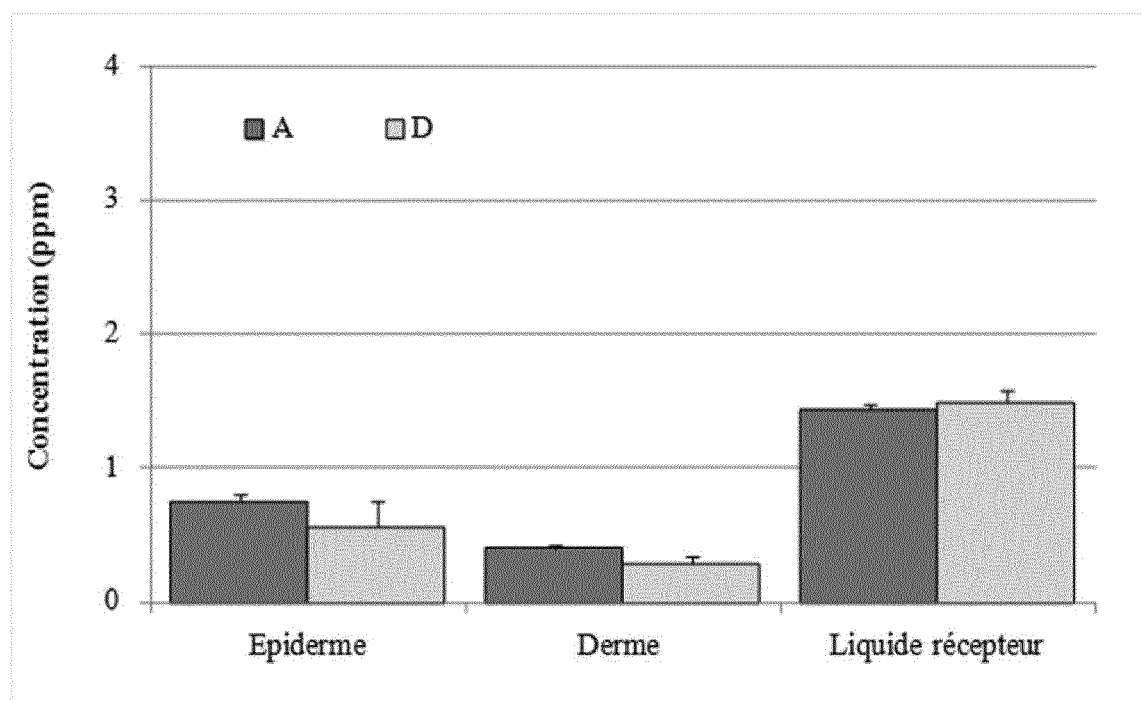


Figure 3

4/16

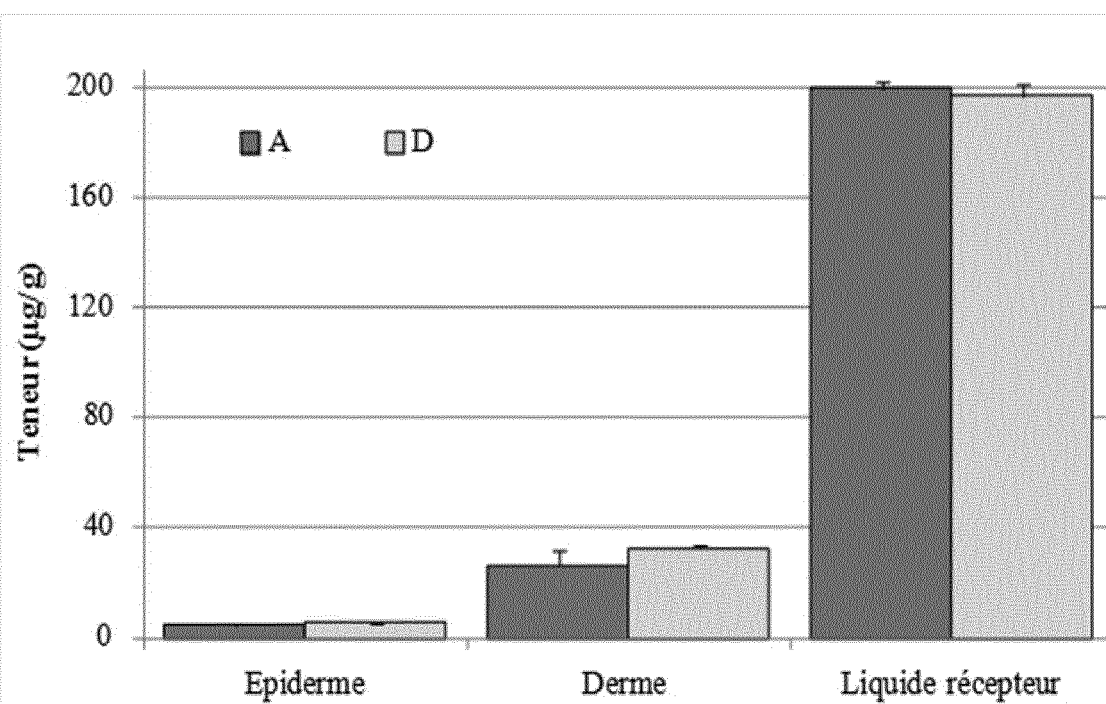


Figure 4

5/16

