

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①1 N° de publication : **3 112 685**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **20 07834**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 36/185** (2019.12), A 61 K 8/97, A 61 P 17/00,
A 61 Q 19/00

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 EXTRAIT DE FLEURS DE BOMBAX COSTATUM RICHE EN POLYSACCHARIDES.

②2 Date de dépôt : 24.07.20.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 28.01.22 Bulletin 22/04.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 22.12.23 Bulletin 23/51.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : *LABORATOIRES EXPANSCIENCE
Société anonyme — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *LECLERE- BIENFAIT Sophie et
BREDIF Stéphanie.*

⑦3 Titulaire(s) : *LABORATOIRES EXPANSCIENCE
Société anonyme.*

⑦4 Mandataire(s) : *REGIMBEAU.*

FR 3 112 685 - B1



Description

Titre de l'invention : EXTRAIT DE FLEURS DE BOMBAX COSTATUM RICHE EN POLYSACCHARIDES

- [0001] L'invention se rapporte à un extrait de fleurs de *Bombax costatum*, ledit extrait étant riche en polysaccharides. L'invention porte également sur une composition cosmétique, pharmaceutique ou dermatologique comprenant un tel extrait. L'invention a également pour objet un procédé d'extraction d'un extrait de fleurs de *Bombax costatum* riche en polysaccharides, ainsi que l'extrait susceptible d'être obtenu par ledit procédé. L'invention concerne également une telle composition ou un tel extrait pour son utilisation dans la prévention ou le traitement des troubles ou pathologies de la peau, des muqueuses ou des phanères, et dans la prévention ou le traitement des troubles vasculaires. L'invention concerne enfin un procédé de soin cosmétique de la peau, des phanères ou des muqueuses, en vue d'améliorer leur état ou leur aspect, consistant à administrer une telle composition ou un tel extrait.
- [0002] BOMBAX COSTATUM
- [0003] Le *Bombax costatum*, appartient à la famille de bombacaceae (APG: Malvaceae). Le *Bombax costatum* est également appelé Bombax andrieui ou Bombax houardii. Le *Bombax costatum* est plus communément appelé Kapokier à fleurs rouges, fromager, kapokier rouge, faux kapokier, kapokier de forêt, Voaka (en langue Moré), ou Boumbou (en langue Jula).
- [0004] Bombax est un genre pantropical comprenant 8 espèces : 2 en Afrique, 5 en Asie, et 1 en Océanie, présente jusque dans les Îles Salomon. Autrefois, la délimitation du genre Bombax était bien plus large. *Bombax costatum* est parfois considéré comme conspécifique avec Bombax buonopozense.
- [0005] Usages de *Bombax costatum*
- [0006] D'une manière générale, en Afrique, le *Bombax costatum* est un arbre à usage alimentaire assez fréquent : les feuilles sont séchées et mangées comme celles du Baobab ; les fleurs, et notamment les calices, sont également consommées.
- [0007] Au Burkina Faso, l'écorce est utilisée pour colorer les dents en rouge. On récolte couramment les fleurs pour le calice charnu qui est cuisiné et consommé comme légume. Les feuilles aussi se consomment comme légume. Les fruits immatures et parfois les fleurs sont ajoutées comme épaississants dans les sauces. Les jeunes fruits immatures sont également utilisés dans la préparation d'une boisson. L'huile des graines est consommable. Les fleurs sont très appréciées comme mellifères.
- [0008] Plusieurs parties de l'arbre sont utilisées en médecine traditionnelle contre différentes maladies. La macération de la racine en poudre est consommée en sauce ou appliquée

comme bain contre l'épilepsie. On applique des préparations d'écorce sur les blessures pour favoriser la guérison.

- [0009] Au Sénégal et en Sierra Leone, des propriétés diurétiques sont attribuées à l'écorce de tige et de racine.
- [0010] L'écorce est également utilisée pour préparer un médicament contre la trichomonase, l'amibiase et d'autres formes de dysenterie. Un bain dans un extrait d'écorce de tige se prend contre l'aliénation mentale. La poudre d'écorce de tige entre dans la composition d'un médicament appliqué en fumigation contre les maux de tête. Pour traiter les maux de tête ou les maux de dents, une compresse d'écorce peut être fixée sur la tête.
- [0011] Les feuilles sont prescrites avec d'autres plantes médicinales pour traiter la leucorrhée et la diarrhée. Un extrait de feuilles broyées est absorbé comme boisson contre les problèmes pendant l'accouchement. Un bain dans un extrait de feuilles broyées se prend de manière répétée contre les convulsions. On absorbe une tisane de feuilles séchées ou on l'applique sur le corps contre la rougeole. La décoction de feuilles et d'écorce de tige ou de racine est absorbée comme boisson dans les cas d'œdèmes graves. On boit la décoction de feuilles et de jeunes rameaux pour traiter la jaunisse. La décoction de feuilles est également donnée à boire aux enfants contre le rachitisme.
- [0012] Différentes parties de la plante sont utilisées pour favoriser la lactation et comme tonique contre la fatigue. On frictionne la peau avec des feuilles mélangées à du beurre de karité contre la lèpre.
- [0013] Au Mali, la décoction de l'écorce et des feuilles et de parties d'autres plantes se prend contre les troubles de la menstruation. Les feuilles sont émollientes et un bain chaud dans une décoction de feuilles peut être prescrit aux patients fiévreux, en particulier les enfants. Les feuilles entrent également dans les traitements de l'ankylostome et les fleurs dans ceux contre le ténia.
- [0014] Toutes ces données ont été tirées du rapport ethnobotanique rédigé par le Dr. Lassina SANOU, Colonel des Eaux et Forêts. Il travaille pour le Ministère de l'Environnement et du Développement Durable au Centre National des Semences Forestières (CNRS) du Burkina Faso, basé à Ouagadougou (décembre 2014).
- [0015] LES POLYSACCHARIDES
- [0016] Les polysides ou polysaccharides ou glycannes sont arbitrairement définis comme des polymères de haut poids moléculaire résultant de la condensation d'un grand nombre d'oses ou sucres. Ils participent sous différents aspects à la vie voire survie des végétaux. A titre d'exemples, ils sont responsables de la rigidité des parois cellulaires des végétaux supérieurs (celluloses, hémi-cellulose, lignines ..), ce sont des formes de stockage de l'énergie (amidon) et peuvent protéger des tissus contre la déshydratation du fait de leur pouvoir hydrophile ...

- [0017] On distingue :
- [0018] - Les polysaccharides homogènes (condensation d'un même ose) ; et
- [0019] - Les polysaccharides hétérogènes (hexoses, pentoses, éther d'oses...),
- [0020] et les 2 catégories pouvant être linéaires ou ramifiées.
- [0021] LE MICROBIOTE et LE MICROBIOME
- [0022] Le microbiote cutané est l'ensemble des micro-organismes (bactéries, virus, champignons...) résidant sur et dans la peau. Le microbiote est présent jusque dans le derme et tissu adipeux et glandes eccrines (Nakatsuji et al 2013). Le microbiote ne doit pas être confondu avec le microbiome qui est l'ensemble des gènes (génomome des bactéries).
- [0023] Il existe 2 grands types de flores :
- [0024] - la flore résidente composée de germes commensaux vivant aux dépens de leur hôte sans causer de dommages ; et
- [0025] - la flore transitoire composée de germes saprophytes (inoffensifs) et pathogènes opportunistes.
- [0026] Au niveau de la peau, il existe 10¹² cellules bactériennes (10⁶/cm²) pour 3.10¹⁰ cellules humaines (ratio 33:1 vs système gastro-intestinal : ratio 25:1) ; 500 germes différents ; 1 flore résidente ou transitoire ; et 4 Phyla prédominants.
- [0027] Il existe de nombreuses interactions peau / microbiote :
- [0028] - Des phénomènes de symbiose : la peau représente une niche environnementale, un réservoir en nutriments pour certaines bactéries.
- [0029] Les bactéries peuvent stimuler les défenses immunitaires ; et la peau en réponse peut développer un véritable bouclier anti-microbien qui permet d'inhiber la croissance des pathogènes, et de stimuler la production de molécules anti-microbiennes, ce qui contribue au maintien d'un bon état de santé de la peau. Mais en fonction du contexte, une même bactérie peut être symbiotique ou pathobiontique. Les symbiotes amènent une inflammation physiologique, la protection de la barrière, une surveillance/tolérance (PAMs) par la peau et son immunité innée, une absence de virulence, et une sequestration des TLRs (récepteurs de type Toll). Les symbiotes vivent en biofilms. Il survient parfois pour différentes raisons intrinsèques et/ou environnementales, une perte de contrôle de ces symbiotes qui deviennent alors des pathobiontes. Les facteurs de virulence du microbiote augmentent, ainsi que les phénomènes inflammatoires et l'activation du système immunitaire. Les bactéries commensales sont parfois éradiquées.
- [0030] Dans des conditions, dites normales cutanées, l'immunité de l'hôte maintient l'équilibre du microbiote. Une déficience du système immunitaire amène à une dysbiose et à des pathologies cutanées particulières : dermatite atopique, acné, psoriasis. On voit augmenter la colonisation de la peau par *P. acnes* pendant l'acné, par

Staphylococcus aureus pendant la dermatite atopique, par la famille des *Firmicutes* lors du psoriasis (et diminution des actinobactéries), par *Malassezia furfur* lors de la dermatite séborrhéique.

[0031] DESCRIPTION DE L'INVENTION

[0032] La Demanderesse a découvert que les extraits de fleurs de *Bombax costatum*, de préférence de calices de *Bombax costatum*, présentent des propriétés cosmétiques et dermatologiques jamais décrites jusqu'à présent.

[0033] L'invention a pour objet un extrait riche en polysaccharides de fleurs de *Bombax costatum*, de préférence de calices de *Bombax costatum*.

[0034] En botanique, la fleur est la partie de la plante comprenant, de l'extérieur vers l'intérieur, lorsqu'elle est complète :

[0035] - le calice, formé par l'ensemble des sépales ;

[0036] - la corolle, formée par l'ensemble des pétales ;

[0037] - l'androcée, c'est-à-dire l'ensemble des étamines (partie mâle), qui produit le pollen ;
et

[0038] - le gynécée ou pistil, formé par l'ensemble des carpelles (partie femelle).

[0039] Dans la cadre de la présente invention, le terme « fleur » comprend au moins la corolle et le calice. La fleur peut également être complète, c'est-à-dire comprendre le calice, la corolle, l'androcée, et le gynécée ou pistil.

[0040] L'extrait selon l'invention est de préférence un extrait de calices de *Bombax costatum*.

[0041] Par « extrait riche en polysaccharides », on entend un extrait comprenant majoritairement ou essentiellement des polysaccharides, c'est-à-dire que les composés majoritaires sont des polysaccharides.

[0042] L'extrait selon l'invention comprend ainsi avantageusement au moins 15 % en poids de polysaccharides, plus avantageusement au moins 20 % en poids, de préférence au moins 30 % en poids, plus avantageusement au moins 50 % en poids, par rapport au poids total de l'extrait sec. L'extrait selon l'invention comprend ainsi avantageusement de 15 % à 65 % en poids de polysaccharides, plus avantageusement de 20% à 65 % en poids, de préférence de 30 % à 65 % en poids, plus avantageusement de 50 % à 65 % en poids, par rapport au poids total de l'extrait sec. Les pourcentages sont exprimés par rapport au poids total dudit extrait sec (avant ajout éventuel d'un support de séchage) et le dosage est réalisé selon la méthode au phénol sulfurique (méthode de Dubois) ou selon la méthode à l'antrone – dosage spectro-colorimétrique des sucres totaux.

[0043] Selon la présente invention, les polysaccharides présents dans l'extrait ont une masse moléculaire apparente comprise entre 1500 kDa et 6000 kDa, avantageusement entre 3000 kDa et 6000 kDa (détermination par Chromatographie Phase Gazeuse).

[0044] Avantageusement, les polysaccharides de l'extrait selon l'invention comprennent les

monosaccharides et dérivés choisis dans le groupe constitué du galactose, du rhamnose, de l'acide galacturonique, de l'acide glucuronique, et leurs mélanges. Dans le cadre de la présente invention, on entend par galactose le D-galactose et le L-galactose. De même, on entend par rhamnose, le D-rhamnose et le L-rhamnose.

