

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

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

3 046 539

②1 N° d'enregistrement national : **16 50193**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 8/97 (2017.01), A 61 K 8/73, A 61 Q 17/00, 19/00**

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 11.01.16.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 14.07.17 Bulletin 17/28.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : SOCIETE INDUSTRIELLE LIMOUSINE D'APPLICATION BIOLOGIQUE Société anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : PAUFIQUE JEAN.

⑦3 Titulaire(s) : SOCIETE INDUSTRIELLE LIMOUSINE D'APPLICATION BIOLOGIQUE Société anonyme.

⑦4 Mandataire(s) : AQUINOV.

⑤4 PRINCIPE ACTIF DE PICHIA HEEDII ET UTILISATION COSMETIQUE EN PARTICULIER POUR LUTTER CONTRE LES EFFETS DE LA POLLUTION SUR LA PEAU.

⑤7 L'objet de l'invention est l'utilisation cosmétique de Pichia Heedii. L'invention vise en particulier un principe actif de Pichia Heedii, notamment un principe actif comprenant des glucomannanes de masses molaires comprises entre 360 et 4000 Da, des compositions l'incluant et ses compositions cosmétiques en particulier anti-pollution.

FR 3 046 539 - A1



**PRINCIPE ACTIF DE *PICHIA HEEDII* ET UTILISATION COSMETIQUE
EN PARTICULIER POUR LUTTER CONTRE LES EFFETS DE LA POLLUTION SUR LA PEAU**

La présente invention concerne l'utilisation en cosmétique de *Pichia Heedii* ou d'un principe actif de *Pichia Heedii* pour son effet anti-pollution.

5 L'invention se rapporte également à des principes actifs de *Pichia Heedii*, à des compositions cosmétiques incluant *Pichia Heedii* ou un principe actif de *Pichia Heedii*, et à un procédé de traitement cosmétique pour lutter contre les effets de la pollution sur la peau.

Alors que le nombre de citadins ne cesse d'augmenter, beaucoup d'entre eux cherchent des solutions visant à se protéger de l'impact de la pollution. En effet, au-delà des effets
10 délétères sur la santé en général, il est aujourd'hui établi qu'elle est également néfaste pour la peau. La pollution est associée au vieillissement cutané, à l'apparition de désordres pigmentaires et à l'émergence de pathologies telles que la dermatite atopique ou les allergies (Krutmann J., Liu W., Li L., Pan X., Crawford M., Sore G., Seite S. Pollution and skin: From epidemiological and mechanistic studies to clinical implications. *Journal of*
15 *Dermatological Science*, **76**, 163 - 168 (2014) , Vierkötter A., Schikowski T., Ranft U., Sugiri D., Matsui M., Krämer U., Krutmann J. Airborne Particle Exposure and Extrinsic Skin Aging. *Journal of Investigative Dermatology*, **130**, 2719 - 2726 (2010)). Bien que ce problème soit universel, les populations de la région Asie-Pacifique y sont particulièrement exposées.

Les polluants sont des substances organiques et non-organiques. On peut citer l'ozone,
20 les PM (« particulate matter » ou particules fines), les PAH (« polycyclic aromatic hydrocarbons » ou hydrocarbure aromatique polycyclique), les métaux lourds ou encore la fumée de cigarettes. De nature lipophile, certains polluants sont capables de pénétrer à l'intérieur des cellules où ils vont se localiser au niveau de la mitochondrie. Leur mécanisme d'action sur la peau n'est pas encore clairement élucidé. Toutefois, plusieurs
25 voies potentielles sont suspectées :

- L'altération de la flore bactérienne cutanée : l'exposition à des fortes concentrations en ozone entraîne une réduction de 50% de la flore résidente suggérant qu'il exerce un effet bactéricide. De plus, des études ont montré que les bactéries présentes à la surface de la peau peuvent métaboliser partiellement les

polluants. De cette dégradation incomplète naissent des métabolites toxiques pour la peau :

- 5 - L'induction de la cascade inflammatoire : divers polluants ont été décrits comme associés à la production de médiateurs inflammatoires. Parmi ces médiateurs, on peut citer les interleukines 1 β , 8 et 6, et le GM-CSF (« granulocyte macrophage colony-stimulating factor » ou facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages). Cette production incontrôlée cause en retour une altération de la différenciation épidermique.
- 10 - L'activation de la voie du récepteur Aryl-hydrocarbure « Aryl-hydrocarbon Receptor » (AhR) : Le récepteur Aryl-hydrocarbure est un facteur de transcription présent au niveau cytoplasmique qui est capable de détecter la présence de polluants. Ce récepteur régule plusieurs fonctions physiologiques parmi lesquelles la prolifération cellulaire, l'inflammation et la mélanogénèse.
- 15 - La perturbation de la voie des mitokines (prohibitines) : Cet axe de recherche encore inexploré en cosmétique est dédié à la fonction de sentinelle assurée par la mitochondrie qui permet à la peau de rester connectée à son environnement. La mitochondrie capte le signal de danger associé à un épisode de pollution puis le transmet à ses organistes partenaires grâce à des médiateurs protéiques : les mitokines. Par ce mécanisme de communication intracellulaire inédit, les
20 mitokines, notamment la prohibitine, permettent au tissu de déclencher une réponse antistress optimale.

L'objectif de l'invention est de prévenir et lutter contre les effets délétères de la pollution sur la peau, en agissant sur plusieurs de ces voies, en particulier sur la voie du récepteur Aryl-hydrocarbure et la voie des mitokines, qui constitue un axe d'action inédit encore
25 inexploré en cosmétique.

Pour répondre à cet objectif, l'invention propose d'utiliser une levure particulière *Pichia Heedii* ou un principe actif de cette levure.

La levure *Pichia Heedii* fait partie de la famille des Saccharomycetaceae. Elle a été découverte dans les branches et troncs en nécrose de cactus *Carnegiea gigantea* du genre
30 des *Pachycereus*, de la famille des Cactaceae, dans le désert de Sonoran dans le sud-ouest des Etats-Unis en 1978.

La levure *Pichia Heedii* est identifiée dans les collections sous les numéros ATCC 34940, MUCL31256, CBS 6934; CCRC 21370; IFO 10019; UCD 76-503A.

Les colonies sont de couleurs blanches à crèmes, butyreuses. Elles sont convexes, brillantes à semi-brillantes, et ont généralement une surface texturée ou irrégulière.

5 Après 3 jours de culture, les cellules sont ovoïdes de 1.8-3.5 µm sur 3.0-7.0µm. Les ascospores sont formés après 2-3 semaines de croissance dans le milieu malt-agar. *Pichia Heedii* vit en aérobie stricte.

De façon surprenante, *Pichia Heedii* présente une action « absolue » contre les effets délétères de la pollution sur la peau. L'utilisation de cette levure ou d'un principe actif
10 issu de cette levure sur la peau permet avantageusement de réguler au moins deux voies anti-pollution :

- l'inactivation du récepteur Aryl-hydrocarbone face aux polluants
- la restauration de la synthèse de mitokines, en particulier de prohibitine, et le rétablissement de la communication entre les différents éléments cellulaires.