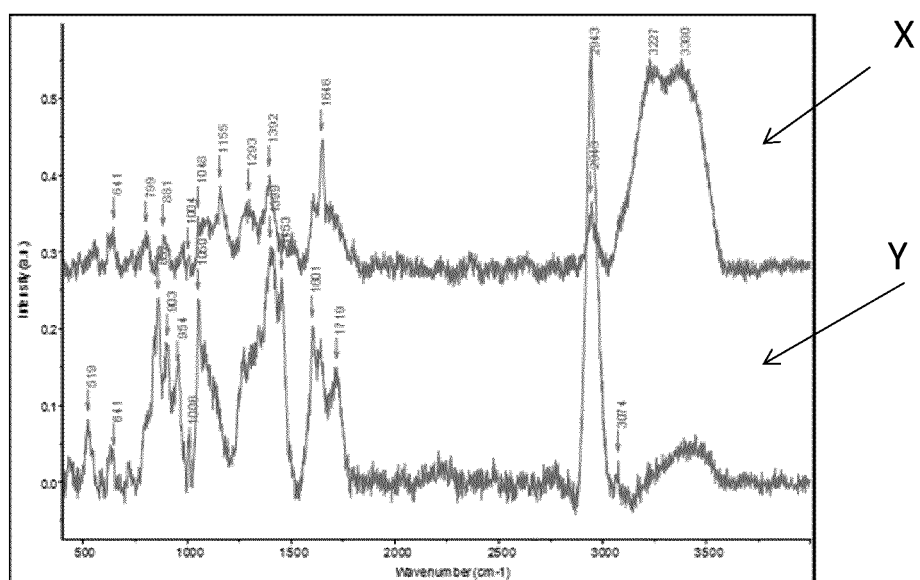


Figure 5

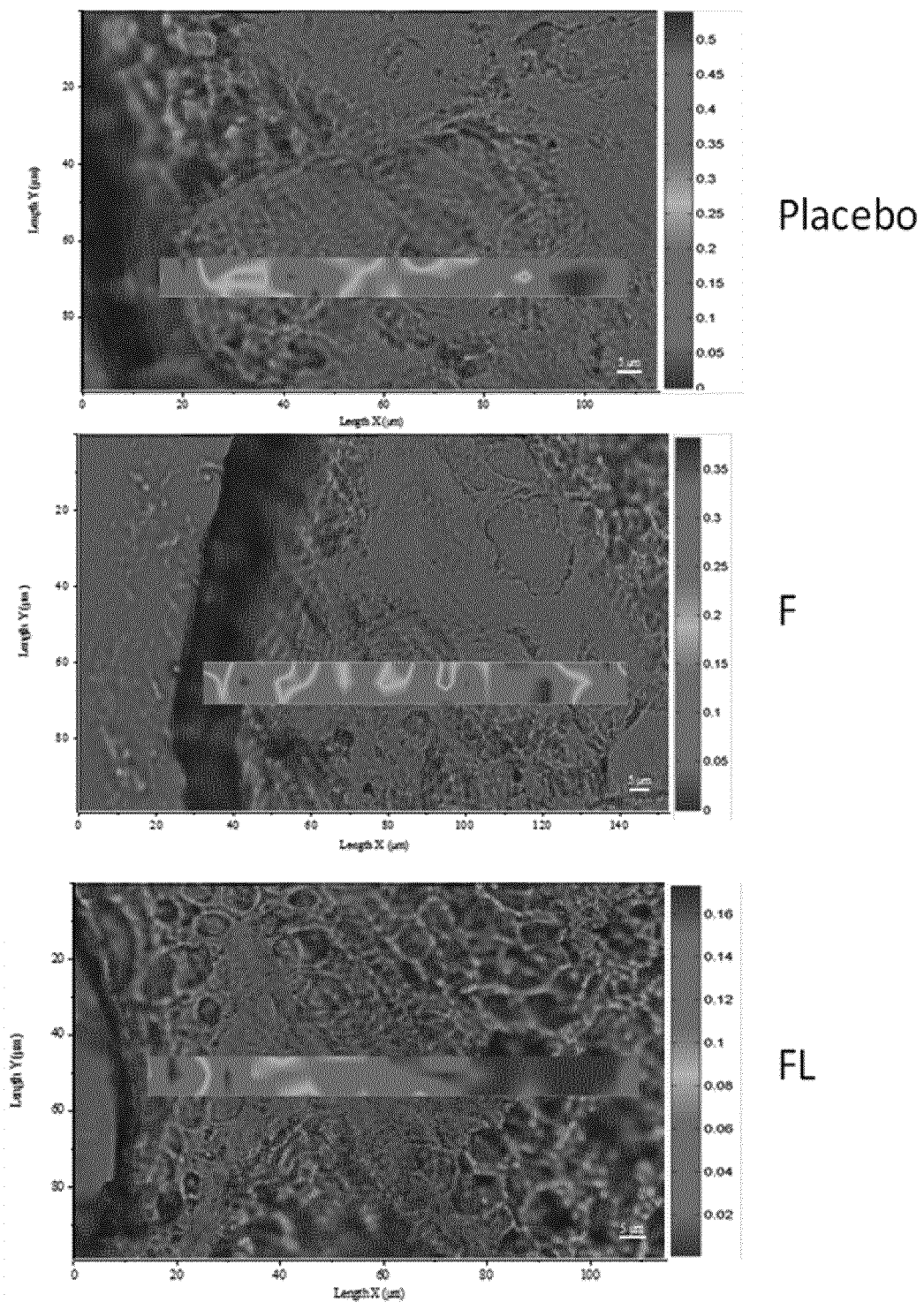


Figure 6

7/16

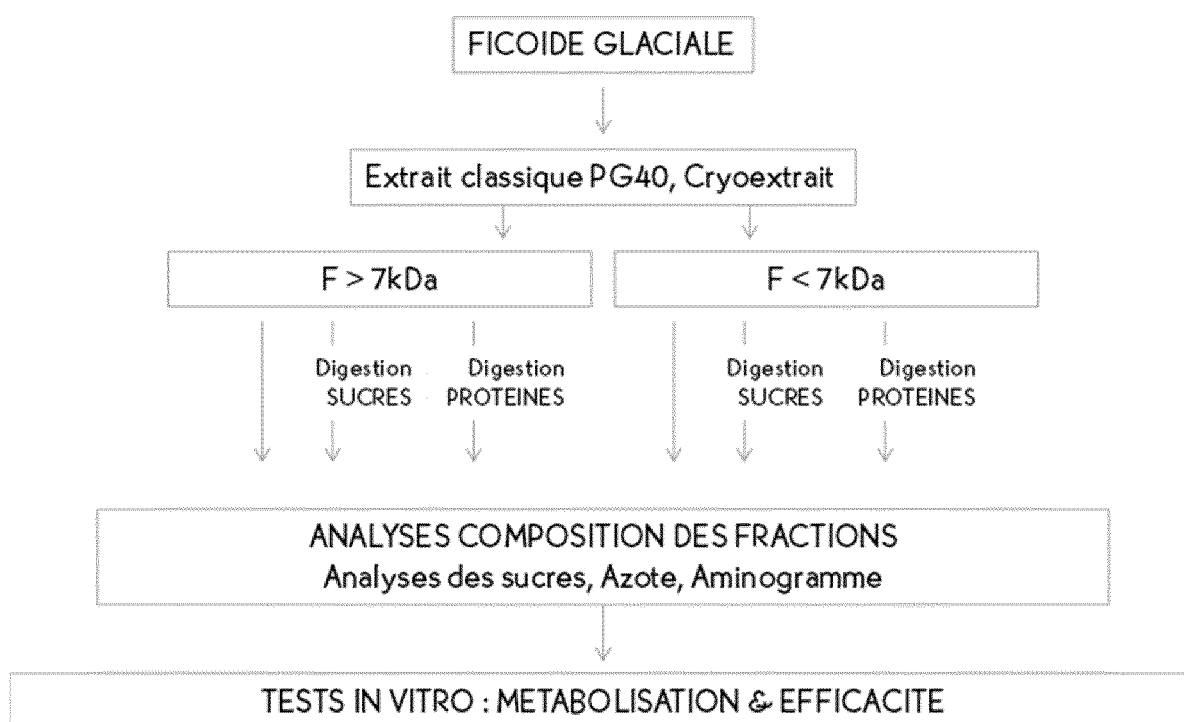


