

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

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

3 080 768

②1 N° d'enregistrement national : **18 53898**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 8/97 (2018.01), A 61 Q 19/00**

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 PROCÉDE COSMETIQUE POUR LUTTER CONTRE LES EFFETS DE LA POLLUTION SUR LA PEAU.

②2 Date de dépôt : 04.05.18.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 08.11.19 Bulletin 19/45.

④5 Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 28.08.20 Bulletin 20/35.

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) : *SOREDEC - SOCIETE DE RECHERCHES ET D'ETUDES COSMETOLOGIQUES Société par actions simplifiée* — FR.

⑦2 Inventeur(s) : VALLERIN STEPHANIE et MAS FLORENT.

⑦3 Titulaire(s) : *SOREDEC - SOCIETE DE RECHERCHES ET D'ETUDES COSMETOLOGIQUES Société par actions simplifiée.*

⑦4 Mandataire(s) : IPSIDE.

FR 3 080 768 - B1



La présente invention s'inscrit dans le domaine du traitement cosmétique de la peau.

Plus particulièrement, elle concerne l'utilisation, pour lutter contre les effets de la pollution atmosphérique sur la peau d'un individu, d'une composition cosmétique à base d'un extrait végétal, plus précisément d'un extrait de la plante *Sambucus nigra*. La présente invention concerne également un procédé de traitement cosmétique de la peau d'un individu pour lutter contre les effets de la pollution atmosphérique.

L'épiderme est constitué de quatre couches cellulaires, dans lesquelles on trouve quatre types de cellules : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. Les kératinocytes sont les cellules les plus abondantes, elles représentent 80% des cellules et naissent dans la couche la plus profonde de l'épiderme. Ces cellules produisent de la kératine, ce phénomène étant qualifié de processus de kératinisation, ce qui leur permet de se différencier et ainsi de migrer vers la surface de l'épiderme. De cette manière, on retrouve les kératinocytes dans toutes les couches de l'épiderme.

Au niveau de la couche la plus profonde, appelée couche basale, les kératinocytes forment une couche monocellulaire et sont ancrés sur la jonction dermo-épidermique par des hémidesmosomes et sur des jonctions intercellulaires latérales par des jonctions serrées ou desmosomes. Dans cette couche basale, les kératinocytes se divisent activement, chacun en donnant naissance à deux cellules filles, dont une qui migre vers la couche supérieure, la couche épineuse.

La couche épineuse est caractérisée par la présence de cellules volumineuses, avec un noyau arrondi et de nombreux desmosomes. Le cytoplasme des cellules est constitué de tonofilaments de kératine en quantité importante.

Au-dessus, la couche granuleuse est formée de trois couches de kératinocytes aplatis. Elle est caractérisée par la présence dans l'espace

extracellulaire de lipides qui jouent le rôle de ciment intracellulaire pour consolider, avec les desmosomes, toujours nombreux, les adhésions cellulaires.

La couche cornée, la plus superficielle, est constituée de cellules
5 aplaties, complètement kératinisées. Les kératinocytes ne contiennent plus de noyaux. Ils deviennent des cornéocytes, remplis de kératine. La membrane plasmique s'épaissit. On distingue deux sous-couches : la couche compacte, en profondeur, qui assure la fonction barrière de l'épiderme, où les desmosomes sont remplacés par les cornéodesmosomes de structure plus
10 simple qui assurent la cohésion entre les cornéocytes ; et la couche desquamante, en surface, où se produit la desquamation des cellules cornées.

Les facteurs environnementaux, et en particulier la pollution atmosphérique, sont des causes importantes de la dégradation de l'épiderme, qui se trouve en contact direct avec l'atmosphère.

15 La pollution atmosphérique est pour l'essentiel d'origine humaine, et elle est due à une mauvaise combustion des combustibles fossiles et de la biomasse. Parmi les principales sources de pollution atmosphérique, figurent les gaz d'échappement des véhicules, les émissions des usines et des centrales énergétiques, qui dégagent des composés organiques volatils, des
20 oxydes d'azote, des oxydes de carbone, de l'ozone, des métaux, des hydrocarbures aromatiques et des particules. A titre de polluants pouvant participer à la pollution atmosphérique, on peut en outre citer les solvants, le dioxyde de soufre, les métaux, la fumée de cigarette, etc. En zone urbaine, les éléments polluants présents dans l'atmosphère se déposent sous forme de
25 poussière, dite poussière urbaine, sur la peau. La peau du visage y est tout particulièrement exposée.

La pollution atmosphérique engendre divers dommages sur la peau, et notamment un ralentissement du renouvellement épidermique, et l'altération des kératinocytes et de la cohésion cellulaire, ces dommages étant en
30 particulier associés à une diminution de la cohésion dermo-épidermique, entraînant la baisse des échanges métaboliques entre le derme et l'épiderme,

une altération des desmosomes et des tonofilaments, ainsi qu'une altération des kératinocytes avec un élargissement des espaces intercellulaires. L'épaisseur globale de l'épiderme diminue, l'homéostasie est modifiée et le renouvellement épidermique ralentit.

5 En ce qui concerne en particulier les kératinocytes, pendant leur migration vers la surface, ils subissent des modifications biochimiques et structurales comme la kératinisation. Les kératines, protéines complexes, sont présentes au niveau des différentes couches de l'épiderme avec des structures et des propriétés différentes. La synthèse de la protéine débute dans la couche
10 basale et se termine dans la cellule cornée. La différenciation se traduit également par l'apparition d'une matrice fibreuse intracornéocytaire, formée par l'agrégation de filaments de cytokératines grâce à la filaggrine formée lors de la transition du kératinocyte granuleux au cornéocyte. La kératine y est insoluble et résistante. Dans la partie supérieure de la couche cornée, la
15 filaggrine est complètement protéolysée, produisant des acides aminés permettant l'hydratation de la couche superficielle de l'épiderme (facteurs naturels d'hydratation, dits NMF). Au niveau de la couche granuleuse, les kératinocytes extrudent leur contenu lipidique (cholestérol, acides gras, céramides) dans l'espace intercellulaire. Ces lipides s'organisent en feuillets
20 intercornéocytaire jouant un rôle important dans la cohésion entre les cornéocytes. Au niveau de la couche cornée, il se forme une coque protéique rigide et résistante sous la membrane plasmique assurant la résistance du stratum cornéum, c'est la cornification. Des liaisons covalentes se forment entre différentes protéines (lochrine, involucrine, cornifine, filaggrine, cornéodesmosine...) catalysées par une activité transglutaminase. La dernière
25 étape de différenciation correspond à la desquamation, au cours de laquelle se produit une destruction des membranes lipido-protéiques cornéocytaires et la dégradation enzymatique des cornéodesmosomes.