15 L'invention vise ainsi l'utilisation de *Pichia Heedii* ou d'un principe actif de *Pichia Heedii* comme principe actif cosmétique destiné à être appliqué sur la peau en topique au sein d'une composition cosmétique, en particulier pour lutter contre les effets de la pollution sur la peau. Avantageusement cette utilisation permet d'améliorer la fonction barrière ainsi que la couleur et l'éclat de la peau.

20 L'invention a également pour objet un principe actif cosmétique caractérisé en ce qu'il s'agit d'un principe actif de *Pichia Heedii*, en particulier un principe actif comprenant des glucomannanes de masses molaires comprises entre 360 et 4000 Da.

Enfin l'invention vise aussi une composition cosmétique incluant *Pichia Heedii* ou un principe actif de *Pichia Heedii* ainsi qu'un procédé de traitement cosmétique.

25 D'autres caractéristiques et avantages ressortiront de la description en détail de l'invention qui va suivre, en regard des figures annexées sur lesquelles :

- La Figure 1 schématise l'activation ou l'inactivation du récepteur Aryl-hydrocarbone (AhR) par un ligand et translocation nucléaire entraînant la régulation de gènes cibles,
- 30 - La Figure 2 schématise les localisations subcellulaires des prohibitines en absence de stress ou en présence d'un stress modéré,

- La Figure 3 représente le profil chromatographique HPLC du principe actif de l'exemple 1,
- La Figure 4 représente l'effet d'un principe actif selon l'invention sur l'épaisseur des épidermes reconstruits transfectés avec siRNA PHB (correspondant au Tableau 9),

DEFINITIONS

Par « actif cosmétique » ou « principe actif cosmétique » au sens de l'invention, on entend au moins une molécule, préférentiellement un ensemble de molécules présentant un effet sur les cellules de la peau.

Par « principe actif de *Pichia Heedii* » au sens de l'invention, on entend toute molécule ou ensemble de molécules issue(s) de la structure du ferment *Pichia Heedii*. Il peut s'agir de molécules natives du ferment ou de molécules du ferment obtenues par tout type de transformation des molécules natives du ferment par exemple par hydrolyse. Préférentiellement, il s'agit d'un hydrolysate de *Pichia Heedii*. Le terme principe actif au sens de l'invention exclut les molécules produites par fermentation de *Pichia Heedii*.

Par « hydrolysate » on entend tout principe actif issu de *Pichia Heedii*, obtenu par un procédé comprenant au moins une étape d'hydrolyse enzymatique ou chimique de *Pichia Heedii*.

Par « effets de la pollution sur la peau » au sens de l'invention, on entend les effets délétères de la pollution sur la peau d'un point de vue cosmétique, à savoir notamment une déshydratation de la peau, un trouble de la desquamation, le développement de l'acné, un teint terne et gris, un vieillissement prématuré et une irritation de la peau.

Par « pollution » on entend « pollution environnementale » c'est-à-dire l'ensemble des polluants primaires, directement issus des sources fixes, type industrie, chauffage, et des sources mobiles comme voitures et avions, et des polluants secondaires comme l'ozone obtenus suite à la transformation des polluants primaires sous l'action des rayons solaires et de la chaleur.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

L'invention vise donc l'utilisation de *Pichia Heedii* ou d'un principe actif de *Pichia Heedii* comme principe actif cosmétique destiné à être appliqué sur la peau en application topique au sein d'une composition cosmétique, c'est-à-dire l'utilisation cosmétique de *Pichia Heedii* sur la peau.

En particulier, l'invention a pour objet l'utilisation de *Pichia Heedii* ou d'un principe actif de *Pichia Heedii* pour prévenir et/ou lutter contre les effets de la pollution sur la peau.

Pour lutter contre les effets délétères de la pollution sur la peau, *Pichia Heedii* ou un principe actif de *Pichia Heedii* agit principalement sur deux voies :

- 5 - la voie Aryl-hydrocarbure, et
- la voie des mitokines.

Concernant la voie Aryl-hydrocarbure, le récepteur Aryl-hydrocarbure (AhR) est capable de détecter la présence de polluants et de traduire leurs effets biochimiques et toxiques. Il est activé par des molécules ou des particules toxiques émanant de la fumée de cigarettes, de l'incinération incomplète des déchets ou du trafic routier tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les dioxines et ses dérivés. Une fois activé, l'AhR est transloqué du cytoplasme vers le noyau où il régule l'expression de gènes cibles dont CYP1A1 (ou Aryl-hydrocarbon hydroxylase). C'est l'induction prolongée de la voie AhR – CYP1A1 par une exposition quotidienne aux polluants environnementaux qui entraîne les effets délétères liés à la pollution. Ces effets résultent de la production continue et inappropriée de médiateurs pro-inflammatoires incluant cytokines, protéases et ROS, facteurs bien connus pour engendrer l'altération des différents composants cellulaires: dommages à l'ADN, peroxydation lipidique et carbonylation des protéines (Kitamura M., Kasai A. Cigarette smoke as a trigger for the dioxin receptor-mediated signaling pathway. *Cancer Letters*, 252, 184 - 194 (2007)). Le schéma de l'activation du récepteur Aryl-hydrocarbure (AhR) par un ligand et translocation nucléaire entraînant la régulation de gènes cibles est représenté sur la Figure 1.

L'utilisation de *Pichia Heedii* ou d'un principe actif de *Pichia Heedii* sur la peau selon l'invention permet de désactiver le récepteur Aryl-hydrocarbure et par conséquent de limiter et lutter contre les effets délétères de la pollution qui découlent de l'activation de ce récepteur.

Concernant la voie des mitokines, l'invention agit en particulier sur les prohibitines. Les prohibitines forment une famille de protéines constituées de deux homologues : la prohibitine (prohibitine 1 ou PHB1) et la prohibitone (prohibitine 2 ou PHB2). Leurs destins sont étroitement liés : l'absence de l'une entraînant la dégradation de l'autre. Chez l'homme, bien que détectables dans la circulation sanguine, les prohibitines sont majoritairement localisées à l'intérieur des cellules en particulier dans la membrane interne de la mitochondrie où elles forment un large complexe moléculaire. Elles y jouent

un rôle clé pour le développement des mitochondries et leur pérennité au sein de la cellule. Elles maintiennent la structure de la mitochondrie, régule sa fonction, protègent les protéines de la chaîne respiratoire fraîchement synthétisées d'une dégradation incontrôlée, et maintiennent l'organisation de l'ADN mitochondrial (ADNmt).

- 5 En réponse à un stress, les prohibitines sont mobilisées vers les autres organites de la cellule afin de moduler divers aspects de la physiologie cellulaire. On les retrouve ainsi au niveau du noyau ou de la membrane plasmique. Dans le noyau, en interagissant avec divers facteurs de transcription tels que NRF2 ou PGC1 α , elles vont activer respectivement la réponse anti-oxydante et la biogénèse mitochondriale afin de protéger
- 10 la cellule et renforcer l'activité de la mitochondrie. Localisées au niveau de la membrane cellulaire, elles vont maintenir la structure du double-feuillet lipidique. De plus, en interagissant avec les protéines de signalisation cellulaire (MAPK, Raf/ERK, PI3K/Akt, etc.), elles régulent les voies biologiques impliquées dans le métabolisme, la migration, l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire (Mishra S., Ande S.R., Nyomba
- 15 B.L.G. The role of prohibitin in cell signaling. *FEBS Journal*, 277, 3937 - 3946 (2010) ; Zhou T.B., Qin Y.H. Signaling pathways of prohibitin and its role in diseases. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 33, 28 - 36 (2013) ; Rajalingam K., Rudel T. Ras-Raf Signaling Needs Prohibitin. *Cell Cycle*, 4, 1503 – 1505 (2005)).