Figure 7

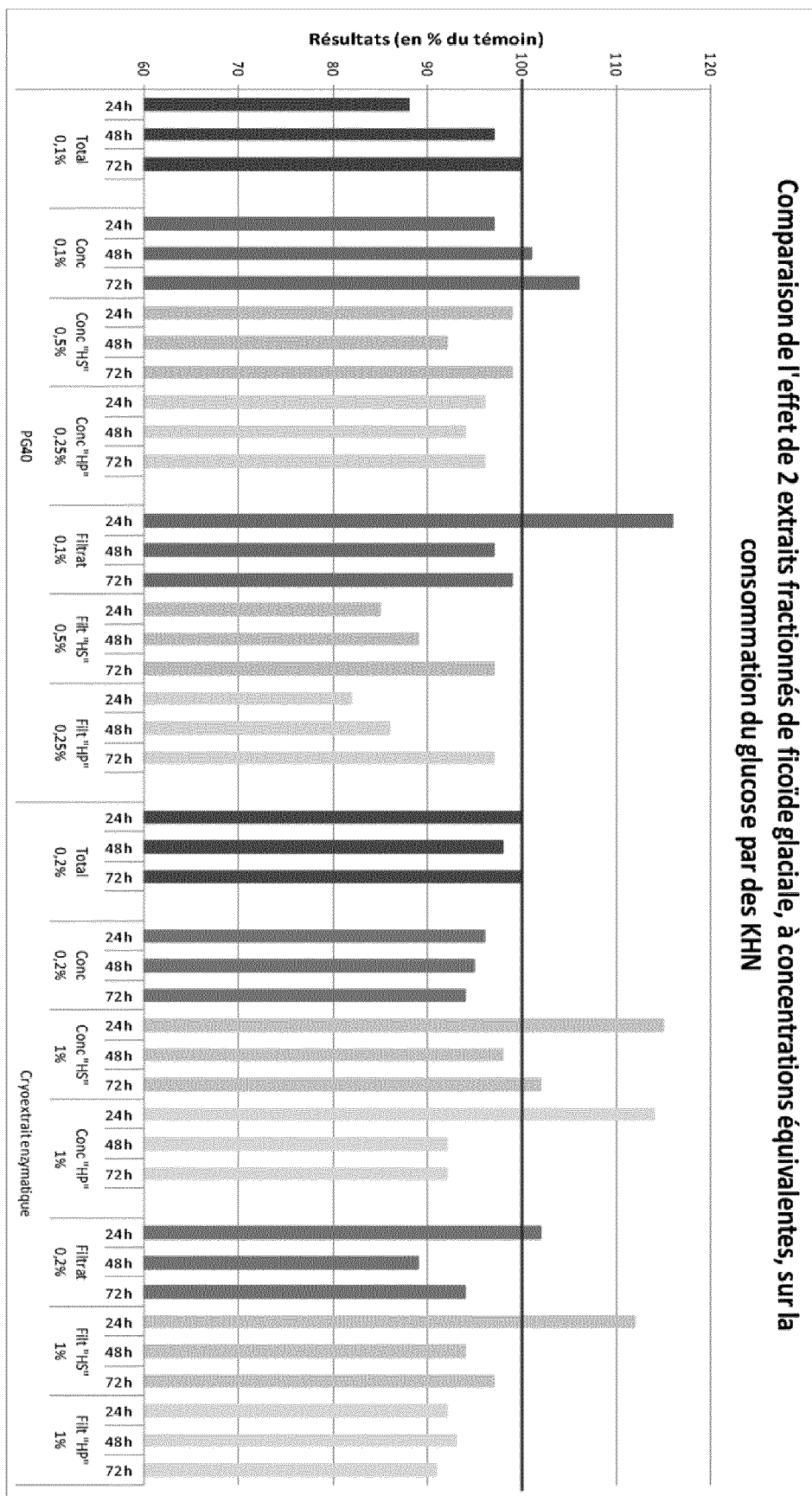


Figure 8

9/16

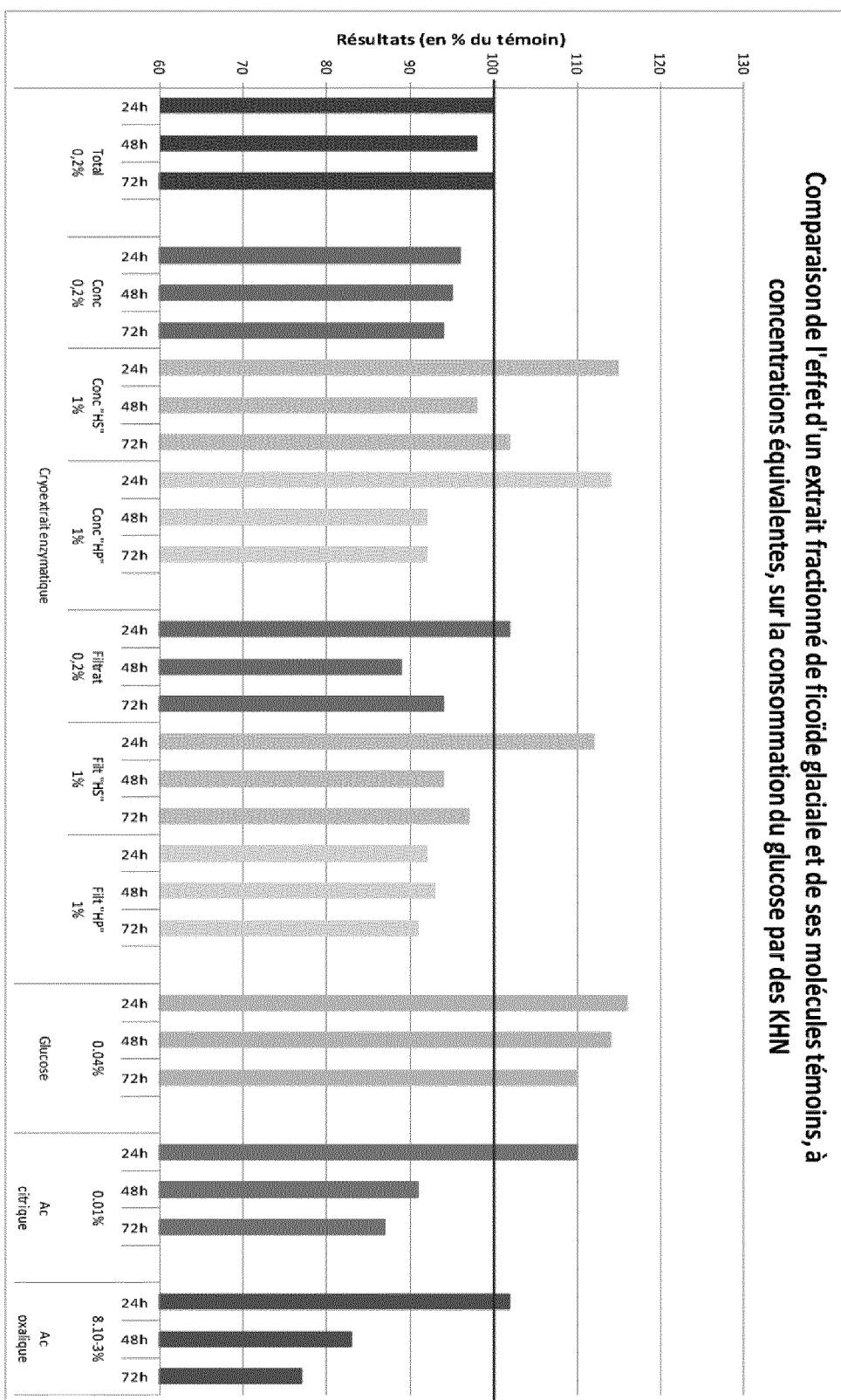