 Au niveau de l'épiderme, la cohésion cellulaire est assurée par les
30 jonctions adhérentes et les jonctions serrées. Les jonctions adhérentes assurent l'intégrité physique de l'épithélium en joignant les filaments d'actine de

deux cellules voisines. L'adhérence cellule-cellule fait intervenir différents types de protéines, dont les cadhérines. Les jonctions serrées sont des jonctions étanches qui ceinturent la cellule. Elles créent des occlusions qui interdisent entièrement la diffusion latérale des protéines ; l'espace intercellulaire est
5 totalement obturé. Au niveau des jonctions adhérentes, les cadhérines assurent une adhérence intercellulaire de type Ca^{2+} -dépendante. Elles jouent un rôle essentiel dans l'adhérence entre les cellules et le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaire. Au niveau des jonctions serrées, les cadhérines forment des complexes avec des phosphoprotéines appelées
10 zonula occludine-1 et 2. Les éléments principaux contribuant à la formation de cette jonction sont deux protéines nommées claudine et occludine.

Les desmosomes sont constitués de deux plaques denses protéiques situées sur la face interne des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes, entre lesquelles on observe une ligne dense centrale appelée
15 Desmoglie, qui est constituée de glycoprotéines transmembranaires, permettant l'adhésion locale de deux cellules en joignant leurs filaments intermédiaires. Les glycoprotéines transmembranaires appartiennent à la famille des cadhérines et comprennent les desmoglénines 1 et 3 et les desmocollines I et II, qui forment des interactions homophiles et hétérophiles
20 entre elles.

Les cornéodesmosomes, résultant d'un remaniement des desmosomes au cours de la transformation kératinocyte-cornéocyte, sont responsables de la cohésion de la couche cornée. Les composés extracellulaires des cornéodesmosomes contiennent les cadhérines et la
25 cornéodesmosine aux propriétés d'adhésivité.

En outre, l'activation kératinocytaire peut, suite à une agression extérieure par la pollution, déclencher une réaction inflammatoire. Les kératinocytes participent alors à la réponse immunitaire cutanée en produisant des cytokines pro-inflammatoires, telles que les interleukines et les
30 chimiokines.

La présente invention vise à proposer un moyen efficace pour lutter contre les effets néfastes de la pollution atmosphérique sur la peau.

A l'origine de l'invention, il a été découvert par les présents inventeurs qu'un extrait végétal particulier permet d'atteindre un tel objectif, notamment
5 lorsqu'il est mis en œuvre par application par voie topique sur la peau.

Cet extrait végétal permet en particulier d'agir efficacement contre l'ensemble des désordres cutanés qui sont induits par la pollution atmosphérique, notamment d'agir, à la fois, contre le ralentissement du renouvellement épidermique, contre l'altération des kératinocytes et de la
10 cohésion cellulaire et contre les phénomènes inflammatoires déclenchés par l'exposition de la peau à la pollution.

Parmi ses multiples effets bénéfiques, il a notamment été découvert par les présents inventeurs que cet extrait végétal active la différenciation des kératinocytes, ce qui participe à lutter contre les effets du vieillissement cutané,
15 qu'il améliore la cohésion cellulaire et rétablit les échanges métaboliques altérés par la pollution, et qu'il réduit l'expression des cytokines pro-inflammatoires produites par les kératinocytes.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention concerne l'utilisation cosmétique, non thérapeutique, pour lutter contre les effets de la
20 pollution atmosphérique sur la peau d'un individu, d'une composition cosmétique contenant un extrait de *Sambucus nigra* dans un véhicule cosmétiquement acceptable.

On entend dans la présente description, par lutter contre les effets de la pollution atmosphérique sur la peau, aussi bien le fait de prévenir ces effets
25 néfastes, que celui de réparer les désordres cutanés induits par la pollution atmosphérique sur la peau. Cette définition exclut notamment la lutte contre les effets des rayonnements ultra-violets sur la peau.

On englobe ici, dans le terme « peau », aussi bien la peau elle-même que les muqueuses, notamment les lèvres.

La composition cosmétique selon l'invention est de préférence adaptée pour une application par voie topique sur la peau.

La plante *Sambucus nigra*, également nommée sureau noir, ou grand sureau, appartient à la famille des Caprifoliacées. C'est un arbuste à écorce
5 fendillée et à feuilles imparipennées, qui peut mesurer jusqu'à 6 mètres de haut et possède des grandes inflorescences de fleurs blanches à l'odeur très marquée. Ses baies noires à suc rouge violacé et à trois graines murissent dans la fin de l'été, et présentent un diamètre d'environ 6 cm.

Comme exposé ci-avant, il a été découvert par les présents inventeurs
10 qu'un extrait de cette plante, et tout particulièrement un extrait obtenu à partir des fruits de cette plante (ces fruits étant également désignés par le terme « baies » dans la présente description), permet de réduire efficacement les effets néfastes de la pollution environnementale sur la peau, notamment en application par voie topique sur la peau. L'extrait de baies de sureau noir est
15 notamment capable de favoriser la cohésion des kératinocytes et leur différenciation en stimulant l'expression génique. Il est capable de diminuer le phénomène inflammatoire des kératinocytes et d'augmenter leur viabilité lorsqu'ils sont exposés à la poussière urbaine. Il permet notamment de réduire l'expression des gènes impliqués dans les phénomènes d'inflammation au
20 niveau des kératinocytes, ainsi que de piéger les radicaux libres, ce qui participe également avantageusement à lutter contre les effets néfastes de la pollution atmosphérique sur la peau.

En particulier, un test d'exposition de kératinocytes humains normaux
25 intoxiqués par la poussière urbaine, en présence d'un extrait de *Sambucus nigra* conforme à l'invention, démontre un effet protecteur particulièrement important de cet extrait sur ces kératinocytes. Cet effet se traduit notamment par une diminution de la libération des interleukines 8 pour les cellules intoxiquées et par une augmentation de la viabilité cellulaire des cellules intoxiquées.

30 La poussière urbaine désigne ici un matériau particulaire atmosphérique collecté en zone urbaine, qui contient notamment des

hydrocarbures aromatiques polycycliques et des dérivés nitrés, des polychlorobiphényles et des pesticides chlorés, de l'éther décabromodiphényle, des dibenzo-p-dioxines et des dibenzofuranes polychlorés.