- [0045] Avantageusement, les polysaccharides de l'extrait selon l'invention comprennent un mélange de galactose, rhamnose, d'acide galacturonique, et d'acide glucuronique.
- [0046] Avantageusement, les polysaccharides de l'extrait selon l'invention comprennent (% en poids par rapport au poids total de tous les sucres (monosaccharides) présents) :
- [0047] - De 10 % à 16 % de Galactose ;
- [0048] - De 10 % à 17% de Rhamnose ;
- [0049] - De 10 % à 17% d'acide galacturonique ; et
- [0050] - De 3 % à 7 % d'acide glucuronique.
- [0051] Dans le cadre de la présente invention, l'extrait riche en polysaccharides décrit ci-dessus est avantageusement obtenu par extraction solide/liquide des fleurs, de préférence des calices, de *Bombax costatum*, dans l'eau. Les polysaccharides pourront ensuite être purifiés et/ou re-solubilisés dans un solvant adéquat afin de garantir leur stabilité physique et microbiologique ou séchés par les procédés connus de l'Homme de l'art.
- [0052] L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un extrait riche en polysaccharides de fleurs, de préférence de calices, de *Bombax costatum*, comprenant au moins une étape d'extraction solide/liquide dans l'eau et dans les conditions optimales de pH, durée et de température, connues de l'homme de l'art.
- [0053] Avantageusement selon l'invention, le procédé de préparation d'un extrait riche en polysaccharides de fleurs, de préférence de calices de *Bombax costatum*, comprend les étapes successives suivantes :
- [0054] a) broyage des fleurs, notamment des calices, de *Bombax costatum* ;
- [0055] b) extraction des fleurs, notamment des calices, broyées dans l'eau dans des conditions optimales de durée, pH et température ;
- [0056] c) séparation de la phase solide et de la phase liquide par décantation, et/ou centrifugation et/ou précipitation et/ou filtrations successives ; et
- [0057] d) éventuellement, étape de décoloration de la phase liquide grâce à un adjuvant adapté ;
- [0058] e) éventuellement, séchage de l'extrait obtenu à l'étape c) ou d) ; et
- [0059] f) éventuellement, stabilisation des polysaccharides en milieu liquide dans un solvant adapté à la préservation des propriétés physico-chimiques de l'extrait et au contrôle des développements microbiens.
- [0060] Avantageusement selon l'invention, le procédé de préparation d'un extrait riche en polysaccharides de fleurs, de préférence de calices, de *Bombax costatum*, comprend les

étapes successives suivantes :

- [0061] a) broyage des fleurs, notamment des calices, de *Bombax costatum* ;
- [0062] b) extraction des fleurs, en particulier des calices, broyées dans l'eau ;
- [0063] c) séparation de la phase solide et de la phase liquide par décantation, et/ou centrifugation et/ou précipitation et/ou filtrations successives ;
- [0064] d) éventuellement, étape de décoloration de la phase liquide grâce à un adjuvant adapté ;
- [0065] e) éventuellement, séchage de l'extrait obtenu à l'étape c) ou d) ; et
- [0066] f) éventuellement, stabilisation physique et microbiologique de l'extrait obtenu à l'étape c), d) ou e).
- [0067] L'étape a) de broyage de la plante peut être réalisée par des méthodes connues de l'homme du métier, notamment à l'aide d'un broyeur à couteaux ou d'un broyeur à marteaux.
- [0068] L'étape b) d'extraction est réalisée de préférence en présence d'eau. Le pourcentage de plante broyée introduite dans l'eau est avantageusement compris entre 2 % et 10% p/p et de préférence entre 2 % à 5% p/p, plus avantageusement 2% p/p. Cette extraction solide/liquide est réalisée de préférence à une température comprise entre 20°C et 100°C, en particulier entre 50°C et 90 °C, plus particulièrement entre 70°C et 90°C, typiquement 90°C.
- [0069] La durée d'extraction est avantageusement comprise entre 30 minutes et 4h, en particulier entre 1h et 3h, avantageusement elle est d'environ 1 heure.
- [0070] L'étape c) de séparation de la phase solide et de la phase liquide est réalisée par des méthodes connues de l'homme du métier, notamment par décantation, centrifugation et/ou filtrations successives et/ou purification par précipitation des polysaccharides à l'aide d'un solvant approprié et de préférence l'éthanol ou d'une solution saline. En particulier, durant l'étape c), la phase liquide obtenue est avantageusement purifiée et concentrée par exemple par ultrafiltration et/ou filtration stérilisante. L'étape c) est effectuée jusqu'à obtenir une phase liquide présentant une parfaite limpidité et une propreté microbiologique de degré inférieur ou égal à 100 UFC/g en germe totaux.
- [0071] Lorsque l'étape d) de décoloration de la phase liquide est réalisée, celle-ci se fait par des méthodes connues de l'homme du métier, notamment par ajout d'un adjuvant tel que le charbon actif ou des terres décolorantes appropriées et connues de l'homme du métier.
- [0072] Avantageusement, l'extrait riche en polysaccharides selon l'invention peut être stabilisé par une étape de séchage e), par des procédés connus de l'homme de l'art.
- [0073] L'étape e) de séchage peut, par exemple, être réalisée en présence d'un support de type maltodextrines ou fibres d'acacia (Fibregum® société CNI). La teneur en support varie typiquement selon un ratio allant de 0% à 80% de support par rapport au

pourcentage de matière sèche obtenu dans la forme liquide de l'extrait.

- [0074] L'extrait est préférentiellement séché par lyophilisation ou atomisation afin d'obtenir une poudre finale.
- [0075] L'étape f) de stabilisation physique et microbiologique du produit obtenu à l'étape c), d) ou e) est avantageusement effectuée par élimination partielle de l'eau et remplacement par un solvant avantageusement choisi parmi la glycérine végétale, les glycols, et leurs mélanges, en particulier parmi la glycérine végétale, les glycols d'origine végétale et leurs mélanges, plus particulièrement parmi un propanediol ou le propylène glycol, notamment le 1,3-propanediol, et la glycérine végétale. Avantageusement, l'étape f) est réalisée en phase liquide par réduction de la quantité d'eau par évaporation jusqu'à moins de 50% en poids et préférentiellement moins de 20% en poids, par rapport à la masse totale de l'extrait et substitution par un solvant bactériostatique ou bactéricide choisi parmi la glycérine végétale, les glycols, et leurs mélanges, en particulier parmi la glycérine végétale, les glycols d'origine végétale et leurs mélanges, plus particulièrement parmi un propanediol ou le propylène glycol, notamment le 1,3-propanediol, et la glycérine végétale. Le ratio eau/solvant sera alors avantageusement compris entre les ratios 50/50 et 0/100 (p/p) et préférentiellement entre 30/70 (p/p) et 10/90 (p/p) et avantageusement 20/80 (p/p).
- [0076] Préférentiellement, à titre d'exemple, l'extrait riche en polysaccharides selon l'invention peut être obtenu selon le procédé suivant :
- [0077] a') Mise en solution de la fleur broyée à 2% (p/p) dans l'eau
- [0078] b') Extraction sous agitation pendant 1h à 90°C ;
- [0079] c') Purification par étapes de filtrations successives ;
- [0080] d') Filtration stérile ; et
- [0081] e') Stabilisation de l'extrait obtenu par évaporation de l'eau et ajout de glycérine pour obtenir un ratio eau/glycérine compris entre 50/50 et 0/100, avantageusement entre 30/70 et 10/90.
- [0082] Dans la suite de la description, on parlera d'« extrait selon l'invention » pour désigner l'extrait en tant que tel, tel que défini ci-dessus, ou l'extrait susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention tel que décrit ci-dessus. L'extrait susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention tel que décrit ci-dessus présente la même composition que l'extrait selon l'invention en tant que tel, tel que défini ci-dessus.
- [0083] L'invention a également pour objet une composition comprenant un extrait riche en polysaccharides de fleurs, de préférence de calices, de *Bombax costatum* selon l'invention et un mélange eau/solvant dans un ratio eau/solvant (v/v) compris entre 50/50 et 0/100, avantageusement entre 30/70 et 10/90, plus avantageusement 20/80, ledit solvant étant choisi parmi les glycols, la glycérine végétale et leurs mélanges, de préférence parmi les glycols d'origine végétale et la glycérine végétale, et préféren-

tiellement parmi le 1,3-propanediol et la glycérine végétale.

- [0084] Avantageusement, la composition comprend de 0.001 à 30 % en poids, avantageusement 0.001 % à 10 % en poids, d'un extrait selon l'invention (exprimés en poids d'extrait sec par rapport au poids total de la composition) et entre 50 % et 99.999 % en poids, avantageusement entre 70 % et 99.999 % en poids, d'un mélange eau/solvant, par rapport au poids total de la composition, le ratio eau/solvant étant compris entre 50/50 et 0/100, avantageusement entre 30/70 et 10/90, plus avantageusement 20/80, et le solvant étant choisi parmi les glycols, la glycérine végétale et leurs mélanges, de préférence parmi les glycols d'origine végétale et la glycérine végétale, et préférentiellement parmi le 1,3-propanediol et la glycérine végétale. Selon cet aspect de l'invention, le solvant est en quantité efficace pour une action de stabilisation physique et microbiologique de la composition selon l'invention et notamment de l'extrait selon l'invention.
- [0085] L'invention a également pour objet une composition comprenant un extrait riche en polysaccharides de fleurs, de préférence de calices, de *Bombax costatum* selon l'invention, en tant que principe actif, et le cas échéant un excipient approprié. L'extrait selon l'invention est tel que défini dans les paragraphes ci-dessus concernant l'extrait en tant que tel et ceux concernant l'extrait susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention.
- [0086] La composition est avantageusement cosmétique, pharmaceutique ou dermatologique. Ladite composition est de préférence formulée pour être administrée par voie topique externe.
- [0087] Avantageusement, la composition selon l'invention comprend de 0,001 à 10 %, typiquement de 0,01 à 5 %, en poids d'extrait selon l'invention, le poids de l'extrait étant exprimé en extrait sec, par rapport au poids total de la composition.
- [0088] La composition selon l'invention peut comprendre en outre un ou plusieurs autres principes actifs.
- [0089] La composition selon l'invention peut être formulée sous la forme de différentes préparations adaptées à une administration topique et incluent notamment les crèmes, les émulsions, les laits, les pommades, les lotions, les huiles, les solutions aqueuses ou hydro-alcooliques ou glycoliques, les poudres, les patchs, les sprays, les shampooings, les vernis ou tout autre produit pour application externe.
- [0090] Selon sa nature (cosmétique, pharmaceutique ou dermatologique), la composition selon l'invention peut en outre comprendre au moins un excipient cosmétiquement, pharmaceutiquement ou dermatologiquement acceptable. Notamment, la composition selon la présente invention peut en outre comprendre au moins un adjuvant cosmétiquement, pharmaceutiquement ou dermatologiquement connu de l'homme du métier, en particulier choisi parmi les tensioactifs, les épaississants, les conservateurs, les

parfums, les colorants, des filtres chimiques ou minéraux, les agents hydratants, et les eaux thermales. L'homme du métier sait adapter la formulation de la composition selon l'invention en utilisant ses connaissances générales.