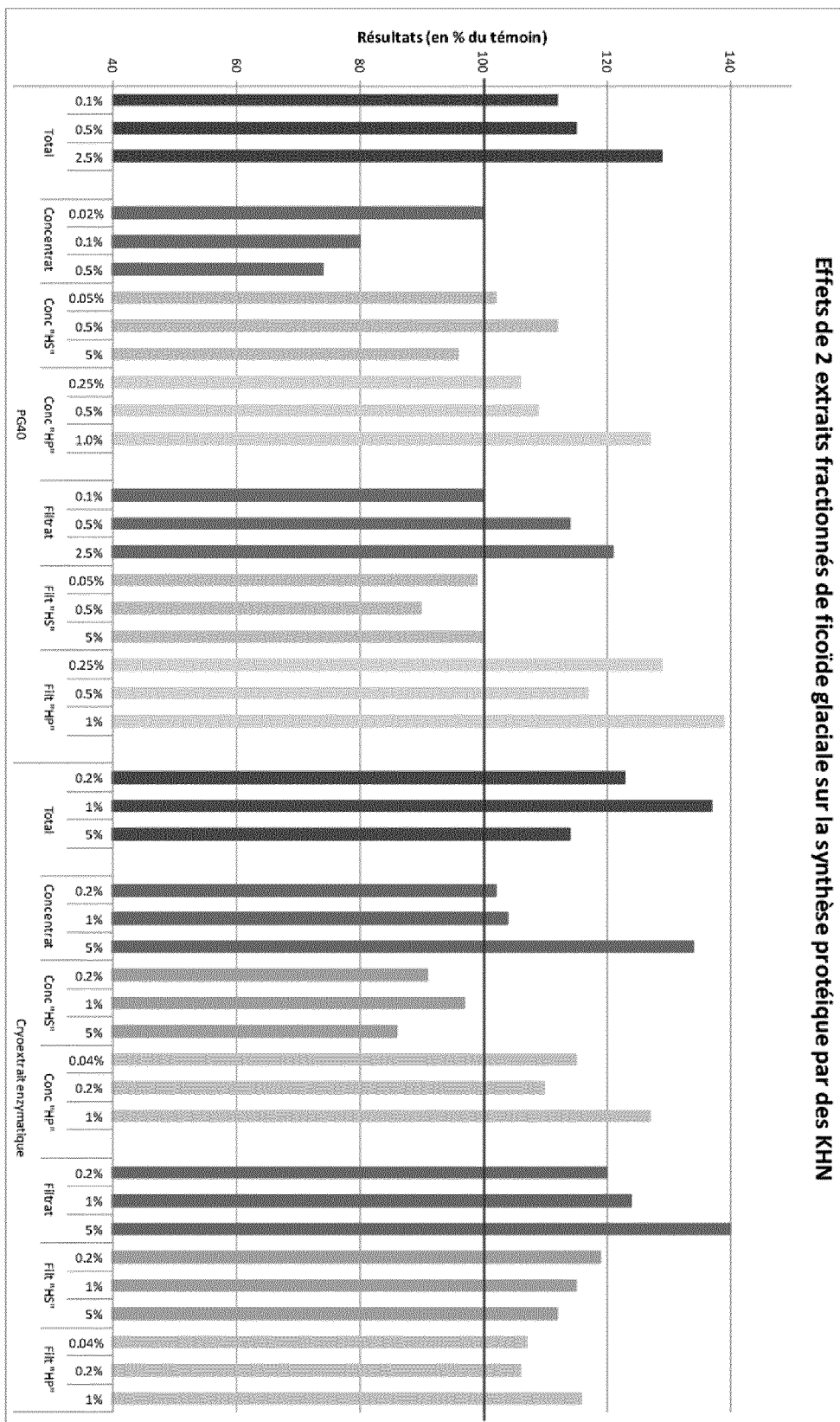


Figure 9



Effets de 2 extraits fractionnés de fucoïde glaciale sur la synthèse protéique par des KHN