L'extrait de *Sambucus nigra* conforme à l'invention présente en outre un effet prodifférenciant sur la différenciation des kératinocytes, notamment par stimulation des gènes codant pour la filaggrine (FLG), l'involucrine (IVL), la transglutaminase 1 (TGM1), la loricrine (LOR), la petite protéine riche en proline de type 1B (SPRR1B) et la petite protéine riche en proline de type 1A (SPRR1A) ; un effet de stimulation des gènes de la jonction serrée et de la jonction adhérente, tels que les gènes codant pour l'envoplakine (EVPL), la cornéodesmosine (CDSN), la desmogléine 1 (DSG1) et la desmocolline 1 (DSC1) ; ainsi qu'un effet d'inhibition de l'expression des gènes codant pour les marqueurs de l'inflammation, la chimiokine (motif C-C) ligand 20 (CCL20), l'interleukine 1, alpha (IL1A), l'interleukine 8 (IL8) et la chimiokine (motif C-X-C) ligand 1 (CXCL1). Ceci se traduit par une meilleure efficacité de la fonction barrière de la peau, une meilleure hydratation de cette dernière et un effet apaisant.

L'extrait de *Sambucus nigra* conforme à l'invention présente en outre avantageusement un effet antioxydant et de diminution de la peroxydation lipidique.

Ainsi, cet extrait de *Sambucus nigra* peut avantageusement être utilisé, selon l'invention, pour lutter contre, c'est-à-dire prévenir et/ou réparer, le vieillissement de la peau induit par la pollution atmosphérique, pour augmenter l'hydratation de la peau exposée à la pollution, pour apaiser les irritations causées à la peau par la pollution et/ou pour maintenir ou améliorer sa souplesse, cette liste d'effets bénéfiques de l'extrait de *Sambucus nigra* selon l'invention n'étant nullement limitative.

De manière préférentielle, l'extrait de *Sambucus nigra* mis en œuvre est un extrait d'une partie aérienne de la plante, et plus particulièrement de ses baies. Il peut s'agir notamment d'un extrait obtenu à partir de baies séchées.

Cet extrait peut-être obtenu par toute méthode d'extraction connue en elle-même, par exemple par macération, infusion, décoction, etc.

Préférentiellement, l'extrait de *Sambucus nigra* mis en œuvre selon l'invention est obtenu par macération.

5 Dans des modes de mise en œuvre particuliers de l'invention, l'extrait de *Sambucus nigra* est obtenu par extraction hydro-alcoolique d'une partie aérienne de la plante, de préférence par extraction hydro-alcoolique de baies de *Sambucus nigra*.

10 L'extraction peut par exemple être réalisée dans un mélange d'eau et de glycol. Elle est de préférence réalisée dans un mélange d'eau et de pentylène glycol. Le pentylène glycol présente notamment l'avantage d'être un solvant 100 % naturel, obtenu à partir de la valorisation de résidus de maïs et de canne à sucre.

15 De manière plus générale, les ingrédients entrant dans la constitution de la composition cosmétique mise en œuvre selon l'invention sont de préférence choisis pour être d'origine naturelle, et/ou pour pouvoir être obtenus de manière respectueuse pour l'environnement.

La proportion de glycol dans l'eau est notamment comprise entre 20 et 70 % en volume, par rapport au volume total du mélange eau / glycol.

20 L'extraction peut par exemple être réalisée à température ambiante.

Un extrait de baies de *Sambucus nigra* pouvant être mis en œuvre selon l'invention répond notamment à l'une ou plusieurs, de préférence à l'ensemble, des caractéristiques ci-après :

- une composition 100% naturelle,
- 25 - une masse sèche comprise entre 0,5 et 10 %, de préférence comprise entre 1,55 et 4,55 %,
- un pH compris entre 3 et 8, de préférence compris entre 4 et 6,

- une densité comprise entre 0,7 et 1,4, de préférence comprise entre 0,8 et 1,2,
- une concentration en flavonoïdes comprise entre 100 et 5000 µg/mL, de préférence comprise entre 300 et 1500 µg/mL, cette concentration étant déterminée par un dosage colorimétrique selon la méthode de Dowd décrite par Subhashree Venugopal et al., dans *Journal of Pharmacy Research* 2011, 4(2), 464-466,
- une concentration en anthocyanine comprise entre 50 et 3000 µg/mL, de préférence comprise entre 100 et 1000 µg/mL, cette concentration étant déterminée selon la méthode du pH différentiel décrite dans la publication de Giusti et Wrolstad, dans *Current protocols in food analytical chemistry*, 2001, F1.2.1-F1.2.13, ou encore dans la publication de Wrolstad et al., dans *Food Science & Technology* 16, 2005, 423-428,
- une concentration en kuromanine supérieure ou égale à 20 µg/mL, de préférence supérieure ou égale à 30 µg/mL, cette concentration étant déterminée par chromatographie liquide haute performance (HPLC), selon la méthode décrite dans l'article de Perati et al., pour Thermo Fisher Scientific, « Rapid Separation of Anthocyanins in Cranberry and Bilberry Extracts Using a Core-Shell Particle Column » (2016) (cet article étant consultable à l'adresse internet : https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/posters/PN70895_EAS2013.pdf),
- et/ou une concentration en sucres comprise entre 5000 et 20000 µg/mL, de préférence comprise entre 13000 et 12000 µg/mL, cette concentration étant déterminée par un dosage colorimétrique des sucres selon la méthode décrite dans la publication de Dubois, dans *Nature* 4265, 1951, 168-167.

La composition cosmétique selon l'invention comporte de préférence une quantité dudit extrait de *Sambucus nigra* comprise entre 0,25 et 2 % en

poids par rapport au poids total de la composition.

Cette composition cosmétique peut en outre comporter un ou plusieurs autres agents actifs, notamment par voie topique, par exemple choisis parmi les agents antioxydants, les actifs hydrophiles ou lipophiles, les vitamines, les agents hydratants, les huiles, les agents anti-UV, les vésicules lipidiques, etc.,
5 ou l'un quelconque de leurs mélanges.

Dans des modes de mise en œuvre particuliers de l'invention, la composition cosmétique contient en outre un extrait d'*Eleutherococcus senticosus*, de préférence de racines de la plante.

10 L'extrait de la plante *Eleutherococcus senticosus*, couramment désignée par le terme éléuthérocoque, présente avantageusement un effet énergisant.