Les prohibitines jouent donc le rôle de messenger en transmettant aux différents éléments

20 de la cellule les informations relatives à un danger potentiel. De par leur mobilité, elles sont capables de moduler l'activité des différents organites et à plus grande échelle l'activité cellulaire afin qu'elle soit la mieux armée pour répondre au stress. La Figure 2 schématise les localisations subcellulaires des prohibitines en absence de stress ou en présence d'un stress modéré.

- 25 Grâce à la communication intracellulaire qu'elles initient en réponse à un stress, les prohibitines participent activement aux mécanismes d'adaptation vis-à-vis de conditions défavorables : leur rôle cytoprotecteur est indéniable.

Selon la présente invention, l'exposition de kératinocytes humains normaux à un environnement pollué (*abaissement de la teneur en oxygène, exposition au*

30 *benzo[a]pyrène ou aux « particules matter »*) entraîne une réduction significative de la synthèse de prohibitine-1.

L'utilisation de *Pichia Heedii* ou d'un principe actif de *Pichia Heedii* sur la peau selon l'invention permet d'augmenter ou de restaurer le taux de prohibitines, en particulier de prohibitine-1, dans les cellules de la peau, et permet ainsi de recréer un environnement favorable à la communication entre les organites : élément indispensable à l'initiation de la machinerie pour lutter contre le stress créé sur les cellules de la peau par la pollution. L'invention permet donc de limiter et lutter contre les effets délétères de la pollution qui découlent de la diminution du taux de mitokines en particulier de prohibitine dans les cellules cutanées.

Ainsi, en renormalisant la synthèse de la prohibitine et en inactivant le récepteur Aryl-hydrocarbure, *Pichia Heedii* ou un principe actif de *Pichia Heedii* présente un effet anti-pollution. Par la régulation de ces deux voies, l'invention permet en particulier :

- d'améliorer la couleur et l'éclat de la peau (augmentation du rayonnement de la peau, réduction de l'état de fatigue des yeux, réduction de la synthèse de mélanine des cellules de la peau notamment),
- d'améliorer la fonction barrière de la peau et de préserver les peaux fragiles de la pollution, notamment en améliorant la différenciation épidermique et réduisant la perte insensible en eau de la peau.

Pichia Heedii ou un principe actif de *Pichia Heedii* agit comme un bouclier contre les effets délétères de la pollution environnementale. L'invention permet d'obtenir une peau plus résistante, purifiée et un teint frais et dégrisé.

Préférentiellement, l'invention vise l'utilisation d'un principe actif de *Pichia Heedii*, en particulier d'un principe actif tel que décrit en suivant.

En effet, selon un deuxième aspect, l'invention a pour objet un principe actif cosmétique caractérisé en ce qu'il s'agit d'un principe actif de *Pichia Heedii*.

Le principe actif cosmétique selon l'invention comprend des carbohydrates. Ces carbohydrates représentent préférentiellement au moins 30% en poids par rapport au poids total de matière sèche du principe actif.

Les carbohydrates du principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention ont de façon préférée une masse molaire moyenne entre 360 et 4000 Da, plus précisément entre 500 et 1000Da, préférentiellement 550 Da.

De façon particulièrement adaptée, le principe actif est un principe actif comprenant en particulier des glucomannanes de masses molaires comprises entre 360 et 4000 Da. Les

glucomannanes sont des sucres particuliers, constitués de glucose et de mannose. Ces sucres, avec cette taille particulière (masses molaires comprises entre 360 et 4000 Da), ne sont pas tous présents naturellement chez *Pichia Heedii* et leur obtention peut nécessiter une hydrolyse de *Pichia Heedii*.

- 5 Préférentiellement, les glucomannanes de masses molaires comprises entre 360 et 4000 Da représentent plus de 50% en poids des carbohydrates totaux du principe actif, encore plus préférentiellement plus de 60%.

La détermination des masses molaires est préférentiellement réalisée par chromatographie d'exclusion stérique. Cette méthode de chromatographie liquide, avec
10 détection indice de réfraction (IR), permet de séparer les macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique.

La masse molaire moyenne correspond à la moyenne des masses molaires pondérée par l'intensité des signaux obtenus pour chaque masse molaire.

Le principe actif peut contenir d'autres molécules, notamment des protéines et des cendres.

- 15 Selon une variante particulièrement adaptée, le principe actif selon l'invention est un hydrolysate de *Pichia Heedii*, préférentiellement un hydrolysate enzymatique.

Selon un mode de réalisation adapté, le principe actif utile selon l'invention se présente sous forme liquide et présente au moins une des caractéristiques suivantes, préférentiellement toutes :

- 20 - Un taux de matières sèches compris entre 13 et 57 g/l, préférentiellement entre 26 et 38 g/l,
- Une teneur en carbohydrates comprise entre 6 et 27 g/l, préférentiellement entre 12 et 18 g/l, soit entre 30% et 70% en poids de matières sèches,
Les carbohydrates sont constitués de glucose et de mannose sous forme simple et
25 sous forme de glucomannanes,
Ces carbohydrates sont au moins 50% en poids sous forme glucomannanes de masses molaires comprises entre 360 et 4000 Da,
- La présence de peptides inférieure à 15% en poids par rapport au poids de matières sèches,
30 - Une teneur en cendres comprise entre 10 et 35% en poids par rapport au poids de matières sèches.

Le taux de matières sèches peut être mesuré par passage à l'étuve à 105°C d'un échantillon jusqu'à obtention d'un poids constant.

La teneur globale en carbohydrates peut être déterminée par la méthode de DUBOIS (Dubois M. et al., *Analytical chemistry*, 28, 3, 350-356, 1956). La caractérisation de la masse molaire

5 des carbohydrates présents dans le principe actif de la présente invention est réalisée par méthode HPLC. Les conditions opératoires sont préférentiellement les suivantes :

Colonne : Polymer Laboratories (Varian) PL aquagel-OH 60, aquagel-OH 40 et aquagel-OH 30 de dimension 300 x 7,5 mm (en séries) avec pré-colonne de mêmes caractéristiques

Solvant : tampon NaNO₃ 0,3 M et NaH₂PO₄-2H₂O 0,01 M, pH7 en mode isocratique

10 Détecteur : RI (Indice de Réfraction)

Les masses molaires des carbohydrates sont évaluées par comparaison des temps de rétention des pics détectés dans les échantillons du principe actif avec les temps de rétention de standards injectés au préalable.

Le dosage des sucres simples est réalisé par chromatographie liquide ionique.

15 La teneur en composés peptidiques est déterminée par la méthode de LOWRY (Lowry et al., *Protein measurement with the folin reagent*, J. Biol. Chem., 193, 265, 1951).