Figure 10

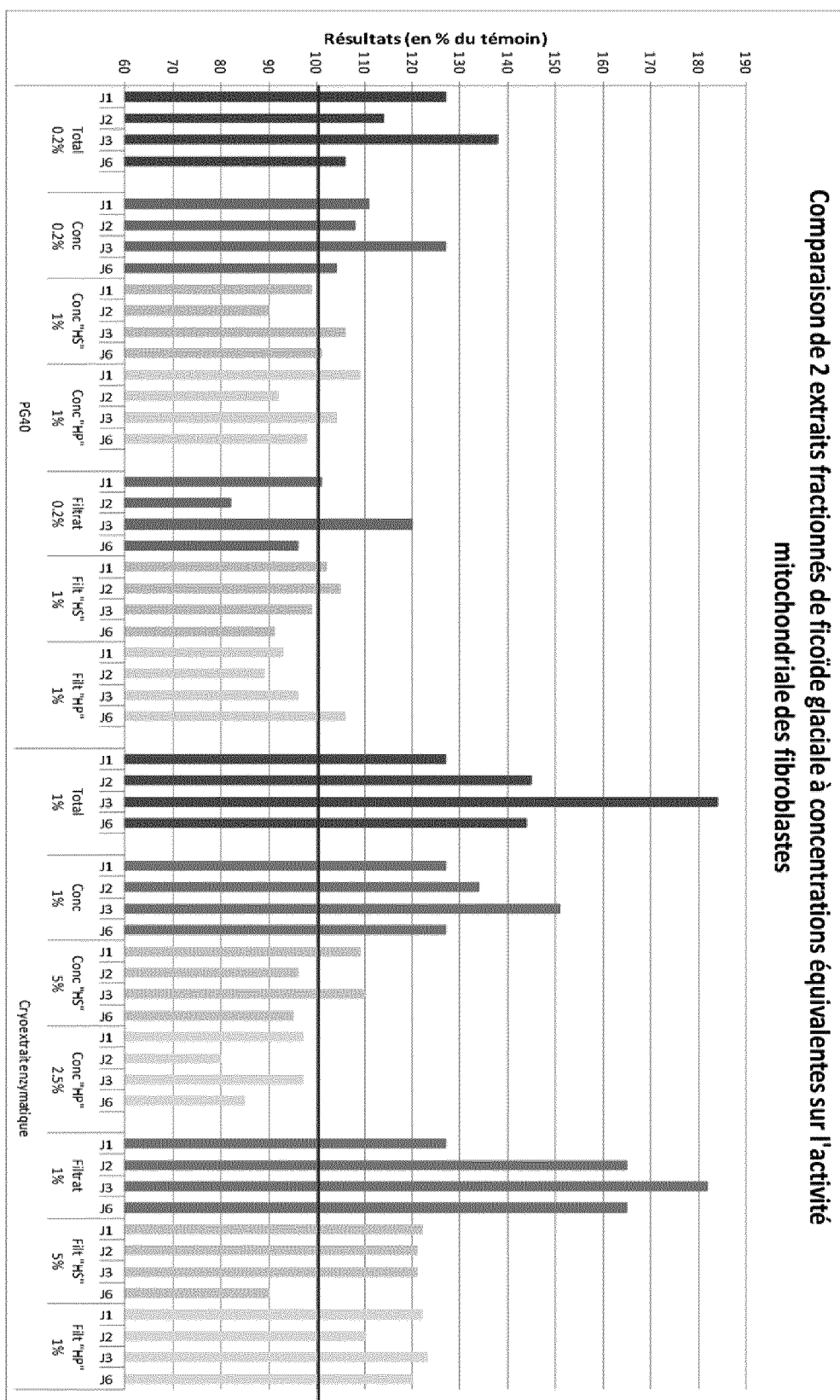


Figure 11

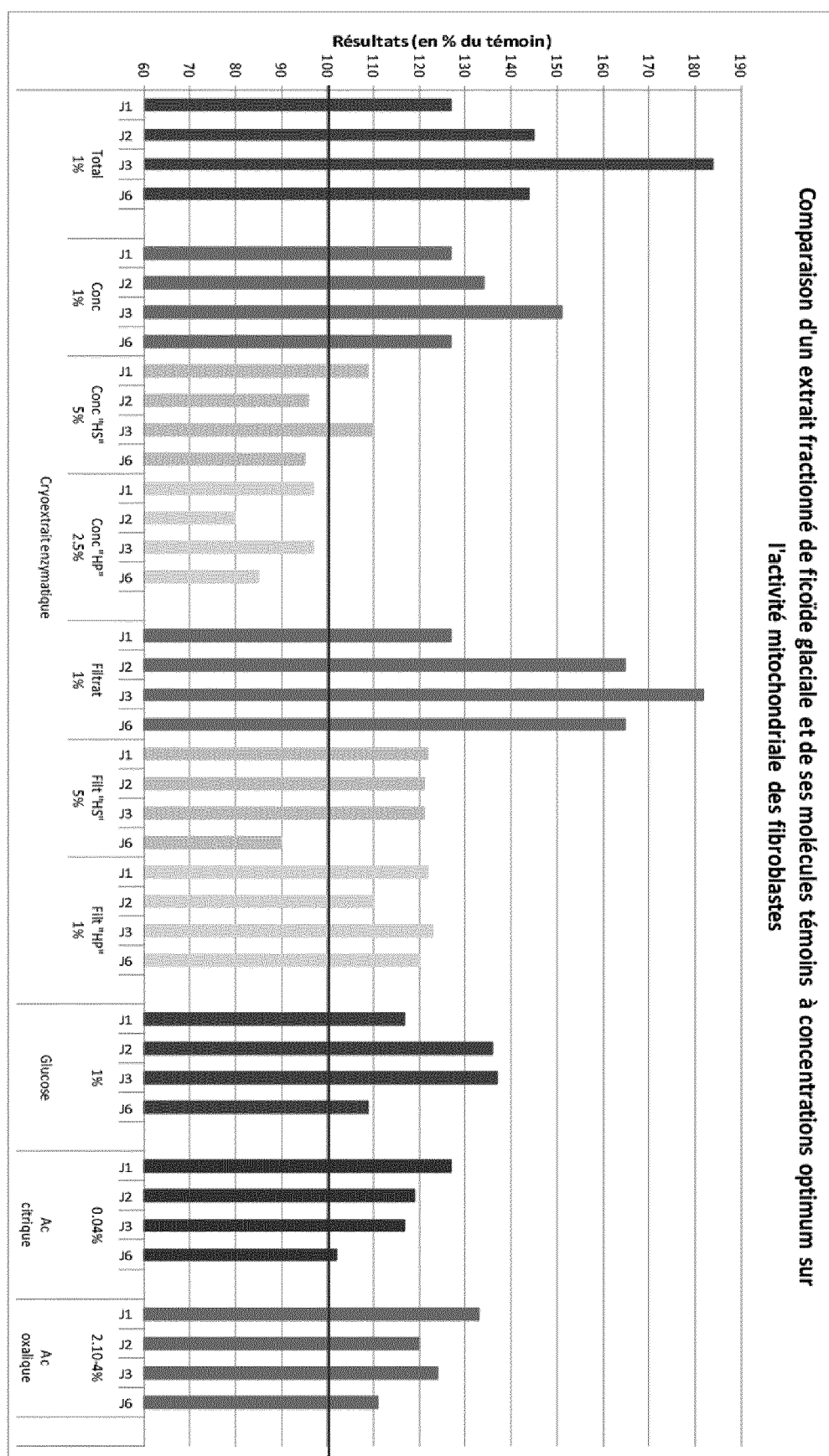