- [0091] Les posologies et les formes galéniques optimales des compositions selon l'invention peuvent être déterminées selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement pharmacologique, dermatologique ou cosmétique adapté à un patient ou à un animal, comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient ou de l'animal, la gravité de son état général, la tolérance au traitement, les effets secondaires constatés, le type de peau.
- [0092] L'invention a aussi pour objet un extrait selon l'invention ou une composition selon l'invention pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter les troubles ou pathologies de la peau et/ou des muqueuses (gencives, parodontes, muqueuses génitales) et/ou des phanères (cheveux et ongles) immature(s), normale(s) ou mature(s)/âgée(s), en particulier les réactions inflammatoires, les réactions d'oxydation, les désordres liés à des attaques radicalaires liées ou non à la pollution, les troubles ou pathologies liées aux attaques microbiennes, les troubles de la barrière ou de l'homéostasie, le vieillissement, notamment le vieillissement chronologique et/ou actinique, les troubles ou pathologies liées aux agressions mécaniques et/ou thermiques de la peau et/ou des muqueuse et/ou des phanères ; plus avantageusement les réactions ou pathologies inflammatoires, irritatives ou les troubles de la barrière ou de l'homéostasie de la peau, des phanères et/ou des muqueuses (gencives, parodontes, muqueuses génitales) immature(s), normale(s) ou mature(s)/âgée(s).
- [0093] L'invention a aussi pour objet un extrait selon l'invention ou une composition selon l'invention pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter les déséquilibres et/ou les troubles liés au déséquilibre du microbiote de la peau et/ou des muqueuses (gencives, parodontes, muqueuses génitales) et/ou des phanères et/ou leurs annexes, immature(s), normale(s) ou mature(s)/âgée(s).
- [0094] En effet, l'extrait selon l'invention présente une activité protectrice de la peau et/ou des muqueuses (gencives, parodontes, muqueuses génitales) et/ou des phanères et/ou leurs annexes, immature(s), normale(s) ou mature(s)/âgée(s), à l'encontre des agressions mécaniques, microbiennes, thermiques et radicalaires. L'extrait selon l'invention agit pour la défense du microbiote et permet donc de lutter contre le déséquilibre microbiote. En outre, l'extrait selon l'invention permet de stimuler les défenses immunitaires de la peau et le système antioxydant cutané.
- [0095] L'invention a également pour objet l'utilisation d'un extrait selon l'invention ou d'une composition selon l'invention pour la fabrication d'une composition cosmétique, pharmaceutique ou dermatologique pour prévenir et/ou traiter les troubles ou pathologies de la peau et/ou des muqueuses (gencives, parodontes, muqueuses génitales)

et/ou des phanères (cheveux et ongles) immature(s), normale(s) ou mature(s)/âgée(s), en particulier les réactions inflammatoires, les réactions d'oxydation, les désordres liés à des attaques radicalaires liées ou non à la pollution, les troubles ou pathologies liées aux attaques microbiennes, les troubles de la barrière ou de l'homéostasie, le vieillissement, notamment le vieillissement chronologique et/ou actinique, les troubles ou pathologies liées aux agressions mécaniques et/ou thermiques de la peau et/ou des muqueuse et/ou des phanères ; plus avantageusement les réactions ou pathologies inflammatoires, irritatives ou les troubles de la barrière ou de l'homéostasie de la peau, des phanères et/ou des muqueuses (gencives, parodontes, muqueuses génitales) immature(s), normale(s) ou mature(s)/âgée(s).

[0096] L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'un extrait selon l'invention ou une composition selon l'invention pour la fabrication d'une composition pharmaceutique, cosmétique ou dermatologique pour prévenir et/ou traiter les déséquilibres et/ou les troubles liés au déséquilibre du microbiote de la peau et/ou des muqueuses (gencives, parodontes, muqueuses génitales) et/ou des phanères et/ou leurs annexes, immature(s), normale(s) ou mature(s)/âgée(s).

[0097] L'invention a en outre pour objet une méthode pour prévenir et/ou traiter les troubles ou pathologies de la peau et/ou des muqueuses (gencives, parodontes, muqueuses génitales) et/ou des phanères (cheveux et ongles) immature(s), normale(s) ou mature(s)/âgée(s), en particulier les réactions inflammatoires, les réactions d'oxydation, les désordres liés à des attaques radicalaires liées ou non à la pollution, les troubles ou pathologies liées aux attaques microbiennes, les troubles de la barrière ou de l'homéostasie, le vieillissement, notamment le vieillissement chronologique et/ou actinique, les troubles ou pathologies liées aux agressions mécaniques et/ou thermiques de la peau et/ou des muqueuse et/ou des phanères ; plus avantageusement les réactions ou pathologies inflammatoires, irritatives ou les troubles de la barrière ou de l'homéostasie de la peau, des phanères (cheveux et ongles) et/ou des muqueuses (gencives, parodontes, muqueuses génitales) immature(s), normale(s) ou mature(s)/âgée(s), comprenant l'administration, notamment l'administration topique, d'une quantité efficace d'un extrait selon l'invention ou d'une composition selon l'invention, à un sujet en ayant besoin.

[0098] L'invention a aussi pour objet une méthode pour pour prévenir et/ou traiter les déséquilibres et/ou les troubles liés au déséquilibre du microbiote de la peau et/ou des muqueuses (gencives, parodontes, muqueuses génitales) et/ou des phanères et/ou leurs annexes, immature(s), normale(s) ou mature(s)/âgée(s), comprenant l'administration, notamment l'administration topique, d'une quantité efficace d'un extrait selon l'invention ou d'une composition selon l'invention, à un sujet en ayant besoin.

[0099] En particulier, la composition ou l'extrait selon l'invention est destiné(e) à la

prévention et/ou au traitement des réactions ou pathologies inflammatoires, irritatives ou des troubles de la barrière ou de l'homéostasie de la peau, des phanères (cheveux et ongles) et/ou des muqueuses (gencives, parodontes, muqueuses génitales) immature(s), normale(s) ou mature(s)/âgée(s).

- [0100] Avantageusement, les réactions, troubles ou pathologies inflammatoires, irritatives ou des troubles de la barrière ou de l'homéostasie de la peau sont : l'acné, la rosacée ou érythrocouperose, les troubles vasculaires, en particulier les rougeurs et les couperoses, la dermatite du siège, la dermatite atopique, l'eczéma, la dermatite de contact, la dermatite irritative, la dermatite allergique, la dermatite séborrhéique (croûte de lait), la peau sensible, la peau réactive, la peau sèche (xérose), la peau déshydratée, la peau avec rougeur, l'érythème cutané, la peau âgée ou photo âgée, la peau photosensibilisée, la peau pigmentée (mélasma, pigmentation post-inflammatoire...), la peau avec vergetures, les coups de soleil, les irritations par agents chimiques, physiques (par exemple contrainte de tension pour les femmes enceintes), bactériologiques, fongiques, le vieillissement cutané, notamment du photo vieillissement et les désordres liés à des attaques radicalaires liées à la pollution chimique ou atmosphérique, et/ou liées à l'exposition aux UV ou aux IR.
- [0101] Avantageusement, les réactions, troubles ou pathologies inflammatoires, irritatives ou des troubles de la barrière ou de l'homéostasie des muqueuses sont les gingivites (gencives sensibles des nouveaux nés, problèmes d'hygiène, dus au tabagisme ou autres), et les irritations des sphères génitales mâles ou femelles externes ou internes.
- [0102] Avantageusement, les réactions, troubles ou pathologies inflammatoires, irritatives ou des troubles de la barrière ou de l'homéostasie des phanères sont les ongles cassants, les ongles fragiles, les cheveux fragilisés, les cheveux cassants, les cheveux secs,
- [0103] Avantageusement, les réactions, troubles ou pathologies liés au déséquilibre du microbiote cutané sont, la dermatite atopique, l'eczéma, le développement de mauvaises odeurs axillaires, la fragilisation de la barrière cutanée, l'acné, le psoriasis, et l'hidradénite suppuré.
- [0104] Avantageusement, les réactions, troubles ou pathologies liés au déséquilibre du microbiote des phanères sont les folliculites, croûtes de lait, pellicules, démangeaisons du cuir chevelu.
- [0105] Avantageusement, les réactions, troubles ou pathologies liés au déséquilibre du microbiote des muqueuses sont les démangeaisons, irritations, la candidose, et la vaginose bactérienne.
- [0106] L'invention a également pour objet l'utilisation cosmétique d'un extrait selon l'invention ou d'une composition selon l'invention dans le traitement et /ou la prévention de la peau déshydratée ; la peau avec rougeur ; la peau âgée ou photo âgée ;

la peau photosensibilisée ; du vieillissement cutané, notamment du photo vieillissement ; et des désordres liés à des attaques radicalaires liées à la pollution chimique ou atmosphérique, et/ou liées à l'exposition aux UV ou aux IR.

[0107] L'invention a également pour objet l'utilisation cosmétique d'un extrait selon l'invention ou d'une composition selon l'invention pour le soin des phanères, notamment pour le traitement et/ou la prévention des ongles cassants ; des ongles fragiles ; des cheveux fragilisés ; des cheveux cassants ; et des cheveux secs.

[0108] L'invention concerne également un procédé de soin cosmétique de la peau et/ou des phanères et/ou des muqueuses, en vue d'améliorer leur état et/ou leur aspect, consistant à administrer une composition ou un extrait selon la présente invention.

[0109] En particulier, l'invention concerne un procédé de soin cosmétique de la peau et/ou des phanères, en vue d'en prévenir les altérations de la barrière et sa déshydratation, consistant à appliquer sur la peau et/ou les phanères une composition ou un extrait selon la présente invention.

[0110] En particulier, l'invention concerne un procédé de soin cosmétique de la peau et/ou des phanères pour prévenir et/ou traiter les altérations de la barrière de la peau ; la peau déshydratée ; la peau avec rougeur ; la peau âgée ou photo âgée ; la peau photosensibilisée ; le vieillissement cutané, notamment le photo vieillissement ; les désordres liés à aux agression mécanique ou thermique de la peau et les désordres liés à des attaques radicalaires liées à la pollution chimique ou atmosphérique, et/ou liées à l'exposition aux UV ou aux IR, consistant à administrer une composition ou un des extraits selon la présente invention.

[0111] Les exemples qui suivent permettent d'illustrer l'invention de manière non-limitative.

DESCRIPTION DES FIGURES

[0112] [Fig.1] : La [Fig.1] représente les courbes de croissance de *C. acnes* et *M.furfur* (cf. Exemple 2-V-b.).

[0113] [Fig.2] : La [Fig.2] représente l'effet de l'actif BCP sur la croissance bactérienne de différentes souches en co-culture en fonction du temps (cf. Exemple 2-V-b.).

[0114] [Fig.3] : La [Fig.3] représente l'analyse de la morphologie des RHE après coloration Hématoxyline/Eosine (cf. Exemple 2-VI-b.).

[0115] [Fig.4a] et [Fig.4b] : la [Fig.4a] et la [Fig.4b] représentent les courbes de croissance des souches de lactobacilles (cf. Exemple 2-VII-b.).

[0116] **EXEMPLES**

[0117] Exemple 1 : Préparation d'une solution de polysaccharides de calices de *Bombax costatum*

[0118] - Les Calices de *Bombax costatum* sont broyés, puis mis en suspension sous agitation

- dans l'eau à la proportion de 2% p/p calices/eau ;
- [0119] - Extraction une heure sous agitation à 90°C ;
 - [0120] - Centrifugation de la solution obtenue afin de séparer les résidus solides de la plante ;
 - [0121] - Décoloration par ajout de charbon actif et filtration ;
 - [0122] - Concentrat des polysaccharides par Ultrafiltration 15 kDa ;
 - [0123] - Ajout de glycérine et évaporation de l'eau sous vide afin d'obtenir une concentration finale en glycérine de 80% p/p.
 - [0124] Profil analytique de la solution de polysaccharides obtenue
 - [0125] - Solution visqueuse orangée
 - [0126] - Matière sèche (m/m) : 1,24%
 - [0127] - pH : 6,3
 - [0128] - Cendres 8,9%
 - [0129] - Sucres totaux (détermination par la méthode à l'antrone) : 35%
 - [0130] - Viscosité de la solution (TA, mobile1, 2 rpm) : 2592 Cps
 - [0131] Profil analytique des polysaccharides obtenus (matière sèche) :
 - [0132] - Masse moléculaire moyenne (détermination par Chromatographie Phase Gazeuse) : 3711 kDa
 - [0133] - Composition (détermination par Chromatographie Phase Gazeuse) : 15% Galactose ; 17% rhamnose ; 17% acide galacturonique ; 5% acide glucuronique
 - [0134] Exemple 2 : activités biologiques
 - [0135] Les activités biologiques potentielles de l'extrait ont été recherchées par un test de modulation d'expression de gènes sur fibroblastes dermiques et épidermes reconstruits mélanisés. Ainsi, l'expression de 96 gènes d'intérêts majeurs en physiologie cutanée et cosmétique a été étudiée par PCR-array sur des fibroblastes et des épidermes reconstruits mélanisés.
 - [0136] a. Matériels et Méthodes :
 - [0137] L'extrait de polysaccharides de *Bombax costatum* selon l'exemple 1 (appelé extrait BCP) à 0,05% de matière sèche a été ajouté dans le milieu de culture de fibroblastes dermiques humains normaux (NHDFs) ou d'épidermes humains mélanisés reconstitués.
 - [0138] Après 6 heures ou 24 heures d'incubation, l'expression des marqueurs sélectionnés a été évaluée par RT-PCR quantitative (carte microfluidique TaqMan). La variation d'expression des marqueurs étudiés par rapport au témoin a été exprimée en quantité relative (QR, QR>1 : augmentation, QR<1 : diminution).
 - [0139] b. Résultats :
 - [0140] Les résultats les plus significatifs montrant l'effet de l'extrait BCP sur l'expression de gènes dans des épidermes reconstruits sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