La teneur en cendres brutes peut être déterminée par la pesée des résidus issus de l'incinération des échantillons du principe actif à 550°C dans un four à moufle électrique.

20 Au lieu d'une forme liquide, le principe actif peut également se présenter sous forme de poudre atomisée par exemple.

Le principe actif selon l'invention peut être obtenu par tout procédé adapté à la transformation de molécules de *Pichia Heedii*. Préférentiellement, il est obtenu par un procédé comprenant une étape d'hydrolyse, en particulier d'hydrolyse enzymatique.

25 Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, le principe actif est obtenu par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- Solubilisation de poudre de *Pichia Heedii* dans l'eau, préférentiellement à raison de 20 g/l,
- Hydrolyse chimique et/ou enzymatique, afin d'hydrolyser les carbohydrates,
- Inactivation enzymatique par traitement thermique,
- 30 - Séparation des phases soluble et insoluble pour récupérer la phase soluble,
- Purification afin d'éliminer les molécules ayant une masse molaire très élevée,
- Concentration,

Les paramètres des différentes étapes doivent être ajustés afin d'obtenir des principes actifs présentant les caractéristiques de l'invention, en particulier la présence de glucomannanes présentant un poids moléculaire compris entre 360 et 4000 Da. Certaines étapes peuvent être ajoutées afin d'obtenir un actif particulier, comme une étape de :

- 5 - Clarification ayant pour but de retirer les composés rendus insolubles lors du traitement thermique, cette clarification peut, par exemple, être réalisée par filtration sur tamis,
- Filtration finale et filtration stérilisante ayant pour but d'éliminer les micro-organismes qui pourraient être présents dans le produit.

10 Ces étapes prises individuellement sont usuelles dans le domaine des extractions d'actifs à partir de plantes ou de levures et l'homme du métier est à même d'en ajuster les paramètres réactionnels sur la base de ses connaissances générales.

Le principe actif selon l'invention ou *Pichia Heedii* est préférentiellement utilisé dans une composition, cette composition comprenant un milieu cosmétiquement acceptable. Il

15 s'agit de compositions dans différentes formes galéniques, adaptées à l'administration par voie topique cutanée.

Ces compositions peuvent se présenter notamment sous forme d'émulsions huile-dans-eau, émulsions eau-dans-huile, émulsions multiples (Eau/Huile/Eau ou Huile/Eau/Huile) qui peuvent être éventuellement des microémulsions ou des nanoémulsions, ou sous

20 forme de solutions, suspensions, hydrodispersions, gels aqueux ou poudres. Elles peuvent être plus ou moins fluides et avoir l'aspect d'une crème, d'une lotion, d'un lait, d'un sérum, d'une pommade, d'un gel, d'une pâte ou d'une mousse, ou sous forme solide.

Il peut s'agir de compositions comprenant au moins 0,25% de *Pichia Heedii* ou d'un principe actif de *Pichia Heedii* selon la présente invention, préférentiellement entre 0,25 et 10%.

25 Ces compositions comprennent, outre l'actif, un milieu physiologiquement acceptable et de préférence cosmétiquement acceptable, c'est-à-dire qui ne provoque pas de sensations d'inconfort inacceptables pour l'utilisateur telles que des rougeurs, tiraillements ou picotements.

Les compositions selon l'invention peuvent contenir comme adjuvant au moins un

30 composé choisi parmi :

- les huiles, qui peuvent être choisies notamment parmi les huiles de silicone, linéaires ou cycliques, volatiles ou non volatiles ;

- les cires, telles que l'ozokérite, la cire de polyéthylène, la cire d'abeille ou la cire de carnauba,
- les élastomères de silicone,
- les tensioactifs, de préférence émulsionnants, qu'ils soient non ioniques, anioniques, cationiques ou amphotères,
- les co-tensioactifs, tels que les alcools gras linéaires,
- les épaississants et/ou gélifiants,
- les humectants, tels que les polyols comme la glycérine,
- les filtres organiques,
- les filtres inorganiques,
- les colorants, les conservateurs, les charges,
- les tenseurs,
- les séquestrants,
- les parfums,
- et leurs mélanges, sans que cette liste soit limitative.

Des exemples de tels adjuvants sont cités notamment dans le Dictionnaire CTFA (*International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook* publié par le *Personal Care Product Council*).

Bien entendu, l'homme du métier veillera à choisir les éventuels composés complémentaires, actifs ou non-actifs, et leur quantité, de telle sorte que les propriétés avantageuses du mélange ne soient pas, ou sensiblement pas, altérées par l'adjonction envisagée.

Ces compositions sont notamment destinées à être utilisées pour lutter contre les effets délétères de la pollution sur la peau.

L'invention vise aussi spécifiquement un procédé cosmétique de soin de la peau pour lutter contre les effets délétères de la pollution sur la peau, en particulier pour augmenter l'efficacité de la fonction barrière de la peau et/ou améliorer la couleur et l'éclat des peaux polluées, qui consiste à appliquer au moins une fois par jour sur la peau du visage une composition comprenant au moins 0,10% en poids de matières sèches de *Pichia Heedii* ou d'un principe actif cosmétique de *Pichia Heedii*.

Afin d'illustrer ces effets cosmétiques sur la peau, les exemples suivants avec leurs résultats d'essais sont présentés.

EXEMPLES

Exemple 1 : Principe actif selon l'invention

Un exemple de procédé d'obtention d'un principe actif selon l'invention, comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 5 - Solubilisation de poudre de *Pichia Heedii* dans l'eau à raison de 20 g/l,
- Hydrolyse enzymatique, afin d'hydrolyser les carbohydrates,
- Inactivation enzymatique par traitement thermique pendant 15 mn,
- Séparation des phases soluble et insoluble par décantation et récupération la phase soluble,
- 10 - Purification afin d'éliminer les substances ayant une masse molaire supérieure à 10 kDa,
- Filtration stérilisante sur 0.22 µm.

Le principe actif obtenu est un liquide limpide jaune pâle présentant une matière sèche de 32 g/l, un pH de 5 et une teneur en carbohydrates (méthode de Dubois) de 15 g/l, soit 15 47% de la matière sèche. Il contient aussi des protéines.

68% des carbohydrates du principe actif sont des glucomannanes de masses molaires comprises entre 360 et 4000 Da. La détermination des masses molaires est réalisée par HPLC avec détection RI. Le profil chromatographique HPLC/RI de la fraction glucidique de ce principe actif est présenté sur la Figure 3.

20 Les carbohydrates sont composés à 77% de glucose, 23% de mannose.

Exemple 2 : Principe actif selon l'invention

Un exemple de procédé d'obtention d'un principe actif selon l'invention, comprend la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 25 - Solubilisation de poudre de *Pichia Heedii* dans l'eau à raison de 20 g/l,
- Hydrolyse chimique, afin d'hydrolyser les carbohydrates,
- Séparation des phases soluble et insoluble et récupération la phase soluble,
- Purification afin d'éliminer les substances ayant une masse molaire supérieure à 10 kDa,
- 30 - Filtration stérilisante sur 0.22 µm

Le principe actif obtenu est un liquide limpide jaune pâle présentant une matière sèche de 31 g/l, un pH de 5 et une teneur en sucres (méthode de Dubois) de 17 g/l, soit 55% de la matière sèche.