Figure 12

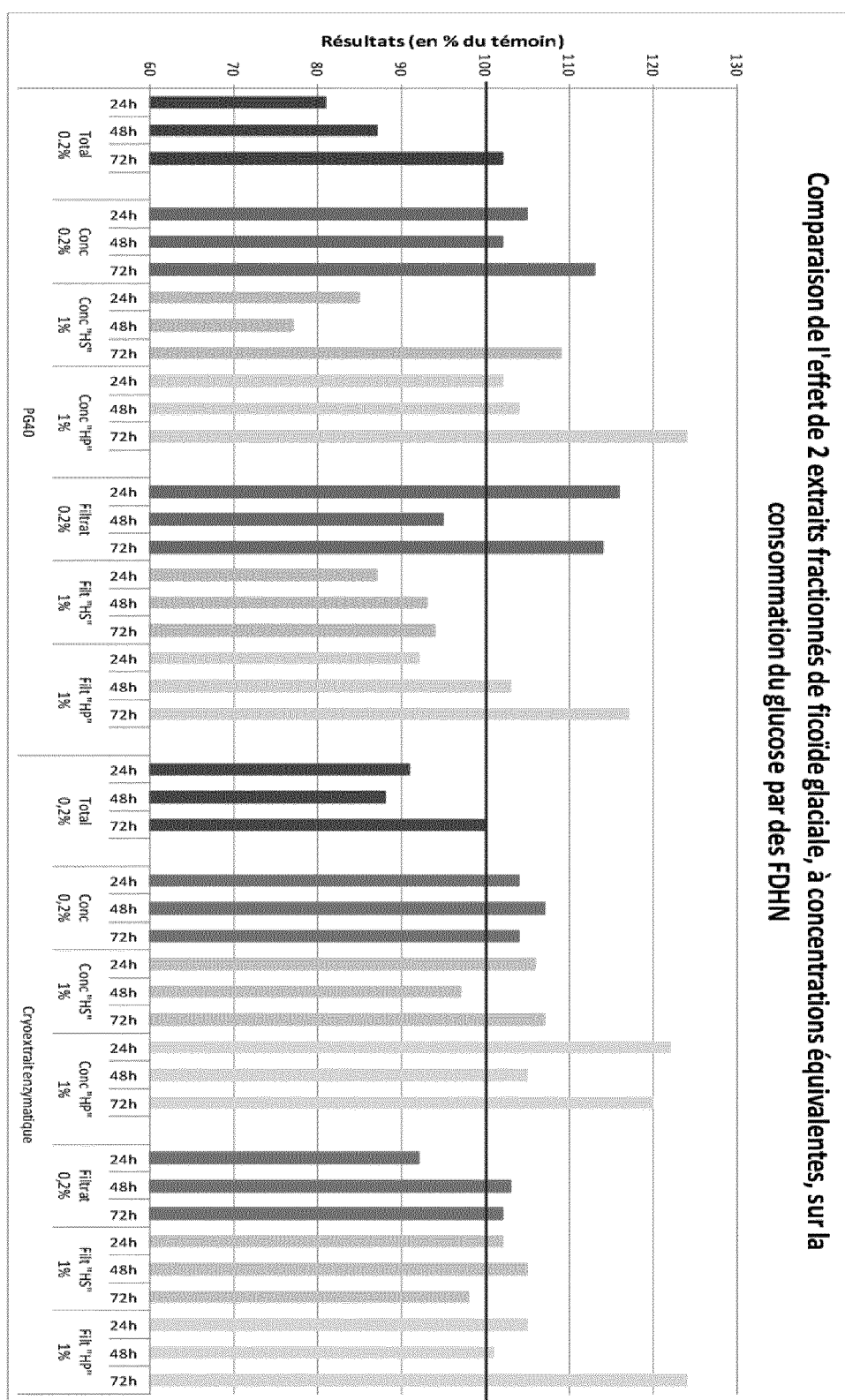


Figure 13