L'extrait d'*Eleutherococcus senticosus* peut par exemple être obtenu par extraction, par exemple par macération, de racines de la plante dans un mélange d'eau et de glycol, par exemple d'eau et de propylène glycol.
15

La composition cosmétique mise en œuvre selon l'invention peut en outre contenir tout additif classique en lui-même pour une composition cosmétique, par exemple un ou plusieurs des ingrédients suivants : colorant, pigment, conservateur, parfum, agent émoullient et/ou humectant, tensioactif, émulsionnant, gélifiant, absorbant, agent stabilisant, diluant, agent neutralisant, etc.
20

La composition cosmétique mise en œuvre selon l'invention peut comporter tout véhicule cosmétiquement acceptable classique en lui-même, ce véhicule étant toutefois choisi pour être chimiquement inerte vis-à-vis de l'extrait de *Sambucus nigra* mis en œuvre.
25

Par véhicule cosmétiquement acceptable, on entend un véhicule compatible avec la peau, les muqueuses, y compris l'intérieur des paupières et les lèvres, les ongles, les cheveux, et d'une manière générale toutes les matières kératiniques, notamment les cils.

Le véhicule mis en œuvre est par exemple l'eau.

Préférentiellement, le véhicule utilisé est choisi pour être adapté à une application de la composition cosmétique par voie topique sur la peau de l'individu concerné.

5 A cet égard, dans des modes de mise en œuvre particulièrement préférés de l'invention, la composition cosmétique convient pour une application par voie topique, et l'invention prévoit l'utilisation de cette composition cosmétique par application par voie topique d'une quantité adéquate de cette composition cosmétique sur la peau de l'individu concerné,
10 notamment sur une zone de la peau qui est exposée ou susceptible d'être exposée à la pollution atmosphérique, par exemple sur le visage et le cou, sur les mains et/ou sur le corps.

 La composition mise en œuvre selon l'invention peut se présenter sous toute forme classique en elle-même, par exemple sous forme d'une
15 crème ; d'une pommade ; d'un gel, par exemple anhydre ou huileux ; d'une solution ou d'une lotion, par exemple aqueuse, hydroalcoolique ou huileuse ; d'un lait ; d'un sérum ; ou d'une émulsion, par exemple de consistance liquide ou semi-liquide, du type lait, obtenue par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse ou inversement, ou de de consistance molle, semisolide
20 ou solide du type crème, gel, ou encore du type micro-émulsion.

 Elle peut notamment se présenter sous forme d'une crème de protection, de traitement ou de soin pour le visage, pour les mains ou pour le corps, d'un lait corporel de protection ou de soin, d'une lotion, d'un gel ou d'une mousse pour le soin de la peau.

25 Elle peut autrement se présenter sous forme d'une dispersion, du type lotion ou sérum, ou encore de micro-capsules, de micro-particules, ou de dispersions vésiculaires de type ionique et/ou non ionique et similaires.

 La composition cosmétique mise en œuvre selon l'invention peut par exemple être appliquée par voie topique, sur la zone de peau de l'individu
30 concerné, notamment sur les zones de peau exposées ou susceptibles d'être

exposées à la pollution atmosphérique, en quantité efficace, à raison d'une ou deux fois par jour, par exemple le matin et le soir, et par exemple pendant une période comprise entre 1 semaine et 2 mois ou plus.

Selon l'invention, la composition cosmétique peut en particulier être
5 utilisée pour lutter contre les effets, sur la peau, de la pollution atmosphérique résultant de la présence de poussière urbaine dans l'atmosphère. Elle est particulièrement efficace à cet effet. Elle peut notamment être utilisée pour augmenter la viabilité cellulaire des kératinocytes humains normaux intoxiqués par la poussière urbaine, ce qui participe avantageusement à lutter contre les
10 effets de la pollution atmosphérique sur la peau.

La composition cosmétique mise en œuvre selon l'invention peut en particulier être utilisée pour stimuler l'expression de gènes codant pour des protéines favorisant la cohésion cellulaire (par exemple EVPL, CDSN, DSG1, DSC1), et améliorer ainsi la jonction cellulaire, et/ou pour stimuler l'expression
15 de gènes codant pour des protéines favorisant la différenciation des kératinocytes humains normaux (par exemple FLG, IVL, TGM1, LOR, SPRR1B, SPRR1A), et présenter ainsi un effet pro-différenciant sur ces kératinocytes. Ces actions participent elles aussi avantageusement à la lutte contre les effets négatifs de la pollution atmosphérique sur la peau.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne en outre un
20 procédé de traitement cosmétique, non-thérapeutique, pour lutter contre les effets de la pollution atmosphérique sur la peau d'un individu. Ce procédé comprend l'administration, notamment l'application par voie topique sur la peau dudit individu, d'une composition contenant un extrait de *Sambucus nigra*, en
25 particulier un extrait de baies de *Sambucus nigra*.

Ce procédé peut répondre à l'une ou plusieurs des caractéristiques décrites ci-avant dans la présente description.

Les caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront plus
clairement à la lumière des exemples ci-après, fournis à simple titre illustratif et
30 nullement limitatifs de l'invention, avec l'appui des figures 1 à 3, dans

lesquelles :

- la figure 1 montre un graphe en barres représentant le % d'expression de 7 gènes spécifiques des jonctions serrées et des jonctions adhérentes pour des kératinocytes humains normaux cultivés en présence d'un
5 extrait de baies de *Sambucus nigra* conforme à l'invention, à une concentration de 0,5 % p/p dans le milieu de culture, par rapport au témoin sans extrait, pour lequel le niveau d'expression de chacun de ces gènes est fixé à 100 % ;

- la figure 2 montre un graphe en barres représentant le % d'expression de 6 gènes spécifiques de la différenciation cellulaire pour des
10 kératinocytes humains normaux cultivés en présence d'un extrait de baies de *Sambucus nigra* conforme à l'invention, à une concentration de 0,5 % p/p dans le milieu de culture, par rapport au témoin sans extrait, pour lequel le niveau d'expression de chacun de ces gènes est fixé à 100 % ;

- et la figure 3 montre un graphe en barres représentant le %
15 d'expression de 4 gènes spécifiques de l'inflammation pour des kératinocytes humains normaux cultivés en présence d'un extrait de baies de *Sambucus nigra* conforme à l'invention, à une concentration de 0,5 % p/p dans le milieu de culture, par rapport au témoin sans extrait, pour lequel le niveau d'expression de chacun de ces gènes est fixé à 100 %.

20

A/ Préparation d'un extrait de fruits de *Sambucus nigra*

Un procédé d'extraction de baies de *Sambucus nigra* est réalisé comme suit.