60% des carbohydrates du principe actif sont des glucomannanes de masses molaires comprises entre 360 et 4000 Da.

Exemple 3 : Utilisation d'un principe actif selon l'invention dans une crème

5 La composition a la formulation suivante :

Isononyl isononanoate (Lanol 99, Seppic)	5,0%
Principe actif selon l'invention (exemple 1)	3,0%
Behenyl alcohol / arachidyl glucoside / arachidyl alcohol (Montanov 202, Seppic)	3,0%
Cetearyl alcohol / cetearyl glucoside (Montanov 68, Seppic)	2,0%
Conservateurs	0,7%
Polyacrylamide / C13-14 isoparaffin / laureth 7 (Sepigel 305, Seppic)	0,3%
Eau	<u>qsp 100%</u>

Cette émulsion est blanche, souple brillante à l'odeur légère.

Elle présente une application aisée, une pénétration rapide et un fini sec.

EVALUATION DE L'EFFICACITE COSMETIQUE SELON L'INVENTION

10 **TESTS IN VITRO**

○ Effet d'un principe actif de *Pichia Heedii* sur les voies anti-pollution

▪ Etude de la voie des mitokines – Modèle 2D

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité d'un principe actif de *Pichia Heedii* à restaurer la voie des mitokines dans un modèle 2D soumis à des conditions mimant un environnement pollué.

15

Pour cela, l'action d'un principe actif de *Pichia Heedii* (exemple 1) sur la synthèse de la prohibitine a été étudiée sur des kératinocytes humains normaux exposés :

- aux causes de la pollution, en appliquant deux composants de la pollution atmosphérique : le benzo[a]pyrène (BaP) et les particules fines (PM 2,5) ;

20

- aux conséquences de la pollution sur la teneur en oxygène de l'air, en mimant un appauvrissement avec un traitement au chlorure de cobalt.

La synthèse des prohibitines a été mesurée par Western blot.

Le protocole opératoire est décrit en suivant.

Les kératinocytes humains normaux sontensemencés dans un milieu adapté. La pollution au BaP est réalisée par remplacement du milieu de culture par une solution de benzo[a]pyrène (BaP).

Pour mimer la pollution aux particules fines, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont agressées soit par une solution de particules fines PM 2,5, soit par une solution de cobalt. Après plusieurs jours, les cellules sont rincées puis traitées avec le principe actif de *Pichia Heedii* (exemple 1) à 0,25%, 0,50% ou 1,00%.

Ensuite, les extraits cellulaires sont récupérés, puis stockés à -80°.

L'électrophorèse de Western blot est réalisée sur gel précoulé TGX (Biorad).

Les protéines sont ensuite transférées sur membrane PVDF (Biorad).

L'immunomarquage est réalisé avec les anticorps primaires (anticorps anti-prohibitine et anticorps anti-actine), l'anticorps secondaire et le système de révélation.

Les bandes sont visualisées, semi-quantifiées par densitométrie puis analysées à l'aide du logiciel.

Les résultats obtenus sont présentés dans les Tableaux 1 à 3.

La capacité à restaurer les prohibitines est calculée comme suit :

$$\text{Capacité à restaurer les prohibitines} = \frac{\text{Ratio essai traité composé chimique} - \text{ratio témoin avec composé chimique}}{\text{Ratio témoin non traité} - \text{ratio témoin avec composé chimique}} \times 100$$

Causes de la pollution : agression avec le benzo[a]pyrène :

	Taux des prohibitines (UA)	Capacité à restaurer les prohibitines (%)
Environnement non pollué		
Témoin	1,075	
Exemple 1 à 1,00%	1,113	
Environnement pollué (benzo[a]pyrène)		
Témoin	0,944*	
Exemple 1 à 0,25%	0,977	25%
Exemple 1 à 0,50%	1,022 ^{◇◇}	59%
Exemple 1 à 1,00%	1,031 [◇]	67%

* : résultat significatif selon le test t de Student / témoin non pollué (p<0,05)

◇◇ : résultat significatif selon le test t de Student / témoin pollué (p<0,10)

◇ : résultat significatif selon le test t de Student / témoin pollué (p<0,05)

Tableau 1

Causes de la pollution : agression avec les particules fines :

	Taux des prohibitines (UA)	Capacité à restaurer les prohibitines (%)
Environnement non pollué		
Témoin	1,094	
Exemple 1 à 1,00%	1,091	
Environnement pollué (particules fines)		
Témoin	0,932*	
Exemple 1 à 0,25%	1,019	54%
Exemple 1 à 0,50%	1,058 ^{♦♦}	78%
Exemple 1 à 1,00%	1,096 [♦]	101%

* : résultat significatif selon le test t de Student / témoin non pollué ($p < 0,05$)

♦♦ : résultat significatif selon le test t de Student / témoin pollué ($p < 0,10$)

5 ♦ : résultat significatif selon le test t de Student / témoin pollué ($p < 0,05$)

Tableau 2Conséquences de la pollution : Réduction de la teneur en oxygène - Agression avec le cobalt :

	Taux des prohibitines (UA)	Capacité à restaurer les prohibitines (%)
Environnement non pollué		
Témoin	1,071	
Exemple 1 à 1,00%	1,070	
Environnement pollué (cobalt)		
Témoin	0,671*	
Exemple 1 à 0,25%	0,816 [♦]	36%
Exemple 1 à 0,50%	0,845 [♦]	44%
Exemple 1 à 1,00%	0,943 [♦]	68%

*: résultat significatif selon le test t de Student / témoin non pollué ($p < 0,05$)

♦ : résultats significatifs selon le test t de Student / témoin pollué ($p < 0,05$)

10 **Tableau 3**

Dans un environnement pollué, les kératinocytes perdent leur capacité de synthèse des prohibitines (-12% avec la pollution au benzo[a]pyrène, -15% avec la pollution aux PM, -37% avec l'agression au cobalt).

Un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention est capable de restaurer la voie des mitokines et consécutivement permet le maintien la communication intracellulaire : phénomène indispensable à l'initiation d'une réponse antistress adaptée.

15 Testé à 1% sur kératinocytes humains soumis à un environnement pollué, le principe actif selon l'invention restaure significativement la synthèse des prohibitines de :

- 67% face à une agression au benzo[a]pyrène ;
- 101% face à une agression aux particules fines ;
- 68% face à abaissement de la teneur en oxygène (cobalt).

20

- Etude de la voie des mitokines – Modèle 3D

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité d'un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention à restaurer la voie des mitokines dans un modèle 3D soumis à des conditions mimant un environnement pollué.

Pour cela, l'action d'un principe actif selon l'invention (exemple 1) sur la synthèse de la prohibitine a été étudiée dans des épidermes reconstruits exposés aux conséquences de la pollution sur la teneur en oxygène de l'air, en mimant un appauvrissement à l'aide d'un traitement au chlorure de cobalt.

La synthèse de prohibitine a été mesurée par Western blot.

Le protocole opératoire est décrit en suivant.

Les kératinocytes humains sont cultivés dans un milieu de culture spécifique.