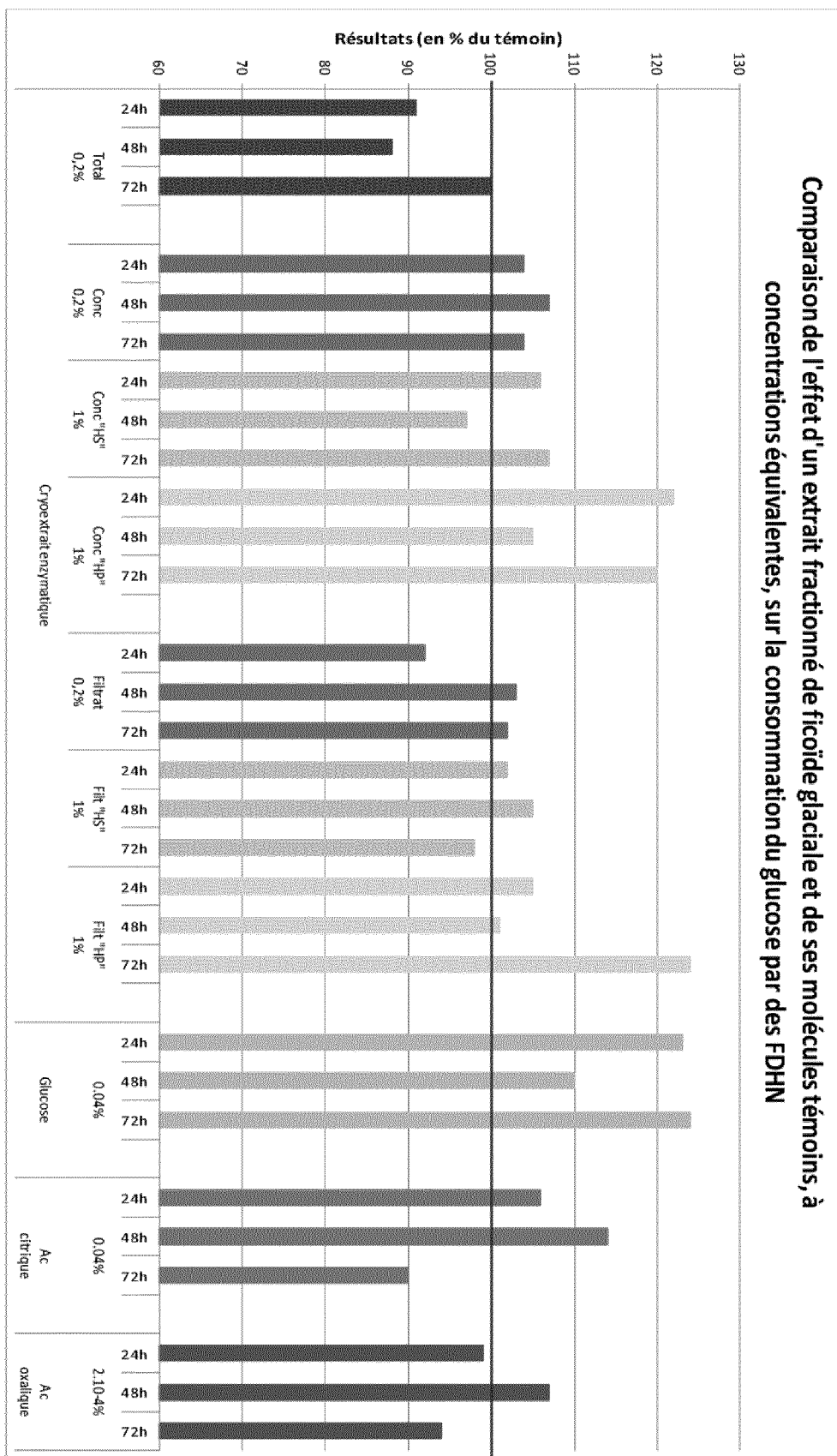
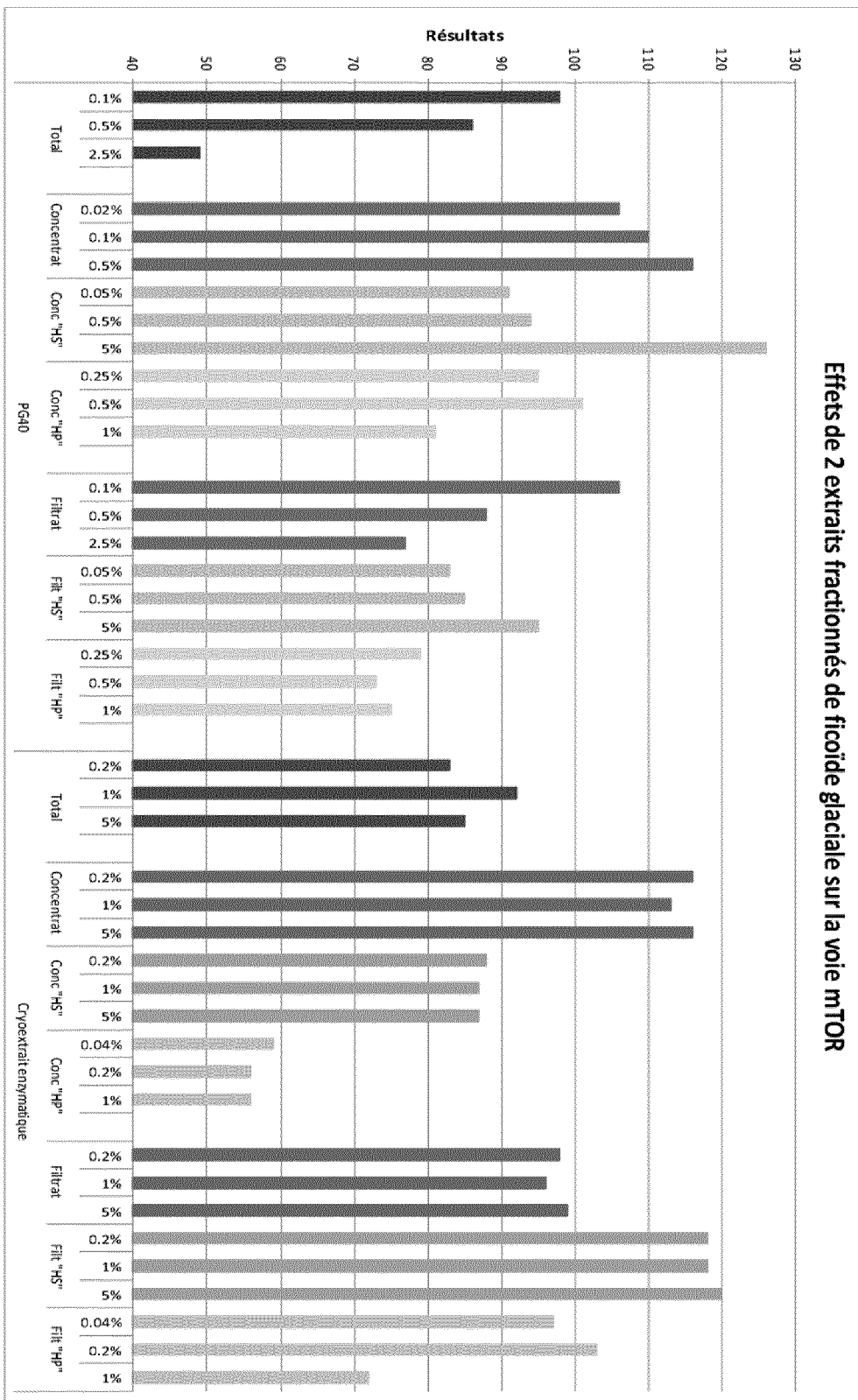