Des baies de *Sambucus nigra* sont séchées, à une température
25 inférieure à 50°C, puis les baies séchées sont soumises à macération dans un solvant constitué de pentylène glycol (Pentiol Green+® commercialisé par la société Minasolve®) et d'eau, contenant de 20 à 70 % en volume de pentylène glycol. A cet effet, les baies sont introduites à hauteur de 5 à 20 % en masse dans le mélange eau/pentylène glycol.

30 Le mélange est agité pendant 10 à 72 h à température ambiante et à

l'abri de la lumière, puis filtré.

On obtient un extrait sous forme d'une solution liquide de couleur bordeaux, présentant une masse sèche comprise 1,55 et 4,55 %, un pH compris entre 4 et 6 et une densité comprise entre 0,8 et 1,2.

5 Sa concentration en flavonoïdes est comprise entre 300 et 1500 µg/mL, sa concentration en anthocyanine est comprise entre 100 et 1000 µg/mL (dont une concentration en kuromanine supérieure à 30 µg/mL), et sa concentration en sucres est comprise entre 13 000 et 12 000 µg/mL.

10 L'absence de cytotoxicité de cet extrait a été démontrée par un test d'évaluation de son potentiel irritant par application directe sur monocouche de fibroblastes de cornée de lapin, par la méthode de relargage du rouge neutre, ainsi que par un test d'évaluation de son potentiel irritant sur un modèle de peau reconstruite.

Cet extrait est en outre non phototoxique et non sensibilisant.

15

B/ Tests d'efficacité de l'extrait de baies de *Sambucus nigra*

B.1/ Protection contre les effets de l'exposition à la poussière urbaine

20 L'évaluation de l'effet protecteur contre la pollution urbaine de l'extrait de baies de sureau noir obtenu à l'exemple A/ ci-dessus a été conduite à partir d'un modèle de kératinocytes humains normaux NHEK intoxiqués par la poussière urbaine. La poussière utilisée a été récoltée en zone urbaine, et est constituée principalement d'hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAH), de dérivés nitrés d'hydrocarbures polycycliques aromatiques, de polychlorobiphényles et pesticides organochlorés, de poly-bromo-diphényl-
25 éthers et de polychlorodibenzo-p-dioxines et dibenzofuranes.

La poussière urbaine utilisée pour ce test est plus particulièrement conforme au Standard Reference Material® 1649b du National Institute of Standards & Technology des Etats-Unis, daté du 23 février 2009. Une telle

poussière urbaine est notamment commercialisée par la société Sigma Aldrich, sous la dénomination Urban dust NIST® SRM® 1649b.

L'effet protecteur de l'extrait a été évalué d'une part par sa capacité à inhiber le phénomène inflammatoire par le biais de la libération des interleukines 8, et d'autre part par sa capacité à augmenter la viabilité des
5 kératinocytes.

Un test préliminaire de cytotoxicité a été conduit afin de vérifier la viabilité des kératinocytes en présence de l'extrait, par la méthode de réduction au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium), par
10 suivi de la densité optique DO, et l'observation morphologique au microscope après 72 h d'incubation en milieu de culture. Il a ainsi été vérifié que les concentrations sélectionnées pour le test sont non cytotoxiques.

Les kératinocytes ont étéensemencés en plaque de 96 puits et cultivés en milieu de culture (milieu Keratinocyte-SFM complété avec du
15 facteur de croissance épidermal à 0,25 ng/ml, de l'extrait pituitaire à 25 µg/ml et de la gentamycine à 25 µg/ml) pendant 24 h, à 37 °C et 5 % de dioxyde de carbone. Le milieu a ensuite été remplacé par un milieu contenant ou non (témoin intoxiqué) l'extrait, à une concentration de 0,37 ou 0,5 % p/p, et les cellules ont été intoxiquées à la poussière urbaine à une concentration de
20 0,5 mg/mL, puis incubées pendant 72 h. En parallèle, un témoin non intoxiqué a été réalisé.

Le surnageant a ensuite été isolé pour doser les interleukines 8 (IL-8) par un kit de dosage par la méthode immuno-enzymatique ELISA (pour
l'anglais « enzyme-linked immunosorbent assay »). Chaque condition a été
25 testée trois fois, et la valeur moyenne a été calculée.

Le tapis cellulaire a en outre été analysé pour évaluer la viabilité cellulaire à l'aide du test de réduction au MTT.

Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau 1 ci-après.

Conditions	Données de base		Données normalisées	Viabilité cellulaire
	IL-8 (pg/ml)	% du témoin intoxiqué	% de protection	% du témoin intoxiqué
Témoin non intoxiqué	135	40	100	133
Témoin intoxiqué	342	100	0	100
Témoin intoxiqué + Extrait à 0,37 % p/p	175	51	81	106
Témoin intoxiqué + Extrait à 0,50 % p/p	153	45	92	112

Tableau 1 – Effet de l'extrait de baies de *Sambucus nigra* sur la libération des IL-8 et la viabilité cellulaire pour des kératinocytes humains normaux intoxiqués par la poussière urbaine

Comme on peut le voir, dans les conditions « témoin non intoxiqué », la libération des IL-8 par les kératinocytes humains normaux s'est révélée faible (135 pg/mL). L'intoxication des cellules par la poussière urbaine a stimulé le relargage du médiateur inflammatoire à 342 pg/mL en diminuant la viabilité cellulaire.

L'extrait de baies de sureau noir obtenu à l'exemple A/, testé à 0,5 % p/p, a protégé les cellules contre l'effet de la pollution urbaine en diminuant de 92 % la quantité d'IL-8 par rapport au témoin intoxiqué, et a également augmenté la viabilité cellulaire par rapport au témoin intoxiqué. A 0,37 % p/p, cet extrait s'est également révélé particulièrement efficace.

Ces résultats démontrent que l'extrait de baies de sureau noir mis en œuvre a un effet protecteur des cellules de l'épiderme contre l'intoxication par la poussière urbaine.

B.2/ Amélioration de la cohésion cellulaire

L'évaluation de l'effet de l'extrait de baies de sureau noir obtenu à l'exemple A/ ci-avant sur la cohésion cellulaire a été réalisée sur un modèle de kératinocytes humains normaux, en conditions basales, par analyse de l'expression (ARNm) de 7 marqueurs spécifiques des jonctions serrées et des

jonctions adhérentes, les gènes : CLDN1 (Claudine 1), CLDN4 (Claudine 4), EVPL (Envoplakine), CDSN (Cornéodesmosine), DSG1 (Desmogléine 1), DSC1 (Desmocolline 1) et CGN (Cirguline).