[0141] Tableau 1 : Variations de l'expression de gènes d'intérêt dans des épidermes humains reconstruits mélanisés

[0142] Quantité Relative (QR) par rapport au contrôle = 1

[0143] p value déterminée suite à un test de Student

[0144] [Tableaux1]

BCP 0,05%ms	QR	p value
RAB11A Ras-related protein Rab-11A	1,7372	0,0073
SMPD1 Sphingomyelin phosphodiesterase (Acid sphingomyelinase)	1,4885	0,0012
KRT19 Keratin, type I cytoskeletal 19 (keratin 19)	1,3016	0,0321
SDC1 Syndecan-1	1,279	0,0401
MITF Microphthalmia-associated transcription factor	0,7409	0,0298

[0145] Ces résultats montrent que l'extrait BCP, en faisant varier l'expression génique de certains marqueurs, a un intérêt particulier dans les activités suivantes :

[0146] **La synthèse et le remodelage des lipides dans la fonction barrière de l'épiderme**

[0147] L'extrait BCP augmente l'expression génique de 2 enzymes impliquées dans la synthèse ou le remodelage des lipides au sein de la couche cornée : Le gène RAB11A pour une GTPase (Ras-related protein Rab-11A) et le gène SMPD1 pour la sphingomyelin phosphodiesterase.

[0148] En augmentant l'expression de ces deux gènes, l'actif BCP permet de renforcer la fonction barrière de l'épiderme et son hydratation.

[0149] **Les mécanismes de régulation de l'adhésion cellulaire, de la migration, prolifération et différenciation de kératinocytes :**

[0150] L'actif BCP augmente l'expression du syndécan-1 (SDC1).

La protection des cellules souches :

[0151] La kératine 19 encodée par le gène KRT19 est un marqueur épithélial considéré comme marqueur des cellules souches épidermiques.

[0152] En stimulant l'expression de KRT19, l'extrait BCP a un effet protecteur des cellules souches.

L'inhibition de la mélanogénèse :

[0153] L'extrait BCP entraîne une diminution de l'expression du gène MITF. Ainsi, en diminuant l'expression du gène MITF, l'extrait BCP présente une activité inhibitrice de la mélanogénèse.

[0154] Le tableau 2 ci-après présente les résultats les plus significatifs de l'extrait BCP sur

l'expression de gènes dans des fibroblastes.

- [0155] Tableau 2 : Variations de l'expression de gènes d'intérêt dans des fibroblastes dermiques humains normaux (NHDFs)
- [0156] Quantité Relative (QR) par rapport au contrôle =1
- [0157] p value déterminée suite à un test de Student

[0158] [Tableaux2]

BCP 0,05%rms	QR	p value
SOD2 Superoxide dismutase 2, mitochondrial	9,4811	0,0045
MT1G Metallothionein-1G	5,1496	0,0037
FBN2 Fibrillin-2	2,9182	0,026
FOXO1 Forkhead box protein O1	2,0353	0,0118
CSGALNACT1 Chondroitin sulfate N-acetylglucosaminyltransferase 1	2,0195	0,0055
MKI 67 Antigen Ki-67	1,9088	0,0062
DCN Decorin (PGS2)	1,9083	0,0332
CTGF Connective tissue growth factor	1,8602	0,0377
TXNRD1 Thioredoxin reductase 1	1,664	0,0148
ELN Elastin (tropoelastin)	1,6088	0,0226
LMNB1 Lamin-B1	1,5846	0,0068
FGF2 Heparin-binding growth factor 2 (Fibroblast growth factor 2)	1,5844	0,0355
FBN1 Fibrillin-1 (Marfan syndrome)	1,4919	0,0119
COL3A1 Collagen 3 alpha 1 subunit (COL3A1)	1,4364	0,0362
CAT Catalase	1,2865	0,0387
ACTA2 Actin, aortic smooth muscle	1,2722	0,0293
CHST15 Carbohydrate sulfotransferase 15	1,2604	0,0194
FBLN5 Fibulin-5	1,2554	0,0391
COL16A1 Collagen 16 alpha 1 subunit (COL16A1)	1,2117	0,0422
FTH1 Ferritin heavy chain	1,205	0,0242
PXN Paxillin	1,1758	0,0184
TLN Talin-1	1,1482	0,0275
SESN2 Sestrin-2	0,5513	0,0406
MMP1 Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	0,5478	0,0045

PTGS2 Prostaglandin G/H synthase 2	0,3023	0,0314
------------------------------------	--------	--------

[0159] Ces résultats montrent une activité de l'extrait BCP dans les axes suivants :

La protection contre le stress oxydant :

[0160] L'extrait BCP induit l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la défense anti-oxydante : les superoxydes dismutases, notamment la superoxyde dismutase 1 (Cu/ZnSOD) codée par le gène SOD1 et la superoxyde dismutase 2 (MnSOD) codée par le gène SOD2.

[0161] L'actif BCP induit également l'expression d'une des 2 isoformes de la métallothionéine 1 (MT1G).

[0162] L'actif BCP induit également le gène TXNRD1 codant pour l'isoforme 1 de la thio-rédoxine réductase.

[0163] L'induction conjointe de ces gènes codant pour des protéines possédant une activité antioxydante et/ou détoxifiante confère une protection contre les UVs et les métaux lourds issus par exemple de la pollution urbaine.

[0164] **La matrice extracellulaire et l'élasticité de la peau pour un effet anti-âge :**

[0165] La fonction principale des fibroblastes présents dans le derme est de produire, de dégrader, et donc de réguler les composants de la matrice extracellulaire (MEC) avec laquelle ils interagissent. La MEC est une structure complexe formée d'un réseau de fibres de collagène, de fibres d'élastine et de glycoprotéines de structure.

[0166] Parmi les protéines de la MEC régulées par l'actif BCP, on retrouve l'élastine (ELN) mais aussi les fibrillines-1 et -2 encodées respectivement par les gènes FBN1 et FBN2. En plus de l'induction des gènes ELN et FBN1, l'actif BCP induit également FBN2, constituant également les microfibrilles.

[0167] En parallèle de son action sur les fibres élastiques, l'actif BCP agit également sur les fibres de collagène puisqu'il augmente l'expression de la sous-unité alpha 1 du collagène 3 (COL3A1).

[0168] L'action conjointe de BCP sur l'expression des constituants des fibres d'élastine et de collagène ainsi que sur MMP1 et la paxilline va dans le sens d'un effet sur l'élasticité de la peau, particulièrement intéressante dans un contexte anti-âge.

[0169] Par ailleurs, il est démontré que le vieillissement cutané est associé à la diminution de la prolifération des fibroblastes. On observe une diminution d'expression du facteur de prolifération Ki-67 lié à l'âge (Ma, C. et al., 2011. *Expression of metallothionein-I and II in skin ageing and its association with skin proliferation. Br. J. Dermatol., 164(3), pp. 479-482*). L'actif BCP augmente l'expression de MKI67 témoignant d'une augmentation de la prolifération des cellules, ce qui renforce son effet anti-âge.

La lamine nucléaire :

[0170] Il a été montré que l'expression de la lamine B1 (LMNB1) au sein de la peau

diminue avec l'âge. La lamine B1 est ainsi considérée comme un marqueur de la sénescence des cellules de la peau. En effet, il a été montré que la sénescence liée à l'âge ou associée à des pathologies de la peau s'accompagne d'une perte d'expression, au niveau protéique et ARNm, de la lamine B1 (*Dreesen, O. et al., 2013. The contrasting roles of lamin B1 in cellular aging and human disease. Nucleus, 4(4), pp. 283-290.*

[0171] Dès lors, une augmentation d'expression de LMNB1 au sein des fibroblastes de derme témoigne d'un effet de l'actif BCP réduisant la sénescence pouvant être associée à l'âge ou à des pathologies de la peau, et d'autre part s'avère bénéfique pour le maintien de la structure et de l'intégrité du noyau.

L'autophagie :

[0172] L'extrait BCP, induit une diminution de l'expression de SESN2. SESN2 en particulier est impliqué dans la réponse aux UV des cellules de la peau. Ceci va dans le sens d'une activité plus importante du complexe mTORC1 qui va de pair avec une diminution de l'activité autophagique des cellules et ainsi un effet régulateur de l'activité mitophagique.

La cicatrisation cutanée :

[0173] Au sein des sites d'adhésion focale, les intégrines sont liées, par l'intermédiaire de protéines d'adhésion, aux filaments d'actine intracellulaires. Parmi ces protéines cytoplasmiques d'adhésion, on retrouve notamment la taline-1 encodée par le gène TLN1 surexprimé par l'actif BCP. Elle constitue le lien initial entre les intégrines et le cytosquelette d'actine. La liaison de la taline aux intégrines régule leurs affinités pour la MEC alors que la liaison de la taline à l'actine constituerait le premier lien à la machinerie contractile des cellules. Ces 2 événements sont particulièrement importants pour la migration cellulaire. En effet, celle-ci implique l'attachement et le détachement cycliques des intégrines à la MEC mais aussi la génération d'une force requise pour la translocation du contenu cellulaire (Atherton, P. et al., 2015. Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery. *Nat. Commun, Volume 6, p. 10*).

[0174] L'augmentation d'expression du gène de la taline-1 combinée à celle de la paxilline témoigne d'une action sur la migration des cellules bénéfique notamment dans le processus de cicatrisation cutanée.

La sous-expression de PTGS2 dans un contexte anti-inflammatoire :

[0176] Les prostaglandin-endoperoxyde synthases dont fait partie la cyclooxygénase-2 COX2 ou PTGS2 catalysent la biosynthèse des prostaglandines (PG) à partir de l'acide arachidonique afin d'induire le processus inflammatoire via la sécrétion de cytokines et la vasodilatation cutanée.

[0177] La diminution d'expression de COX2 témoigne de la capacité de l'actif BCP à réduire un éventuel phénomène inflammatoire pouvant être induit par différents stimuli

comme des agents pathogènes, les UVs, des radiations ionisantes, etc.

I. Activité Anti-inflammatoire

[0178] L'activité anti-inflammatoire de l'extrait de Polysaccharide de *Bombax costatum* selon l'exemple 1 a été mise en évidence vis-à-vis d'une inflammation induite par un stress au PMA.

[0179] a) Matériels et méthodes

[0180] Des Kératinocytes Humains Normaux (KHN), ont été traités pendant 24 heures à 37°C par l'extrait de Polysaccharides de *Bombax costatum* selon l'exemple 1 (appelé extrait BCP) à 0,01% et/ou à 0,05% de matière sèche (MS) ou par la Dexaméthasone ou l'Indométacine à 10⁻⁷M (molécules de référence anti-inflammatoires). Les cellules ont ensuite été traitées par ajout de PMA à 10 µg/ml (Phorbol Myristate Acetate, agent induisant l'inflammation) pendant 16 heures à 37°C.

[0181] A l'issue du traitement, les quantités d'IL1α (interleukine 1α), de PGE2 (Prostaglandine-E2), d'IL1β (Interleukine 1β), de TNFα (Tumor Necrosis Factor α), d'IL6 (Interleukine 6) et d'IL8 (Interleukine 8) sécrétées ont été mesurées par la technique ELISA dans les surnageants de culture.