A J-1, les cellules sont exposées à une solution de cobalt.

A J0, les kératinocytes humains traités ou non au cobalt sontensemencés sur des inserts puis incubés à 37°C.

Le milieu de culture est changé tous les 2 jours en présence du principe actif de l'exemple 1 à 0,10% et 0,25% (V/V).

Après plusieurs jours, les principes actifs épidermiques sont récupérés, puis stockés à -80°C.

Une électrophorèse est réalisée sur gel précoulé TGX (Biorad).

Les protéines sont ensuite transférées sur membrane PVDF (Biorad).

L'immunomarquage est réalisé avec les anticorps primaires (anticorps anti-prohibitine et anticorps anti-actine), l'anticorps secondaire et le système de révélation.

Les résultats sont donnés dans le Tableau 4.

La capacité à restaurer les prohibitines est calculée comme suit :

25

$$\text{Capacité à restaurer les prohibitines} = \frac{\text{Ratio essai traité cobalt} - \text{ratio témoin traité cobalt}}{\text{Ratio témoin non traité} - \text{ratio témoin traité cobalt}} \times 100$$

	Taux des prohibitines (UA)	Capacité à restaurer les prohibitines (%)
Environnement non pollué		
Témoin	0,370	
Environnement pollué (cobalt)		
Témoin	0,268*	
Exemple 1 à 0,10%	0,319 ^{◇◇}	50%
Exemple 1 à 0,25%	0,327 [◇]	58%

* : résultat significatif selon le test t de Student / témoin non pollué ($p < 0,05$)

◇◇ : résultat significatif selon le test t de Student / témoin traité pollué ($p < 0,10$)

◇ : résultat significatif selon le test t de Student / témoin traité pollué ($p < 0,05$)

5 **Tableau 4**

Soumis à un environnement mimant les conséquences de la pollution sur la teneur en oxygène de l'air, les épidermes reconstruits présentent une synthèse des prohibitines significativement réduite de 28%.

- 10 Ces résultats montrent que face à un épisode de pollution, le principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention assure le maintien de la communication intracellulaire et le déclenchement d'une réponse antistress adaptée en restaurant la voie des mitokines. Testé à 0,25% sur ce modèle, le principe actif de l'exemple 1 restaure significativement la synthèse des prohibitines de 58%.

15

- Etude de la voie Aryl-hydrocarbène

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité d'un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention à limiter l'activation de l'Ahr suite à l'exposition des kératinocytes humains à un agent polluant : le benzo[a]pyrène (BaP).

- 20 L'effet sur l'activation de l'Ahr a été étudié par Western blot.

Le protocole opératoire est décrit en suivant.

A J0, les kératinocytes humains normaux sontensemencés dans un milieu adapté.

Après plusieurs jours, les cellules sont agressées par une solution de benzo[a]pyrène (BaP) en présence ou non du principe actif de l'exemple 1 à 0,25%, 0,50% ou 1,00%.

- 25 Ensuite, les extraits cellulaires sont fractionnés puis stockés à -80°C.

Une électrophorèse est réalisée sur gel précoulé TGX (Biorad).

Les protéines sont ensuite transférées sur membrane PVDF (Biorad).

L'immunomarquage est réalisé avec les anticorps primaires (anticorps anti-AhR et anticorps anti-TATA binding protein), les anticorps secondaires et un système de révélation-

- 5 Les bandes sont visualisées, semi-quantifiées par densitométrie puis analysées à l'aide du logiciel.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.

Chaque ratio est calculé selon la formule suivante :

$$10 \quad \text{Ratio} = \frac{\text{Quantité de protéine cible (Récepteur Ah)}}{\text{Quantité de protéine référence (TATA binding protein)}}$$

	Taux d'AhR activé (UA)	Efficacité / témoin (%)
Environnement non pollué		
Témoin	0,147	
Exemple 1 à 1,00%	0,162	
Environnement pollué (benzo[a]pyrène)		
Témoin	0,294*	
Exemple 1 à 0,25%	0,229	44%
Exemple 1 à 0,50%	0,144 [◇]	102%
Exemple 1 à 1,00%	0,139 [◇]	105%

* : résultat significatif selon le test t de Student / témoin non pollué ($p < 0,05$)

- 15 [◇] : résultats significatifs selon le test t de Student / témoin pollué ($p < 0,05$)

Tableau 5

Dans un environnement pollué, la translocation nucléaire de l'AhR est significativement augmentée (+100%). Face à un épisode de pollution, un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention réduit significativement l'activation de l'AhR.

Testé à 1%, le principe actif de l'exemple 1 réduit significativement cette translocation de 105%.

- Effet d'un principe actif de *Pichia Heedii* sur les conséquences de la pollution sur la peau : Etude de la fonction barrière

- 25 Afin de lutter contre les agressions de l'environnement, la peau dispose d'une première ligne de défense, la barrière épidermique. Cet échafaud est constitué de kératinocytes couplés à un squelette de nature protéique.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité d'un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention à favoriser la construction d'un épiderme stratifié et fonctionnel à partir de kératinocytes humains exposés à un appauvrissement de la teneur en oxygène (*conséquences de la pollution mimées par un traitement au cobalt*).

5 Cette construction épidermique a été évaluée à l'aide :

- d'une coloration Hématoxyline Eosine (HE) permettant de mesurer l'épaisseur des épidermes reconstruits obtenus et d'évaluer ainsi leur qualité.
- de marqueurs de différenciation : cytokératine 10, filaggrine et loricrine permettant de valider la fonctionnalité des épidermes reconstruits.

10 Le protocole opératoire est décrit en suivant.

Les kératinocytes humains sont cultivés dans un milieu de culture spécifique.

A J-1, les cellules sont exposées à une solution de cobalt.

A J0, les kératinocytes humains normaux et exposés à une solution de cobalt sont ensemencés sur des inserts puis incubés à 37°C.

15 Le milieu de culture est changé tous les 2 jours en présence du principe actif de l'exemple 1 à 0,10% et 0,25% (V/V).

Après plusieurs jours, les épidermes reconstruits sont récupérés, fixés, déshydratés et inclus en paraffine. Des coupes (4µm) sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome.

On réalise ensuite la coloration Hématoxyline Eosine (HE).

20 Les marquages immunohistologiques de cytokératine 10, filaggrine et loricrine sont ensuite réalisés au moyen des anticorps primaires (anticorps anti-cytokératine 10, anti-filaggrine, anticorps anti-loricrine), des anticorps secondaires.

La visualisation de la coloration et des immunomarquages est réalisée à l'aide un système d'analyse d'images.

25 L'épaisseur des épidermes a été mesurée sur les coupes histologiques après la coloration HE.

- Les synthèses de la cytokératine 10, filaggrine et loricrine sont proportionnelles à l'intensité de la fluorescence (couleur verte) présente sur les épidermes reconstruits.

Une analyse quantitative des images a été réalisée à l'aide du logiciel Matlab®.