A cet effet, les kératinocytes ont étéensemencés en plaque de 24 puits et cultivés en milieux de culture (milieu Keratinocyte-SFM complé-
5 menté avec du facteur de croissance épidermal à 0,25 ng/ml, de l'extrait pituitaire à 25 µg/ml et de la gentamycine à 25 µg/ml) pendant 24 h, à 37 °C et 5 % de dioxyde de carbone. Le milieu a ensuite été remplacé par un milieu contenant ou non l'extrait de baies de sureau noir ou un composé référence (chlorure de
10 calcium à 1,5 mM). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 48 h, puis les ARN totaux en ont été extraits, de manière classique en elle-même.

L'expression des marqueurs a été évaluée par transcription inverse suivie par polymérisation par réaction en chaîne (RT-PCR) sur les ARN totaux extraits des cellules. Les ADN complémentaires ont été synthétisés par
15 transcription inverse des ARN totaux. Les réactions de PCR ont ensuite été réalisées par PCR quantitative.

Un test préalable de cytotoxicité a été mené afin de vérifier la viabilité cellulaire en présence de l'extrait de baies de sureau noir, par la méthode de réduction au MTT (par suivi de la densité optique DO) et l'observation
20 morphologique au microscope, après 48 h d'incubation des cellules en milieu de culture. Il a été vérifié que la concentration 0,5 % p/p en l'extrait est non cytotoxique.

Les résultats obtenus sont montrés sur la figure 1.

Comme on peut le voir sur cette figure, l'extrait selon l'invention à une
25 concentration de 0,5 % p/p a conduit à une stimulation de l'ensemble des marqueurs testés, avec une stimulation très significative de 4 marqueurs de la jonction serrée et jonction adhérente (EVPL, CDSN, DSG1, DSC1), notamment de DSG1 et DSC1.

Ceci démontre l'effet de cet extrait au niveau de l'adhésion des cellules, par le biais de la stimulation des cadhérines telles que les desmoglénines et les desmocollines.

5 B.3/ Effet sur la différenciation des kératinocytes

L'évaluation de l'effet de l'extrait de baies de sureau noir obtenu à l'exemple A/ ci-avant sur la différenciation des kératinocytes a été réalisée sur un modèle de kératinocytes humains normaux, en conditions basales, par analyse de l'expression (ARNm) de 6 marqueurs spécifiques de la
10 différenciation des kératinocytes, les gènes : FLG (Filaggrine), IVL (Involucrine), TGM1 (Transglutaminase 1), LOR (Loricrine), SPRR1B (Petite protéine riche en proline de type 1B), SPRR1A (Petite protéine riche en proline de type 1A).

Les kératinocytes ont étéensemencés en plaque de 24 puits et
15 cultivés en milieu de culture, dans les conditions indiquées dans l'exemple B.2/ ci-avant, pendant 24 h. Le milieu a ensuite été remplacé par un milieu contenant ou non l'extrait de baies de sureau noir ou un composé référence (chlorure de calcium à 1,5 mM). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 48 h.

20 L'expression des marqueurs a été évaluée par transcription inverse suivie par polymérisation par réaction en chaîne (RT-PCR) sur les ARN totaux extraits des cellules. Les ADN complémentaires ont été synthétisés par transcription inverse des ARN totaux. Les réactions de PCR ont ensuite été réalisées par PCR quantitative.

25 Un test préalable de cytotoxicité a été mené afin de vérifier la viabilité cellulaire en présence de l'extrait de baies de sureau noir, par la méthode de réduction au MTT (par suivi de la densité optique DO) et l'observation morphologique au microscope, après 48 h d'incubation en milieu de culture. Il a été vérifié que la concentration 0,5 % p/p en l'extrait est non cytotoxique.

30 Les résultats obtenus sont montrés sur la figure 2.

On y observe que l'extrait de baies de *Sambucus nigra* à 0,5 % p/p dans le milieu de culture a conduit à une stimulation de tous les marqueurs de la différenciation (FLG, IVL, TGM1, LOR, SPRR1B, SPRR1A), avec une expression de TGM1 et FLG particulièrement forte.

5 Ceci démontre l'effet de cet extrait au niveau de la différenciation des kératinocytes, par action sur l'expression des gènes de la filaggrine, de l'involucrine, de la transglutaminase, de la lochrine et des protéines riches en proline.

10 B.4/ Effet anti-inflammatoire

L'évaluation de l'effet de l'extrait de baies de sureau noir obtenu à l'exemple A/ ci-avant sur le phénomène inflammatoire a été réalisée sur un modèle de kératinocytes humains normaux, en conditions basales, par analyse de l'expression (ARNm) de 4 marqueurs spécifiques de l'inflammation, les
15 gènes : CCL20 (Chimiokine (motif C-C) ligand 20), IL1A (Interleukine 1, alpha), IL8 (Interleukine 8) et CXCL1 (Chimiokine (motif C-X-C) ligand 1 (facteur stimulateur de croissance du mélanome, alpha)).

Les kératinocytes ont étéensemencés en plaque de 24 puits et cultivés en milieu de culture, dans les conditions indiquées dans l'exemple B.2/
20 ci-avant, pendant 24 h. Le milieu a ensuite été remplacé par un milieu contenant ou non l'extrait de baies de sureau noir ou un composé référence (chlorure de calcium à 1,5 mM). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 48 h.

L'expression des marqueurs a été évaluée par transcription inverse
25 suivie par polymérisation par réaction en chaîne (RT-PCR) sur les ARN totaux extraits des cellules. Les ADN complémentaires ont été synthétisés par transcription inverse des ARN totaux. Les réactions de PCR ont ensuite été réalisées par PCR quantitative.

Un test préalable de cytotoxicité a été mené afin de vérifier la viabilité
30 cellulaire en présence de l'extrait de baies de sureau noir, par la méthode de

réduction au MTT (par suivi de la densité optique DO) et l'observation morphologique au microscope, après 48 h d'incubation en milieu de culture. Il a été vérifié que la concentration 0,5 % p/p en l'extrait est non cytotoxique.

Les résultats obtenus sont montrés sur la figure 3.

5 On y observe que l'extrait de baies de *Sambucus nigra* à 0,5 % p/p dans le milieu de culture a conduit à l'inhibition des marqueurs de l'inflammation (CCL20, IL1A, IL8, CXCL1), avec une forte inhibition d'IL8 et CXCL1.