[0182] La significativité des résultats a été évaluée par une analyse de variance à un facteur suivie d'un test de Tuckey.

[0183] b) Résultats

[0184] Comme le montrent les résultats des tableaux 3 à 8, l'extrait BCP a significativement inhibé la production des médiateurs inflammatoires IL1α, IL1β, IL6, IL8, TNFα et PGE2 dans des kératinocytes sous conditions inflammatoires.

[0185] Ces résultats montrent l'activité anti-inflammatoire de l'extrait BCP.

[0186] Tableau 3 : Dosage d'IL1-alpha produit par des KHN sous l'effet d'un stress PMA

[0187] \$\$p<0,01 vs Contrôle ; *p<0,05 **p<0,01 vs PMA ; ns Non Significatif

[0188] ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey

[0189] [Tableaux3]

	IL1α (pg/ml)			
	Moyenne	Ecart-type	Evolution	Significativité
Contrôle	33,869	2,340		
PMA 10µg/ml	372,604	91,220	+1000%	\$\$
Dexaméthasone 0,1µM	230,583	29,293	-38%	ns
BCP 0,05% ms	116,557	25,046	-69%	*

[0190] Tableau 4 : Dosage d'IL1-beta produit par des KHN sous l'effet d'un stress PMA

[0191] \$\$p<0,01 vs Contrôle ; *p<0,05 vs PMA ; ns Non Significatif

[0192] ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey

[0193] [Tableaux4]

	IL1 β (pg/ml)			
	Moyenne	Ecart-type	Evolution	Significativité
Contrôle	18,291	2,304		
PMA 10 μ g/ml	50,392	6,609	+175%	\$\$
Dexaméthasone 0,1 μ M	34,410	6,003	-32%	ns
BCP 0,05% ms	24,459	4,956	-51%	*

[0194] Tableau 5 : Dosage d'IL6 produit par des KHN sous l'effet d'un stress PMA

[0195] \$p<0,05 vs Contrôle ; *p<0,05 ***p<0,001 vs PMA

[0196] ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey

[0197] [Tableaux5]

	IL6 (pg/ml)			
	Moyenne	Ecart-type	Evolution	Significativité
Contrôle	5,225	0,849		
PMA 10 μ g/ml	6,958	0,721	+33%	\$
Dexaméthasone 0,1 μ M	2,090	0,300	-70%	***
BCP 0,01%ms	5,379	0,318	-23%	*

[0198] Tableau 6 : Dosage d'IL8 produit par des KHN sous l'effet d'un stress PMA

[0199] \$\$\$p<0,001 vs Contrôle ; *p<0,05 ***p<0,001 vs PMA ; ns Non Significatif

[0200] ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey

[0201] [Tableaux6]

	IL8 (pg/ml)			
	Moyenne	Ecart-type	Evolution	Significativité
Contrôle	161,769	10,601		
PMA 10 μ g/ml	9952,388	1393,896	6052	\$\$\$
Dexaméthasone 0,1 μ M	4076,675	202,317	-59	***
BCP 0,01%ms	6641,050	804,243	-33	*

[0202] Tableau 7 : Dosage de TNF-alpha produit par des KHN sous l'effet d'un stress PMA

[0203] \$\$\$p<0,001 vs Contrôle ; *p<0,05 ***p<0,001 vs PMA

[0204] ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey

[0205] [Tableaux7]

	TNF α (pg/ml)			
	Moyenne	Ecart-type	Evolution	Significativité
Contrôle	1,546	0,655		
PMA 10 μ g/ml	33,787	0,785	+2086%	\$\$\$
Dexaméthasone 0,1 μ M	16,216	1,633	-52%	***
BCP 0,01%ms	12,991	0,600	-62%	***
BCP 0,05% ms	21,546	0,936	-36%	*

[0206] Tableau 8 : Dosage de PGE2 produit par des KHN sous l'effet d'un stress PMA

[0207] \$\$\$p<0,001 vs Contrôle ; **p<0,01 ***p<0,001 vs PMA ; ns Non Significatif

[0208] ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey

[0209] [Tableaux8]

	PGE2 (pg/ml)			
	Moyenne	Ecart-type	Evolution	Significativité
Contrôle	39,000	0,000		
PMA 10 μ g/ml	625,506	109,911	+1504%	\$\$\$
Indométhacine 0,1 μ M	39,000	0,000	-94%	***
BCP 0,05% ms	219,335	108,511	-65%	**

II. Activité sur la cicatrisation épidermique.

[0210] Le potentiel d'activité sur la cicatrisation épidermique de l'extrait de Polysaccharides de *Bombax costatum* selon l'exemple 1 (appelé extrait BCP) a été évalué par étude de la migration kératinocytaire, première étape du processus de réépithélisation cutanée.

[0211] a) Matériels et méthodes

[0212] Scratch Assay : une lésion a été pratiquée sur un tapis de monocouche de kératinocytes humains normaux (KHN) à confluence avant traitement par l'extrait de BCP à 0,01% et 0,05% de matière sèche ou par l'EGF (Epidermal Growth Factor) à 100ng/ml.

[0213] Une photo a été réalisée en début de traitement et après 5 heures d'incubation afin de mesurer la vitesse de progression des KHN au sein de la lésion. Le pourcentage de recouvrement a été évalué dans les différentes conditions par analyse d'image.

[0214] La significativité des résultats a été évaluée par un test t de Student.

[0215] b) Résultats

[0216] Comme démontré par les résultats du tableau 9, l'extrait BCP a significativement

stimulé la migration kératinocytaire, confirmant ainsi son potentiel activateur de la cicatrisation cutanée.

[0217] Tableau 9 : Migration de KHN

[0218] * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs contrôle ; t test

[0219] [Tableaux9]

	% de recouvrement	Evolution par rapport au contrôle
Contrôle	33,6 ± 3,1	0
EGF 100ng/ml	62,2 ± 11,1	+85% **
BCP 0,01%ms	55,4 ± 14,1	+65% *
BCP 0,05% ms	67,0 ± 8,6	+99% ***

[0220] **III. Activité sur les défenses innées anti-microbiennes**

[0221] L'effet de l'extrait de Polysaccharides de *Bombax costatum* selon l'exemple 1 (appelé extrait BCP) a été évalué sur l'expression de peptides anti-microbiens (PAMs) et du TLR2 dans des kératinocytes épidermiques.

[0222] a) Matériels et méthodes

[0223] Des kératinocytes épidermiques humains normaux ont été traités pendant 24h ou 48h par l'extrait BCP ou l'IL1 β à 100ng/ml (référence positive).

[0224] A la fin du traitement, l'expression génique de hBD2, hBD3 et TLR2 a été analysée par RT-PCR quantitative en temps réel.

[0225] Par ailleurs, les quantités de TLR2 et d'hBD2 intracellulaire ont été mesurées par ELISA.

[0226] b) Résultats

[0227] Comme démontrés par les résultats des tableaux 10 et 11, l'extrait BCP a significativement stimulé l'expression génique et protéique des défensines et de TLR2 ; démontrant ainsi une activité anti-microbienne et d'activation des défenses immunitaires.

[0228] Tableau 10 : Expression génique des PAMs et TLR2 dans des kératinocytes

[0229] (QR : Quantité Relative)

[0230] * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns Non Significatif vs Contrôle

[0231] ANOVA à un facteur suivi d'un test de Dunnett

[0232] [Tableaux10]

	hBD2		hBD3		TLR2	
	QR	Evolution	QR	Evolution	QR	Evolution
Contrôle	1,12		1,09		1,08	
IL1 β 100ng/ml	3480,89	x3000 ***	9,04	+730% ***	3,26	+201% ***
BCP 0,01% ms	12,94	+1057% ***	2,69	+147% ns	2,14	+98% *
BCP 0,05% ms	293,91	x300 ***	10,69	+882% ***	2,81	+160% **

[0233] Tableau 11 : Production d'hBD2 et TLR2 dans des kératinocytes

[0234] (Expression protéique intracellulaire)

[0235] *p<0,05 ; **p<0,01 ; *** p<0,001 ; ns Non Significatif vs Contrôle

[0236] ANOVA à un facteur suivi d'un test de Dunnett

[0237] [Tableaux11]

	hBD2		TLR2	
	pg/ml	Evolution	pg/ml	Evolution
Contrôle	141,5 \pm 15,2		735,9 \pm 39,2	
IL1 β 100ng/ml	2162,7 \pm 51,1	+1428% ***	913,7 \pm 30,5	+24% **
BCP 0,006% ms	286,33 \pm 66,1	+102% *	789,2 \pm 78,2	+7% ns
BCP 0,02% ms	488,8 \pm 57,3	+245% ***	884,2 \pm 56,0	+20% *

IV. Activité sur l'adhésion bactérienne

[0238] L'effet de l'extrait BCP a été évalué sur l'adhésion de 4 souches bactériennes à la surface d'épidermes humains reconstruites (RHE) ou d'explants de peau.

[0239] a) Matériels et méthodes

[0240] - Etude de l'adhésion de *S. aureus*, *S. epidermidis* et *C. acnes* :[0241] Des Epiderme Reconstitue Humains (RHE) ont été incubés pendant 15min en présence de l'extrait de polysaccharides de *Bombax costatum* selon l'exemple 1 (appelé extrait BCP) à 0,6% et 2%. Puis après deux rinçages par du PBS, les souches bactériennes *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) ou *Cutibacterium acnes* (ATCC 6919) ont été déposées à la surface des

RHE pendant 4h. Après élimination des bactéries non adhérentes par 4 lavages successifs, les RHE ont été à nouveau incubés une nuit.

- [0242] Le dénombrement des bactéries a été réalisé par comptage des colonies après ensemencement sur gélose spécifique des broyats de RHE. Le résultat est exprimé en UFC/RHE (Unité Formant Colonie).
- [0243] - Etude de l'adhésion de *C. xerosis* :
- [0244] Des explants de peau ont été incubés pendant 2h en présence de l'extrait BCP à 0,6% et 2 %. Une suspension de *Corynebacterium xerosis* (DSM 20743) a ensuite été déposée à la surface des explants de peau pendant 2 heures. Après rinçage, ceux-ci ont été de nouveau incubés 24h.
- [0245] Les bactéries adhérentes à la surface des explants de peau ont été récupérées par grattage puis ensemencées sur gélose afin de réaliser le dénombrement exprimé en UFC/cm².
- [0246] b) Résultats
- [0247] Aux deux concentrations testées, l'extrait BCP a induit une nette inhibition de l'adhésion de *S. aureus* sur des RHE. A 2%, l'extrait BCP a également inhibé l'adhésion de *C. acnes*. (Cf. tableau 12)
- [0248] L'extrait de BCP a significativement inhibé l'adhésion de *C. xerosis* à la surface d'explants (cf. tableau 13).
- [0249] L'extrait de BCP permet de promouvoir un rééquilibrage du microbiote cutané en limitant l'adhésion de bactéries pathogènes tout en préservant l'adhésion de bactéries commensales.
- [0250] Tableau 12 : Adhésion bactérienne sur RHE
- [0251] [Tableaux12]

	<i>C. acnes</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	UFC / RHE	Evolution	UFC / RHE	Evolution	UFC / RHE	Evolution
Contrôle	23125		1275000		2764801	
BCP 0,6%	NC	NC	137875	-89%	2650852	-4%
BCP 2%	8125	-65%	244750	-81%	2146464	-22%

- [0252] Tableau 13 : Adhésion de *C. xerosis* sur explants de peau
- [0253] **p<0,01 ; *** p<0,001 - ANOVA à un facteur suivi d'un test de Dunnett

[0254] [Tableaux13]

	UFC/cm ²	Evolution	Significativité
Contrôle	597 ±190		
BCP 0,6%	272 ± 114	-54%	**
BCP 2%	48 ± 38	-92%	***

V. Activité sur la croissance bactérienne

[0255] L'activité anti-microbienne ou au contraire prébiotique de l'extrait de polysaccharides de *Bombax costatum* selon l'exemple 1 (appelé extrait BCP) a été évaluée par l'étude de la croissance bactérienne de différentes souches cultivées séparément ou en co-culture.