30 Les résultats sur l'épaisseur des épidermes reconstruits sont présentés sur le Tableau 6.

20

	Épaisseur des ÉPIDERMES RECONSTRUITS (μm)	Capacité à maintenir un ÉPIDERME RECONSTRUIT (%)
Environnement non pollué		
Témoin	82	
Exemple 1 à 0,25%	81	
Environnement pollué (cobalt)		
Témoin	36*	
Exemple 1 à 0,10%	47 \diamond	24
Exemple 1 à 0,25%	65 \diamond	63

* : résultat significatif selon le test t de Student / témoin non pollué ($p < 0,05$)

\diamond : résultats significatifs selon le test t de Student / témoin pollué ($p < 0,05$)

Tableau 6

- 5 Face à un épisode de pollution, la construction épidermique est significativement diminuée de 56%.

Testé à 0.25% le principe actif selon l'invention restaure la construction épidermique et permet le maintien d'un épiderme reconstruit fonctionnel.

- 10 Les résultats sur les synthèses des marqueurs de différenciation sont présentés sur le Tableau 7.

	Synthèse de CK10 ($\times 10^4\text{UA}$)	Synthèse de filaggrine ($\times 10^4\text{UA}$)	Synthèse de loricrine ($\times 10^4\text{UA}$)
Environnement non pollué			
Témoin	1989	895	445
Exemple 1 à 0,25%	2027	854	435
Environnement pollué (cobalt)			
Témoin	633	12	142
Exemple 1 à 0,10%	1053	214	270
Exemple 1 à 0,25%	1238	474	351

Tableau 7

Soumis à un environnement appauvri en oxygène, les épidermes reconstruits présentent des synthèses de cytokératine 10, filaggrine et loricrine significativement diminuées (-68%, -99%, -68%).

Ces résultats montrent que l'utilisation d'un principe actif de *Pichia Heedii* permet de
5 compenser l'altération de la différenciation épidermique induite par la pollution environnementale et permet ainsi l'obtention d'une barrière fonctionnelle.

Testé à 0,25% sur ce modèle, le principe actif de l'exemple 1 restaure significativement la synthèse de ces 3 protéines respectivement de 45%, 52% et 69%.

10 • Caractérisation du mécanisme d'action

L'objectif de cette étude est la caractérisation du mécanisme d'action du principe actif selon l'invention et l'évaluation du rôle de la prohibitine.

Afin de répondre à cette question, nous avons mesuré si en absence de prohibitine (technologie siRNA), un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention (exemple 1) est
15 capable de restaurer la fonction barrière.

L'expression de la prohibitine-1 (PHB) peut être bloquée à l'aide de la technologie des siRNA (siRNA-PHB) dans un modèle d'épiderme reconstruit.

Les kératinocytes humains siRNA-PHB sont réalisés par transfection avec le siRNA-PHB.

Les épidermes reconstruits, contrôle négatif, siRNA-PHB et siRNA-PHB traité par le
20 principe actif selon l'invention sont obtenus en ensemençant les kératinocytes humains respectivement contrôle négatif ou siRNA-PHB. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours en présence ou non du principe actif de l'exemple 1 à 0,25% (V/V).

Après plusieurs jours, les épidermes reconstruits sont récupérés, fixés, déshydratés et inclus en paraffine. Des coupes (4µm) sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome.

25 L'expression de l'ARNm de la prohibitine est déterminée. Les ARN ont été reverse-transcrits et les ADN complémentaires obtenus ont été analysés par la technique de PCR quantitative. Les ARNm de la protéine HPRT, témoin interne de référence, ont été également analysés en parallèle de l'ARNm de la prohibitine.

La quantification de l'incorporation de fluorescence est mesurée en continu à l'aide d'un
30 thermocycleur.

La visualisation est réalisée sur microscope couplé à un système d'analyse d'images.

La construction épidermique a été évaluée à l'aide d'une coloration Hématoxyline Eosine (HE) permettant de mesurer l'épaisseur des épidermes reconstruits obtenus et d'évaluer ainsi leur qualité.

Les résultats obtenus sur l'étude de l'expression de l'ARNm de la prohibitine sont présentés dans le Tableau suivant :

	Expression de prohibitine (%)	Efficacité / Contrôle négatif (%)
Contrôle négatif	100	
siRNA-PHB	21 ± 6	-79

Tableau 8

Le modèle d'épiderme reconstruit siRNA-PHB est bien dépourvu de synthèse de prohibitine.

Les résultats de l'effet sur l'épaisseur des épidermes reconstruits transfectés avec siRNA PHB, sont présentés dans le tableau 9 et la Figure 4.

	Epaisseur de l'épiderme reconstruit (µm)	Diminution de l'épaisseur de l'épiderme reconstruit (%)
Contrôle négatif	91 ± 7	
siRNA PHB	55 ± 4	-40
siRNA PHB+ Exemple1 à 0,25%	48 ± 2	-48

15 **Tableau 9**

L'inhibition de la prohibitine dans des kératinocytes humains avant la construction épidermique conduit à une diminution de l'épaisseur de l'épiderme reconstruit. Ces résultats montrent qu'en l'absence de prohibitine, un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention ne permet pas de reconstruire la fonction barrière. L'effet du principe actif selon l'invention est donc prohibitine-dépendant.

- Effet du principe actif sur les conséquences de la pollution sur la peau : Etude sur la mélanogenèse

La pollution exerce des effets délétères sur la peau. Elle entraîne l'apparition de désordres pigmentaires qui résultent de l'activation du récepteur aux polluants, le récepteur Arylhydrocarbone (AhR). En effet, l'AhR est exprimé par les mélanocytes. Une fois activé par les polluants, il est transloqué au niveau nucléaire où il va activer les gènes impliqués dans la mélanogenèse.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité d'un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention à inhiber la mélanogenèse.

L'étude a été réalisée sur culture de mélanocytes B16F1 ou mélanocytes humains par mesure du taux de mélanine synthétisée.

Le protocole opératoire est décrit en suivant.

A J0, les mélanocytes sont ensemencés dans un milieu adéquat.

Les cellules sont ensuite traitées avec le principe actif de l'exemple 1 à 0,25%, 0,50% et 1,00%.

Les cellules sont trypsinées et comptées.

Le culot est lysé avec un tampon sodium phosphate contenant du Triton, centrifugé et récupéré pour le dosage du taux de mélanine.

La mélanine synthétisée est quantifiée par lecture spectrophotométrique à 490 nm, à l'aide d'une gamme étalon de mélanine synthétique.

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 10.

$$\% \text{ d'inhibition du taux de mélanine} = \frac{\text{Taux mélanine Essai} - \text{Taux mélanine Témoin}}{\text{Taux mélanine Témoin}} \times 100$$

	Taux de mélanine synthétisée / Témoin (%)	
	Mel B16F1	Mel humains
Exemple 1 à 0,25%	-8%	
Exemple 1 à 0,50%	-16%	-18%
Exemple 1 à 1,00%	-38%	-43%

Tableau 10

On constate qu'un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention réduit la mélanogénèse et peut ainsi aider à la prise en charge des effets délétères de la pollution sur la pigmentation de la peau.

- 5 En effet, testé à 1% sur mélanocytes B16F1 et mélanocytes humains, le principe actif de l'exemple 1 diminue significativement le taux de mélanine de 38% et 43%.