Figure 14



Effets de 2 extraits fractionnés de fucoïde glaciale sur la voie mTOR

Figure 15

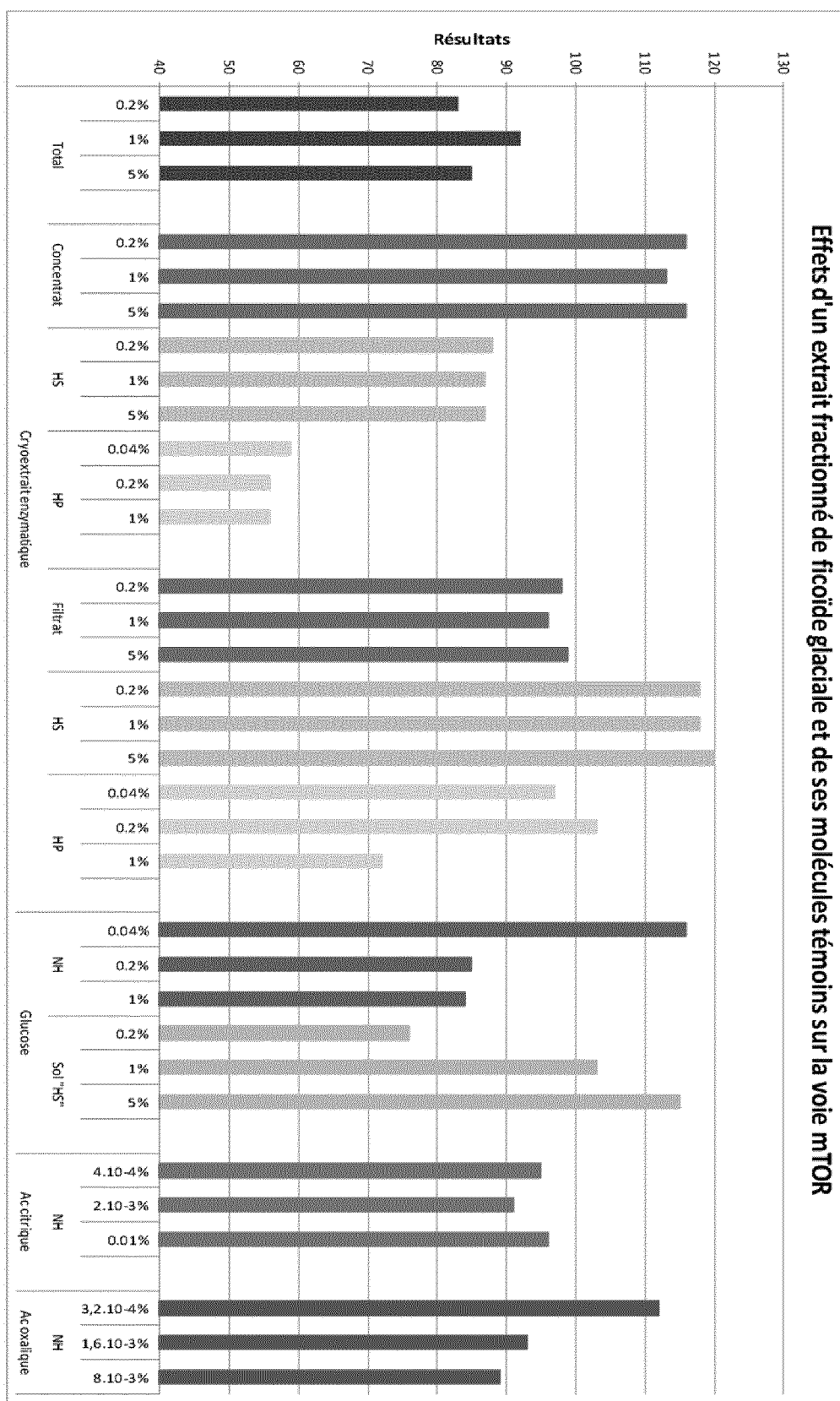


Figure 16



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

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

FA 809859
FR 1554428

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS | | Revendication(s) concernée(s) | Classement attribué à l'invention par l'INPI |
|---|---|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | | |
| X | <p>DATABASE GNPD [Online] MINTEL; mars 2016 (2016-03), Company Yves Rocher: "V-Shaping Mask", XP055259153, Database accession no. 3757939</p> | 1,4,5, 8-15 | A61K36/185 A61K8/97 A61P17/00 A61Q19/00 |
| Y | * le document en entier * | 1-15 | |
| X | <p>FR 2 940 112 A1 (ROCHER YVES BIOLOG VEGETALE [FR]) 25 juin 2010 (2010-06-25)</p> | 1,2,6-15 | |
| Y | * page 11, ligne 21 - ligne 24; revendications * | 1-15 | |
| X | <p>FR 2 949 682 A1 (ROCHER YVES BIOLOG VEGETALE [FR]) 11 mars 2011 (2011-03-11)</p> | 1,2,6-15 | |
| Y | * page 3, ligne 19 - ligne 23; revendications * * page 9, ligne 3 - ligne 6 * | 1-15 | |
| X | <p>DETERS A M ET AL: "Time-dependent bioactivity of preparations from cactus pear () and ice plant () on human skin fibroblasts and keratinocytes", JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 142, no. 2, 5 mai 2012 (2012-05-05), pages 438-444, XP028498443, ISSN: 0378-8741, DOI: 10.1016/J.JEP.2012.05.014 [extrait le 2012-05-14]</p> | 1,9-15 | <p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</p> <p>A61K</p> |
| Y | * abrégé; figures * | 1-15 | |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur | |
| 18 mars 2016 | | Langer, Astrid | |
| <p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> | | <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> | |

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 809859
FR 1554428

| 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 | ITO M ET AL: "Skin external preparation useful for improving rough skin, comprises Mesembryanthemum crystallinum extract", WPI / THOMSON,, vol. 2009, no. 13, 12 février 2009 (2009-02-12), XP002574225, * abrégé * | 1-15 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) |
| Y | EP 1 064 923 A1 (OREAL [FR]) 3 janvier 2001 (2001-01-03) * alinéa [0035]; exemple 1 * | 1-15 | |
| Y | EP 2 048 238 A2 (THIOMED [FR]) 15 avril 2009 (2009-04-15) * alinéa [0027]; revendications * | 1-15 | |
| Y | "Tincturae" In: "DAB 9-Kommentar", 1 janvier 1988 (1988-01-01), XP055259179, pages 3342-3343, * le document en entier * | 1-15 | |
| Y | WO 2005/110446 A1 (BRUNHAROTO AURITA RODRIGUES FL [BR]; BRUNHAROTO JR CLAUDINO [BR]; BRUN) 24 novembre 2005 (2005-11-24) * revendications; figures * | 1-15 | |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur | |
| 18 mars 2016 | | Langer, Astrid | |
| <p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> | | | |

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1554428 FA 809859**

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 **18-03-2016**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|----|------------------------|---|------------------------|
| FR 2940112 | A1 | 25-06-2010 | AUCUN | |
| ----- | | | | |
| FR 2949682 | A1 | 11-03-2011 | AUCUN | |
| ----- | | | | |
| EP 1064923 | A1 | 03-01-2001 | AU 745485 B2 | 21-03-2002 |
| | | | AU 4256000 A | 11-01-2001 |
| | | | BR 0002822 A | 13-03-2001 |
| | | | CA 2312433 A1 | 02-01-2001 |
| | | | CN 1292254 A | 25-04-2001 |
| | | | EP 1064923 A1 | 03-01-2001 |
| | | | FR 2795639 A1 | 05-01-2001 |
| | | | JP 2001058927 A | 06-03-2001 |
| | | | US 6406682 B1 | 18-06-2002 |
| ----- | | | | |
| EP 2048238 | A2 | 15-04-2009 | AT 542438 T | 15-02-2012 |
| | | | EP 2048238 A2 | 15-04-2009 |
| | | | ES 2383653 T3 | 25-06-2012 |
| | | | FR 2922221 A1 | 17-04-2009 |
| ----- | | | | |
| WO 2005110446 | A1 | 24-11-2005 | BR PI0401631 A | 06-12-2005 |
| | | | WO 2005110446 A1 | 24-11-2005 |
| ----- | | | | |