[0256] a) Matériels et méthodes

[0257] Les souches microbiennes suivantes, représentatives du microbiote cutané, ont été utilisées :

[0258] *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) ;

[0259] *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) ;

[0260] *Cutibacterium acnes* (ATCC 11827) ;

[0261] *Corynebacterium xerosis* (ATCC 373) ;

[0262] *Malassezia furfur* (ATCC 14521) ;

[0263] *Staphylococcus hominis* (ATCC 27844).

[0264] - Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et détermination du potentiel « activateur » de la croissance bactérienne :

[0265] L'extrait BCP a été dilué en microplaque à 0,25% ; 0,5% ; 1% ; 2% ; 4% et 8%, dans le milieu de culture minimal spécifique à chaque souche. Les contrôles ont été préparés de façon similaire à l'échantillon :

[0266] - Un contrôle positif d'inhibition de croissance : Phenonip® 5 % dans le milieu dilué,

[0267] - Un contrôle constitué de milieu de croissance dilué,

[0268] - Un contrôle constitué de milieu de croissance.

[0269] Les souches ont été ajoutées aux différentes conditions avant incubation de 48h.

[0270] En présence d'un trouble révélateur d'une croissance microbienne après 48 heures, le prélèvement d'un aliquot a été réalisé pour les trois plus fortes concentrations offrant encore une croissance des micro-organismes. Ces aliquots ont été déposés dans des plaques distinctes en dilutions décimales, de manière à déterminer la concentration des populations par dilutions limites.

[0271] Après 48h d'incubation, l'activation de la croissance bactérienne a été démontrée par détermination de la concentration de chaque micro-organisme (effectuée simul-

tanément par lecture visuelle et mesure de l'absorbance à 620 nm (turbidité)) en fonction des dilutions décimales réalisées.

[0272] Enfin, les résultats ont été exprimés par comparaison à la croissance bactérienne obtenues dans les témoins sans produit.

[0273] - Détermination de l'effet sur la croissance de bactéries en co-culture :

[0274] Les souches *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis* et *C. acnes* en co-culture ont été incubées pendant 48h en présence de l'extrait BCP à 0,25% ; 0,5% et 1% ou de Phénonip 0,5 %, contrôle positif d'inhibition de croissance.

[0275] Un aliquot a été prélevé et déposé sur géloses spécifiques aux souches sélectionnées. Après 48h d'incubation, le dénombrement a été effectué pour chaque souche.

[0276] b) Résultats

[0277] - Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et détermination du potentiel « activateur » de la croissance bactérienne :

[0278] Sur *C. acnes*, une inhibition de la croissance bactérienne a été observée avec une CMI déterminée à 4%. La cinétique de croissance a montré un effet bactériostatique de l'extrait BCP vis-à-vis de *C. acnes* (cf. [Fig.1]).

[0279] De même, la cinétique de croissance de *M. furfur* a montré un effet bactériostatique de l'extrait BCP vis-à-vis de cette levure (cf. [Fig.1]).

[0280] - Détermination de l'effet sur la croissance de bactéries en co-culture :

[0281] L'extrait BCP a montré un effet nourricier vis-à-vis des souches *S. epidermidis*, *S. hominis* et *C. acnes* et a tendance à inhiber la croissance de *S. aureus* (effet bactéricide) (cf. [Fig.2]).

[0282] Ces résultats montrent un effet protecteur de l'équilibre du microbiote cutané.

[0283] **VI. Défense contre les dommages induits par *S aureus***

[0284] La bactérie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est fréquemment détectée sur des patients atteints de dermatite atopique.

[0285] La quantité de *S. aureus* présente chez ces patients est corrélée avec le degré de sévérité de la pathologie et joue un rôle important dans la physiopathologie.

[0286] L'objectif de cette étude a été de reproduire le stress provoqué par cette bactérie sur l'épiderme, pour cela du secretum de *S. aureus* a été appliqué à la surface de RHE afin d'en étudier les conséquences sur des protéines de la différenciation épidermique.

[0287] a) Matériels et méthodes

[0288] L'extrait BCP selon l'exemple 1 à 1% a été appliqué en pré-traitement de 24 heures à la surface d'épidermes humains reconstruits (RHE). Les RHE ont ensuite été traités topiquement par dépôt du secretum (milieu de culture) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 33592).

[0289] Après 24 heures supplémentaires d'incubation, une analyse morphologique des tissus a été réalisée après coloration Hématoxylline/Eosine, ainsi que l'analyse de

l'expression de marqueurs de la fonction barrière par immunofluorescence. Le niveau d'expression des protéines d'intérêt a été évalué par semi-quantification à l'aide du logiciel Image J.

[0290] b) Résultats

[0291] Analyse morphologique :

[0292] Comme le montre la [Fig.3], le secretum de *S. aureus* a induit une altération modérée de la morphologie des RHE : désorganisation de la structure de l'épiderme (couche basale), grains de kératohyaline moins nombreux au niveau de la couche granuleuse.

[0293] Le pré-traitement par l'extrait BCP a préservé la morphologie des épidermes qui sont mieux organisés, plus épais et avec une production de grains de kératohyaline plus marquée.

[0294] Expression de marqueurs de la fonction barrière :

[0295] Comme le démontrent les résultats du tableau 14, le secretum de *S. aureus* a significativement diminué le niveau d'expression des marqueurs de la fonction barrière étudiés : Cornéodesmosine, Desmogléine-1 et Filaggrine. Ce modèle est donc représentatif de l'impact négatif de *S. aureus* sur la fonction barrière, en particulier dans la physiopathologie de la dermatite atopique.

[0296] L'extrait BCP a permis de contre-balancer cette diminution d'expression.

[0297] Tableau 14 : Expression des marqueurs de la barrière dans les RHE

[0298] \$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 vs Contrôle ; *p<0,05 ; **p<0,01 vs secretum – Unpaired t test

[0299] [Tableaux14]

	Cornéodesmosine	Desmogléine 1	Filaggrine
Contrôle	100	100	100
Secretum <i>S. aureus</i>	49,6 \$	35,4 \$\$	42,5 \$\$
Secretum + BCP 1%	84,2 *	120,1 **	79,4 *

[0300] L'extrait BCP pourrait donc protéger la peau d'une agression par *S. aureus*.

[0301] VII. Activité protectrice de la microflore vaginale

[0302] L'efficacité prébiotique de l'extrait BCP selon l'exemple 1 a été évalué sur 3 souches de Lactobacilles représentatives du tractus vaginal ; par ailleurs, l'extrait BCP a été étudié dans un modèle reconstruit d'épithélium vaginal colonisé par des souches de lactobacilles représentatives de la microflore résidente.

[0303] a) Matériels et méthodes

[0304] - Etude de l'effet prébiotique sur *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* :

[0305] Les souches *L. gasseri* (ATCC 33323), *L. acidophilus* (LA-14) et *L. rhamnosus* (ATCC 53103) ont étéensemencées dans un milieu appauvri en présence de l'extrait de polysaccharides de *Bombas costatum* selon l'exemple 1 (appelé extrait BCP) à

- 0,25% ; 0,5% ; 1% et 2% ou avec addition de 2% de glucose (contrôle positif).
- [0306] Après 4h et 24h d'incubation, la croissance bactérienne a été évaluée par mesure spectrophotométrique de la DO à 600 nm (qui donne une indication du taux de réplification bactérienne), ainsi que la viabilité bactérienne exprimée en CFU/ml (pour quantifier le nombre de bactéries résiduelles viables).
- [0307] L'influence sur le métabolisme bactérien a été évaluée par mesure de la production d'acide lactique dans les surnageants de culture après 24h d'incubation.
- [0308] - Etude de l'effet protecteur sur épithélium vaginal reconstitué :
- [0309] L'extrait BCP à 1% a été appliqué à la surface d'un épithélium vaginal humain reconstitué (HVE), dans le même temps, les épithélia ont été colonisés par un mélange de *L. crispatus* (DSM 20356) et *L. gasseri* (DSM 20243), mimant la microflore résidente physiologique.
- [0310] Après 6h d'incubation, l'expression génique du peptide anti-microbien hBD2 a été évaluée par RT-PCR en temps réel.
- [0311] b) Résultats
- [0312] - Etude de l'effet prébiotique sur *L. gasseri*, *L. acidophilus*, et *L. rhamnosus*
- [0313] Le taux de croissance bactérien évalué par mesure de la DO a permis de montrer un effet positif de l'extrait BCP sur la croissance de *L. gasseri*, de façon dose-dépendante dès 4h (effet prébiotique précoce) ; ainsi que sur *L. acidophilus*, avec plus particulièrement un effet prébiotique après 24h d'incubation (phase stationnaire) (Cf. [Fig.4a] et 4b).
- [0314] De façon globale, l'extrait BCP a eu un effet similaire voire supérieur au contrôle positif (glucose) sur la viabilité des lactobacilles, confirmant son effet prébiotique.
- [0315] L'évaluation de la viabilité bactérienne (cf. tableau 15) a montré que l'extrait BCP à 2% montrait l'effet prébiotique le plus important à 4h sur les 3 souches de lactobacilles, en particulier *L. gasseri* et, dans une moindre mesure, *L. rhamnosus*. Cette tendance se prolonge jusqu'à 24h pour *L. rhamnosus* tandis qu'une baisse importante de la viabilité a été observée à 24h pour *L. gasseri*, celle-ci s'explique par la starvation liée à la culture en milieu appauvri.
- [0316] A 0,25% l'extrait de BCP a induit un effet prébiotique sur *L. acidophilus*.
- [0317] Tableau 15 : Viabilité bactérienne des souches de lactobacilles
- [0318] * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - ANOVA test

[0319] [Tableaux15]

	L. gasseri (Log10 CFU/ml)		L. acidophilus (Log10 CFU/ml)		L. rhamnosus (Log10 CFU/ml)	
	4h	24h	4h	24h	4h	24h
Contrôle	7,98 ± 0,01	3,10 ± 0,28	7,77 ± 0,13	5,84 ± 0,09	7,82 ± 0,21	8,23 ± 0,00
Glucose 2%	7,81 ± 0,27	3,42 ± 0,14	7,73 ± 0,23	7,22 ± 0,15	7,83 ± 0,06	9,09 ± 0,07
BCP 0,25%	7,89 ± 0,14	2,49 ± 0,12*	7,72 ± 0,13	8,99 ± 0,55*	7,77 ± 0,10	8,89 ± 0,27
BCP 0,5%	8,01 ± 0,19	0,00 ± 0,00**	7,74 ± 0,08	6,10 ± 0,57	7,83 ± 0,06	8,51 ± 0,56
BCP 1%	8,02 ± 0,10	3,27 ± 0,38	8,10 ±0,58	6,29 ± 0,02	7,74 ± 0,06	7,82 ± 0,01*
BCP 2%	10,40 ± 0,24**	3,73 ± 0,07	8,83 ± 0,18	6,63 ± 0,25	8,75 ± 0,11**	10,35 ± 0,04*

[0320] L'acide lactique, produit du métabolisme primaire des lactobacilles, a été quantifié dans les milieux de culture L. Acidophilus (cf. tableau 16).

[0321] L'extrait BCP a induit une augmentation de la production d'acide lactique par L. acidophilus.

[0322] Tableau 16 : Quantification de l'acide lactique produit par L. acidophilus

[0323] *p<0,05 ; **p<0,01 - ANOVA test

[0324] [Tableaux16]

	L. acidophilus	
	Acide Lactique (nmol/μl)	Evolution
Contrôle	25421.81 ± 4389.106	
Glucose 2%	24200.96 ± 1062.115	-5%
BCP 0,25%	57556.58 ± 29969.59	+126%
BCP 0,5%	46584.36 ± 2749.858	+83%
BCP 1%	48314.47 ± 12267.67	+90%
BCP 2%	90768.17 ± 945.7198	+257%

[0325] Globalement, ces résultats montrent un effet prébiotique de l'extrait BCP vis-à-vis de L. acidophilus. Cet effet est plus important à la concentration de 2%.