10 Ceci démontre l'effet de cet extrait au niveau de l'inflammation des kératinocytes, par action sur l'inhibition de l'expression des gènes codant pour les interleukines 8, ldes chimiokines ligand 1 et 20 et les interleukines 1 alfa.

B.5/ Effet antioxydant

15 L'activité de piègeur de radicaux libres de l'extrait de baies de *Sambucus nigra* obtenu à l'exemple A/ ci-avant a été évaluée par le test au DPPH (1,1-diphényl-2-picrilhydrazyl), mis en œuvre selon le protocole décrit dans la publication de Buenger et al., dans *International Journal of Cosmetic Science*, 28, 2006, 135-145.

20 Le résultat de ce test est exprimé en % de piégeage de radicaux libres. Le DPPH est un radical stable de par la délocalisation d'un électron libre autour de la molécule. Cet électron célibataire engendre une coloration violette du DPPH caractérisée par une bande d'absorption centrée à 520 nm. Lorsque le DPPH est mélangé à une substance capable de donner un atome d'hydrogène, le DPPH passe sous forme réduite et la couleur disparaît. L'acide
25 ascorbique est utilisé en tant que témoin positif.

L'absorbance étant diminuée par la réduction du radical DPPH, le pourcentage d'inhibition de ce radical se calcule selon l'équation :

% de réduction du DPPH = % d'inhibition du DPPH = $(A_0 - A_e) / A_0$

où A_0 représente l'absorbance de la référence (acide ascorbique) et

A_e représente l'absorbance de l'échantillon testé

Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau 2 ci-dessous.

Substance testée	Concentration	% d'inhibition
Acide ascorbique	0,1 mg/ml	97,47
Extrait selon l'invention	0,25 % p/p	91,21

5 Tableau 2 – Activité de piégeage de radicaux libres d'un extrait de baies de *Sambucus nigra* mesurée par le test DPPH

Comme on peut le constater, l'extrait de baies de sureau noir, dès la concentration de 0,25 % p/p, présente une efficacité importante et permet d'inhiber 91 % des radicaux DPPH.

10

C/ Composition cosmétique

Une composition cosmétique conforme à la présente invention, sous forme de crème, contenant en tant qu'actif anti-pollution un extrait de baies de *Sambucus nigra* tel qu'obtenu à l'exemple A/, répond à la composition indiquée dans le tableau 3 ci-après.

15

Dans ce tableau, les pourcentages de chaque constituant sont indiqués en % en poids par rapport au poids total de la composition (% p/p).

L'extrait de racines d'*Eleutherococcus senticosus* est un extrait liquide obtenu par extraction par un mélange de propylène glycol et d'eau (50/50), contenant 1 à 2 % de masse sèche et de densité comprise entre 1,01 et 1,06.

20

Ingrédient	Fonction	% p/p
Copolymère d'ammonium acryloyldiméthyltaurate / vinylpyrrolidone	gélifiant	0,5-2
Beurre de karité / tocophérol	huile végétale	2-10
Butylène glycol	humectant	2-10
Stéarate de glycéryle /cétéareth-12/ alcool cétéarylique	émulsionnant	2-10
Glycérine	humectant	2-10
Alcool cétylique	stabilisant	0,5-5
Triglycérides capryliques / capriques	émollient	5-10
Caprylyl glycol/ acide caprylhydroxamique /glycérine	conservateur	0,1-1
Extrait de racines d' <i>Eleutherococcus senticosus</i>	actif	0,2-2
Extrait de fruits de <i>Sambucus nigra</i>	actif	0,2-2
Eau	-	qsp 100

Tableau 3 – composition cosmétique conforme à l'invention

Cette crème peut être appliquée, à raison d'une ou deux fois par jour, par exemple le matin et le soir, sur la peau du visage et du cou.

Elle permet de lutter efficacement contre les effets de la pollution atmosphérique sur la peau, en particulier la pollution résultant de la poussière urbaine.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation cosmétique pour lutter contre les effets de la pollution atmosphérique sur la peau d'un individu, d'une composition contenant un extrait de baies de *Sambucus nigra* dans un véhicule cosmétiquement acceptable.
- 5 2. Utilisation selon la revendication 1, selon laquelle ledit extrait de baies de *Sambucus nigra* est obtenu par extraction hydro-alcoolique de baies de *Sambucus nigra*.
3. Utilisation selon la revendication 2, selon laquelle ladite extraction est réalisée dans un mélange d'eau et de glycol, de préférence dans un
10 mélange d'eau et de pentylène glycol.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, comprenant l'application par voie topique sur la peau dudit individu d'une quantité adéquate de ladite composition.
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, selon
15 laquelle ladite composition comporte une quantité dudit extrait de baies de *Sambucus nigra* comprise entre 0,25 et 2 % en poids par rapport au poids total de la composition.
6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, selon
20 laquelle ladite composition contient en outre un extrait d'*Eleutherococcus senticosus*.
7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, selon laquelle ladite composition se présente sous forme d'une crème, d'une pommade, d'un gel, d'une lotion, d'un lait, d'un sérum ou d'une émulsion.
8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, selon

laquelle ladite pollution atmosphérique résulte de la présence de poussière urbaine dans l'atmosphère.

5 **9.** Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour stimuler l'expression de gènes codant pour des protéines favorisant la cohésion cellulaire et/ou l'expression de gènes codant pour des protéines favorisant la différenciation des kératinocytes humains normaux.

10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour augmenter la viabilité cellulaire des kératinocytes humains normaux intoxiqués par la poussière urbaine.