[0326] Tableau 17 : Résumé de l'effet prébiotique sur les lactobacilles

[0327] ++ effet supérieur au contrôle positif ; effet prébiotique élevé

[0328] + effet équivalent au contrôle positif ; effet prébiotique

[0329] - pas de modification par rapport au contrôle ; absence d'effet prébiotique

[0330] [Tableaux17]

	Taux de croissance		Viabilité		Métabolisme (acide lactique)
	4h (phase exponentielle)	24h (phase stationnaire)	4h (phase exponentielle)	24h (phase stationnaire)	24h (phase stationnaire)
L. gasseri	++	+	++	+	+
L. acidophilus	+	++	+	++	++

[0331] - Etude de l'effet protecteur sur épithélium vaginal reconstitué (HVE) :

[0332] Sur le modèle d'épithélium vaginal (HVE) colonisé, l'extrait BCP a signifi-

tivement augmenté l'expression génique d'hBD2 (cf. tableau 18).

[0333] Ce résultat montre un effet booster des défenses épithéliales locales pour protéger la muqueuse des risques d'infection.

[0334] Tableau 18 : Expression génique d'hBD2 dans des HVE colonisés par les Lactobacilles

[0335] QR : Quantité Relative

[0336] [Tableaux18]

	hBD2 (QR)
Contrôle	1,00
HVE colonisé	0,88
HVE colonisé + BCP 1%	3,24

VIII. Sniff test in vitro (activité déodorante)

[0337] Un « sniff test » in vitro a été réalisé afin d'évaluer la capacité de l'extrait BCP selon l'exemple 1 à inhiber ou modifier la production d'odeurs par les principales espèces bactériennes responsables des odeurs axillaires : *C. striatum*, *S. epidermidis*.

[0338] a) Matériels et méthodes

[0339] Les souches *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) et *Corynebacterium striatum* (ATCC 6940) ont été utilisées.

[0340] Chacune de ces souches possède une signature olfactive typique, résultat de la métabolisation de composants de la sueur :

[0341] *S. epidermidis* : Acide valérianique et propionique ;

[0342] *C. striatum* : Sulphonyl alcohols.

[0343] Chaque souche bactérienne a été inoculée dans une solution de sueur reconstituée en présence de l'extrait BCP à 0,1% ; 0,6% ou 2% ou de chlorhexidine digluconate à 0,1% (contrôle positif).

[0344] Après 6h et 24h d'incubation :

[0345] La viabilité bactérienne a été évaluée par comptage bactérien exprimé en CFU/ml.

[0346] Un sniff test a été réalisé afin de déterminer la signature olfactive qualitativement et semi-quantitativement (intensité de l'odeur) : immédiatement après ouverture du vial, l'odeur a été évaluée et scorée par un opérateur entraîné :

[0347] 1. Absente (comparable au contrôle positif chlorhexidine 0,1%)

[0348] 2. Modérée

[0349] 3. Intense (signature olfactive bactérie-spécifique)

[0350] b) Résultats

[0351] L'extrait BCP a inhibé l'odeur produite par *S. epidermidis* et *C. striatum* comparativement au contrôle négatif, sans altérer la viabilité de ces bactéries (cf. tableau 19).

[0352] Ces résultats démontrent une activité déodorante.

[0353] Tableau 19 : Viabilité et odeur des bactéries dans la sueur reconstituée

[0354] **p<0,01 – ANOVA test vs Contrôle

[0355] [Tableaux19]

	S. epidermidis			
	6h		24h	
	Viabilité (Log10 CFU/ ml)	Odeur (Sniff)	Viabilité (Log10 CFU/ ml)	Odeur (Sniff)
Contrôle (sueur reconstituée)	8,91 ± 0,21	Intense	8,69 ± 0,09	Intense
Chlorhexidine	0,00 ± 0,00 **	Absente	0,00 ± 0,00 **	Absente
BCP 0,1%	8,80 ± 0,08	Modérée	8,64 ± 0,30	Modérée-Intense
BCP 0,6%	8,87 ± 0,07	Modérée-Absente	8,87 ± 0,15	Modérée-Absente
BCP 2%	8,73 ± 0,34	Modérée	8,78 ± 0,18	Modérée-Absente
	C. striatum			
	6h		24h	
	Viabilité (Log10 CFU/ ml)	Odeur (Sniff)	Viabilité (Log10 CFU/ ml)	Odeur (Sniff)
Contrôle (sueur reconstituée)	8,51 ± 0,08	Modérée	8,64 ± 0,19	Modérée
Chlorhexidine	0,00 ± 0,00 **	Absente	0,00 ± 0,00 **	Intense
BCP 0,1%	8,59 ± 0,31	Modérée	8,38 ± 0,11	Modérée
BCP 0,6%	8,66 ± 0,32	Absente	8,57 ± 0,11	Modérée-Absente
BCP 2%	8,28 ± 0,06	Absente	8,31 ± 0,28	Absente

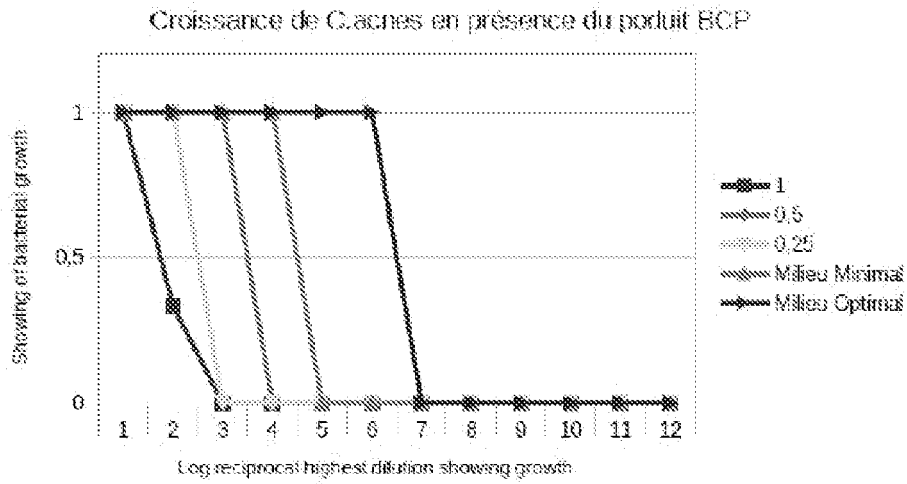
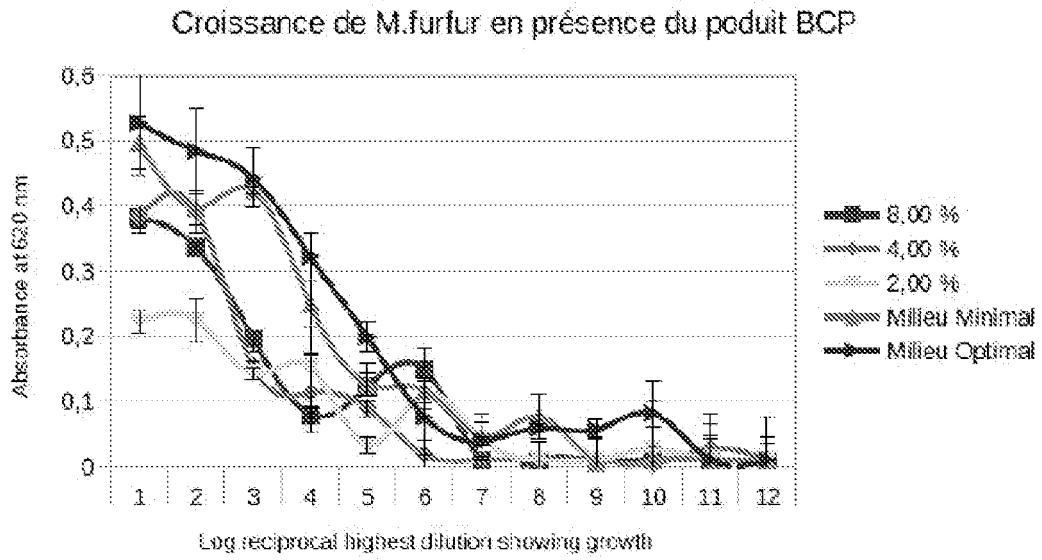
Revendications

- [Revendication 1] Extrait riche en polysaccharides de fleurs, de préférence de calices, de *Bombax costatum*, comprenant au moins 15% de polysaccharides par rapport au poids total de l'extrait sec, les polysaccharides présentant une masse moléculaire apparente comprise entre 1500 et 6000 kDaltons, avantageusement entre 3000 et 6000 kDaltons.
- [Revendication 2] Extrait selon la revendication 1, comprenant au moins 30% en poids de polysaccharides, par rapport au poids total de l'extrait sec et avantageusement au moins 50% en poids de polysaccharides, par rapport au poids total de l'extrait sec.
- [Revendication 3] Extrait selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, dans lequel les polysaccharides comprennent les monosaccharides et dérivés choisis dans le groupe constitué du galactose, du rhamnose, de l'acide galacturonique, de l'acide glucuronique, et leurs mélanges, avantageusement les polysaccharides comprennent un mélange de galactose, rhamnose, d'acide galacturonique, et d'acide glucuronique.
- [Revendication 4] Extrait selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel les polysaccharides comprennent 10 à 16% de galactose ; 10 à 17% de Rhamnose ; 10 à 17% d'acide galacturonique ; et 3 à 7% d'acide glucuronique.
- [Revendication 5] Extrait selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est obtenu par extraction solide/liquide des fleurs et particulièrement des calices, de *Bombax costatum*, dans l'eau.
- [Revendication 6] Procédé de préparation d'un extrait riche en polysaccharides de fleurs, de préférence de calices, de *Bombax costatum*, tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comprenant au moins une étape d'extraction solide/liquide dans l'eau.
- [Revendication 7] Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :
- a) broyage des fleurs, notamment des calices, de *Bombax costatum* ,
 - b) extraction des fleurs, en particulier des calices, broyées dans l'eau ;
 - c) séparation de la phase solide et de la phase liquide par décantation, et/ou centrifugation et/ou précipitation et/ou filtrations successives ;
 - d) éventuellement, étape de décoloration de la phase liquide grâce à un adjuvant adapté ;
 - e) éventuellement, séchage de l'extrait obtenu à l'étape c) ou d) ; et
 - f) éventuellement, stabilisation physique et microbiologique de l'extrait

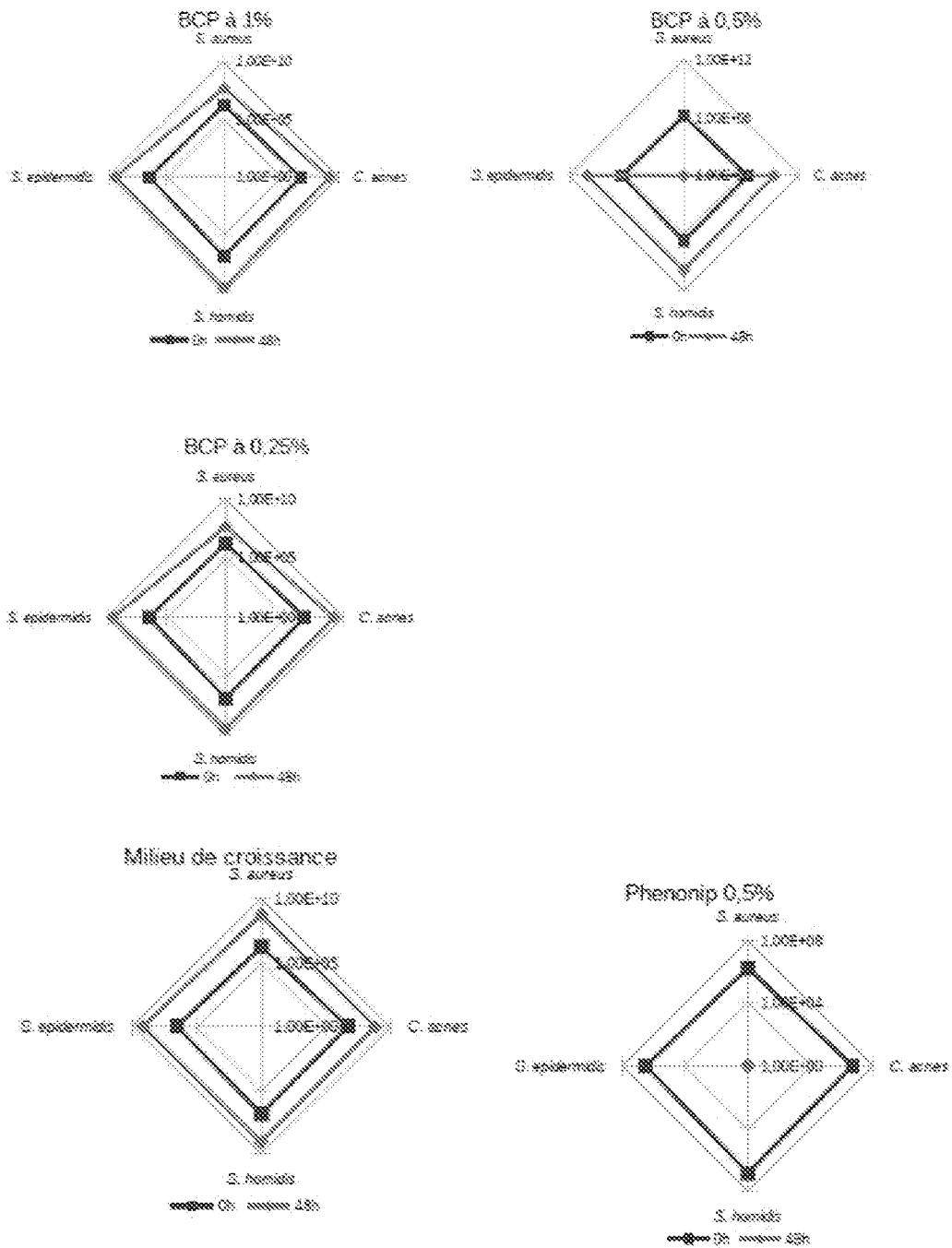
obtenu à l'étape c), d) ou e).

- [Revendication 8] Composition comprenant en tant que principe actif un extrait riche en polysaccharides de fleurs, de préférence de calices, de *Bombax costatum*, tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou susceptible d'être obtenu à partir du procédé selon les revendications 6 et 7, et avantageusement un excipient approprié.
- [Revendication 9] Extrait selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou composition selon la revendication 8, pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter - les déséquilibres et/ou les troubles liés au déséquilibre du microbiote de la peau et/ou des muqueuses et/ou des phanères ; avantageusement choisis parmi la dermatite atopique, l'eczéma, le développement de mauvaises odeurs axillaires, la fragilisation de la barrière cutanée, l'acné, le psoriasis, l'hydradénite suppuré, les folliculites, les croûtes de lait, les pellicules, les démangeaisons notamment du cuir chevelu, les irritations, la candidose et la vaginose bactérienne ; et/ou - les troubles ou pathologies de la peau et/ou des muqueuses et/ou des phanères, en particulier les réactions inflammatoires, les réactions d'oxydation, les désordres liés à des attaques radicalaires liées ou non à la pollution et/ou liées à l'exposition aux UV ou aux IR, la peau photosensibilisée, les troubles ou pathologies liées aux attaques microbiennes, les troubles de la barrière ou de l'homéostasie, le vieillissement, notamment le vieillissement chronologique et/ou actinique, les troubles ou pathologies liées aux agressions mécaniques et/ou thermiques de la peau et/ou des muqueuse et/ou des phanères.
- [Revendication 10] Procédé de soin cosmétique de la peau et/ou des phanères et/ou des muqueuses, en vue d'améliorer leur état et/ou leur aspect, avantageusement pour prévenir et/ou traiter les altérations de la barrière de la peau ; la peau déshydratée ; la peau avec rougeur ; la peau âgée ou photo âgée ; le vieillissement cutané, notamment le photo vieillissement ; les désordres liés aux agressions mécaniques ou thermiques de la peau et les désordres liés à des attaques radicalaires liées à la pollution chimique ou atmosphérique, consistant à administrer un extrait tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 une composition telle que définie selon la revendication 8.

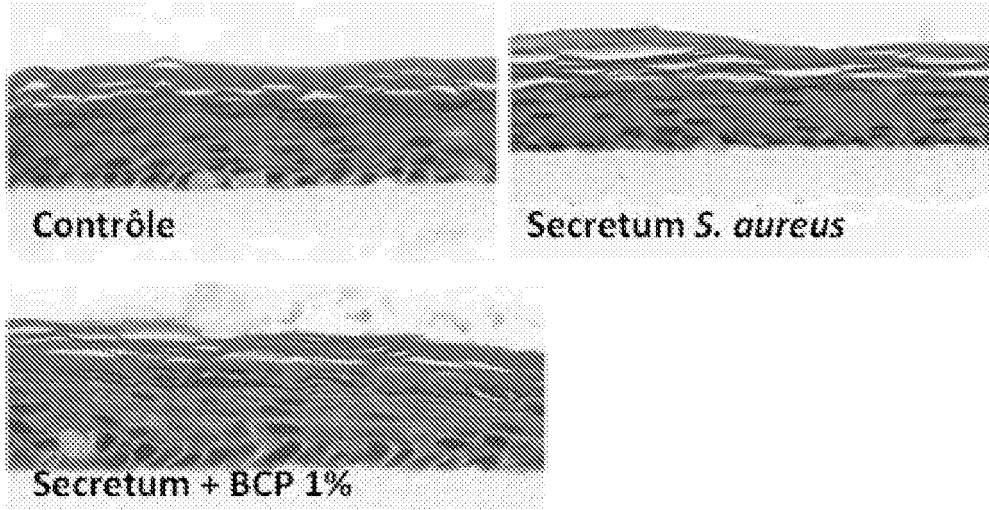
[Fig. 1]



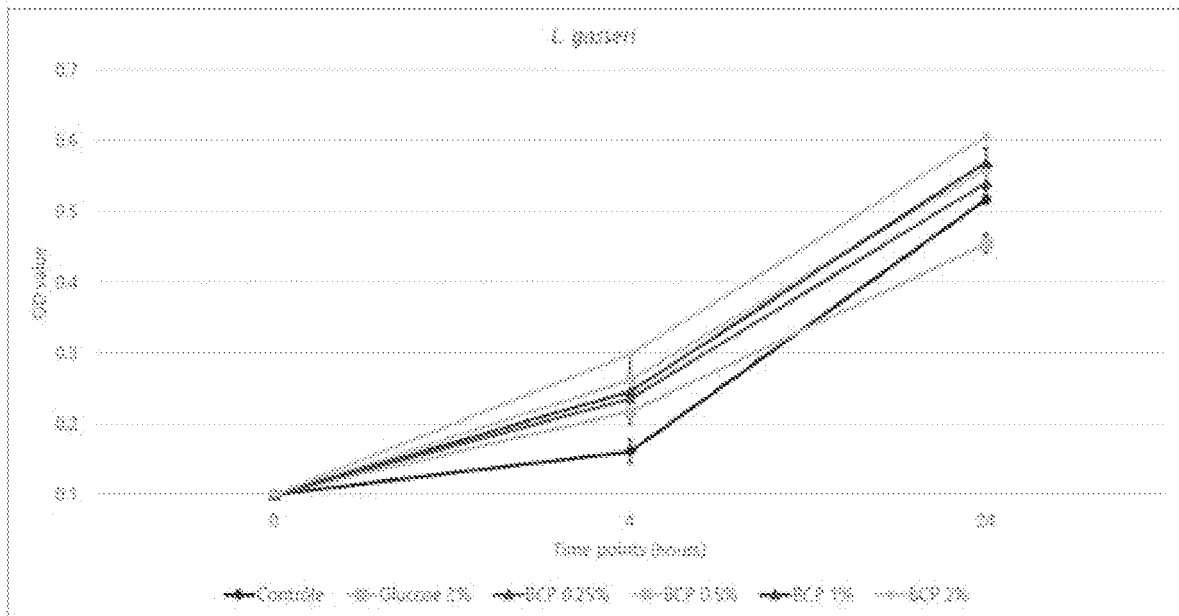
[Fig. 2]



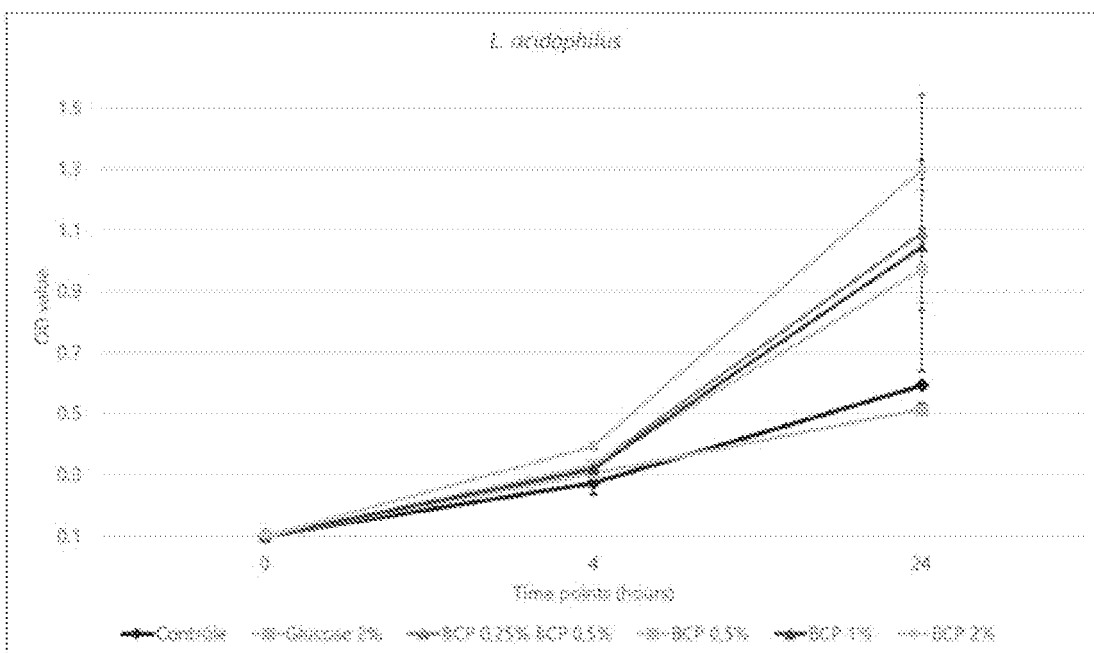
[Fig. 3]



[Fig. 4a]



[Fig. 4b]



RAPPORT DE RECHERCHE

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

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

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

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

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

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

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

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

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

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

DATABASE GNPD [Online]
Intel;
1 février 2018 (2018-02-01),
Anonymous: "Acne-n-Pimples Cream, Himalaya
drug",
XP055787187,
Database accession no. 5472231

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

Gnido Amandine ET AL: "Bombax costatum
(Malvaceae): state of knowns, unknowns and
prospects in West Africa",
Biotechnol. Agron. Soc. Environ.,
1 octobre 2018 (2018-10-01), XP055784211,
Extrait de l'Internet:
URL: https://pdfs.semanticscholar.org/4dde/4d1242e759e9aeb589986548240e40b08b7f.pdf?_ga=2.109179334.2115315662.1616079459-762715481.1615385972
[extrait le 2021-03-10]

WO 2019/122408 A1 (EXPANSCIENCE LAB [FR])
27 juin 2019 (2019-06-27)

Nenonene Amen: "Composition and Binding
Properties of Mucilages from Stem Bark of
Grewia venusta and Calyx of Bombax
costatum, two Tropical Plants Growing Wild
in Togo",
Bangladesh J. Sci. Ind. Res.,
1 janvier 2009 (2009-01-01), XP055784220,
Extrait de l'Internet:
URL: https://pdfs.semanticscholar.org/400f/972ed973e367f3074ab8bba29802558c4e2e.pdf?_ga=2.198080428.2036268127.1615385972-762715481.1615385972
[extrait le 2021-03-10]

DATABASE GNPD [Online]
Intel;
1 décembre 2013 (2013-12-01),
Anonymous: "8Hr Correcting Primer,
black'Up",
XP055787178,
Database accession no. 2247580

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

NEANT