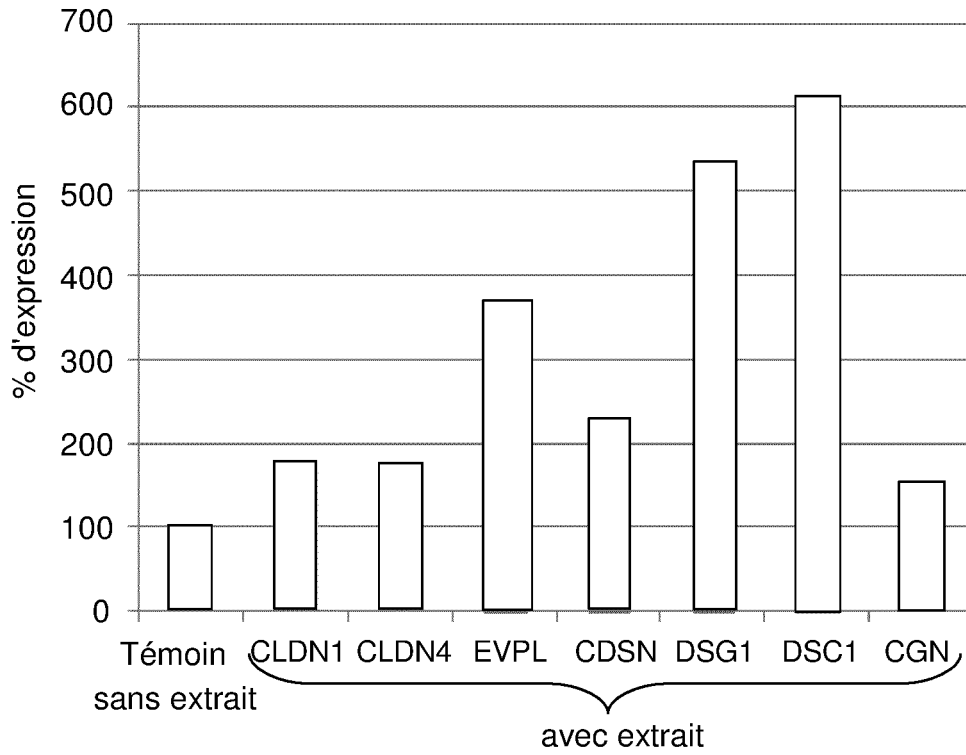
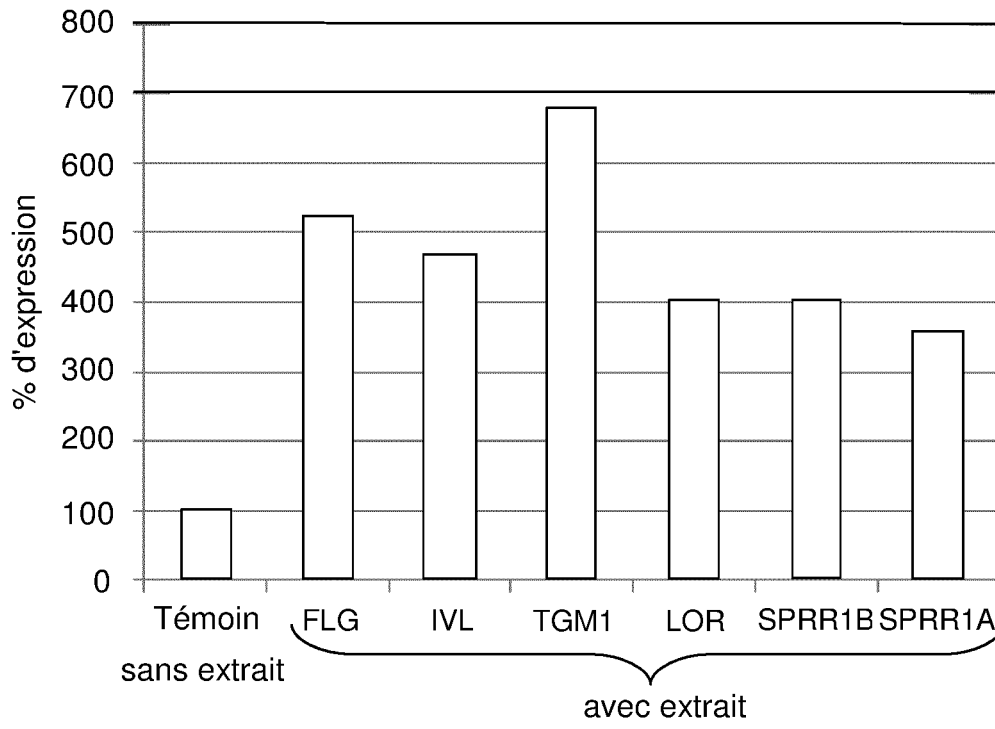


FIG 1



CDSN DSC1

FIG 2

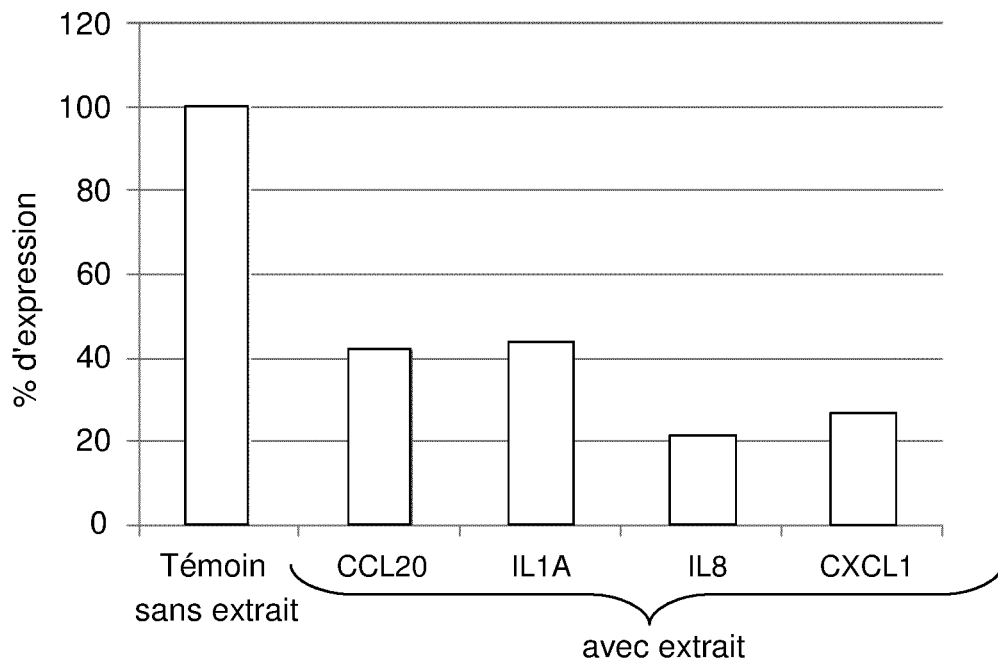


FIG 3

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**

FR 3 051 672 A1 (EXSYMOL SA [MC])
1 décembre 2017 (2017-12-01)

DATABASE GNPD [Online]
MINTEL;
"Day & Night Cream with Extract of
Elderberry",
XP002786728,
Database accession no. 4733023

DATABASE WPI
Week 201024
Thomson Scientific, London, GB;
AN 2010-D68298
XP002786729,
& JP 2010 070519 A (KAO CORP)
2 avril 2010 (2010-04-02)

WO 2017/208170 A1 (SALE COSTANTINO [IT])
7 décembre 2017 (2017-12-07)

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

NEANT

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

NEANT