TESTS IN VIVO

○ Description du panel sélectionné et des études réalisées

- 10 L'effet d'un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention formulé à 3% a été évalué sur un panel caucasien et sur un panel asiatique en comparaison à un placebo sur les aspects suivants :

- Etude de l'effet sur la préservation de la barrière cutanée
- Etude de l'effet sur l'éclat du teint
- 15 - Etude de l'effet éclaircissant
- Evaluation subjective

Le panel caucasien est composé de volontaires sains, de sexe féminin, d'âge compris entre 40 et 65 ans et sélectionnés selon un critère de peau intoxiquée (lipides oxydés élevés, fumeuse et présentant un teint terne).

- 20 Le panel asiatique est composé de volontaires sains, de sexe féminin, d'âge compris entre 40 et 65 ans et présentant un teint terne.

Les études sur le panel asiatique ont été réalisées par le laboratoire d'ingénierie et de biologie cutanée à Chengdu dans la province de Sichuan en Chine.

- 25 L'ensemble des mesures réalisées est :

- Etude de la perte insensible en eau :

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un Tewamètre® TM 300 (Courage & Khazaka). Cet appareil est muni d'une sonde qui mesure le gradient de vapeur d'eau se mettant en place entre la surface cutanée et l'air ambiant, ce qui donne une information sur la qualité de la fonction barrière du *stratum corneum*.

30

Les mesures ont été réalisées sur des zones symétriques au niveau des joues.

Une diminution de la PIE est caractéristique d'une amélioration de la fonction barrière de la peau.

- Etude de la récupération de la fonction barrière :

La barrière cutanée au niveau des avants bras a été agressée artificiellement par applications successives d'adhésif. Ces derniers ont été appliqués à la surface de la peau, en utilisant un applicateur délivrant une pression constante, et retirés. L'agression a été standardisée à 15 g/h/m² qui-correspond à une PIE de personnes à peau xérotique (Berry N et al., *Int J Cosmet Sci*, 21, 241-252, 1999).

Les mesures de Perte Insensible en Eau (PIE) ont été réalisées à l'aide de Tewamètre® TM 300 (Courage & Khazaka), avant (PIE basale) et immédiatement après agression, ainsi que 1 jour, 3 jours, 4 jours, 7 jours, 10 jours et 14 jours après agression.

- Etude de l'éclat du teint :

L'évaluation de l'éclat du teint sur le panel caucasien a été réalisée en aveugle par deux experts préalablement entraînés à juger différents paramètres représentatifs de l'éclat du teint.

L'évaluation se fait à partir d'échelles de scores (de 1 à 10) et les paramètres suivants ont été retenus :

- Le rayonnement de la peau, caractéristique d'un teint éclatant. Plus l'intensité des accroches de lumière sur les zones saillantes du visage est importante plus la peau est lumineuse.
- La couleur rose claire, qui permet de caractériser un teint éclatant. Plus le teint est rosé plus il est perçu comme frais.
- La couleur olive est représentative de l'effet bonne mine ; si la couleur olive diminue l'effet bonne mine est plus important.
- L'état de fatigue des yeux, qui permet d'apprécier la fatigue générale de la peau.

L'évaluation de ces différents paramètres se fait sur les zones (Pommettes, Front, Menton, Yeux).

Le scorage clinique de la couleur de la peau sur le panel asiatique a été réalisé par un expert dans des conditions standardisées notamment en termes de position du volontaire et d'éclairage ambiant.

Lors de cette évaluation, l'expert score la couleur de la peau selon 6 composantes (marron, marron clair, beige, jaune, olive et rose clair) évaluées en pourcentage de saturation.

5 De plus, l'expert évalue la transparence, le rayonnement et la luminosité de la peau sur une échelle de 0 à 100.

Le paramètre transparence correspond au degré de transmission de la lumière à travers la surface cutanée. Plus ce paramètre est élevé plus la peau est transparente.

Le paramètre brillance évalue la capacité de la peau à réfléchir la lumière, plus il est élevé, plus la peau renvoie la lumière.

10 Le paramètre luminosité permet d'aborder la notion d'éclat d'une peau saine, en bonne santé. Plus ce paramètre augmente et plus la peau est lumineuse.

- Evaluation de la clarté de la peau

15 Des mesures de la couleur de la peau ont été réalisées au niveau des joues à l'aide d'un Chromamètre® CM2600d (Konica Minolta). Il convertit les couleurs situées dans la plage de perception humaine en un code numérique composé de trois paramètres :

- L*: représente la clarté (du sombre au pâle)
- a*: représente la gamme des verts aux rouges
- b*: représente la gamme des bleus aux jaunes

a* et b* sont des paramètres de chrominance et L*, un paramètre de luminance.

20 Le paramètre ITA (Angle Typologique Individuel) permet d'évaluer la variation de l'aspect éclatant de la peau. Ce paramètre définit le degré de pigmentation de la peau en intégrant la clarté (L*) et le paramètre de mélanisation (b*) selon la formule suivante :

$$ITA^\circ = [\text{Arc tan}((L^*-50)/b^*)] \times 180 / \pi$$

25 Plus le paramètre ITA est élevé plus la peau parait claire et lumineuse.

Les paramètres L* et ITA ont été retenus pour étudier l'effet d'un principe actif selon l'invention sur l'éclaircissement de la peau.

- Evaluation subjective

30 L'évaluation subjective par le panel caucasien des sensations observées après 28 jours de traitement biquotidien par une composition contenant le principe actif selon l'invention et le placebo a été évaluée à l'aide de questionnaires d'auto-évaluation contenant les questions dites fermées :

27

	Pas d'accord	Plutôt pas d'accord	Plutôt d'accord	D'accord
Avec cette émulsion ma peau est plus éclatante.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avec cette émulsion, mon teint est plus frais.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avec cette émulsion, ma peau est purifiée.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avec cette émulsion, ma peau est revitalisée.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avec cette émulsion, ma peau paraît plus résistante.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avec cette émulsion, mon teint est dégrisé.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

L'évaluation subjective par le panel asiatique des sensations ressenties après 28 jours de traitement biquotidien par une composition contenant le principe actif selon l'invention et le placebo a été évaluée à l'aide de questionnaires d'auto-évaluation contenant les

5 questions dites fermées :

	Pas d'accord	Plutôt pas d'accord	Plutôt d'accord	D'accord
Avec cette émulsion ma peau est plus lumineuse.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avec cette émulsion, mon teint est dégrisé.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avec cette émulsion, mon grain de peau est affiné	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avec cette émulsion, ma peau est revitalisée.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avec cette émulsion, ma peau est purifiée.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avec cette émulsion, ma peau paraît plus lisse.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cette émulsion réduit les signes de fatigue	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avec cette émulsion la couleur de mon teint est plus uniforme	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cette émulsion réduit les imperfections	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Les résultats des questions fermées ont été analysés en cumulant les réponses « plutôt d'accord » et « d'accord ».

○ TESTS D'EFFICACITE

- 5 ■ Etude de l'effet d'un principe actif de *Pichia Heedii* à renforcer la barrière cutanée. Mesure de la PIE.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer, *in vivo*, l'effet restructurant d'un principe actif selon l'invention formulé à 3% en émulsion sur la fonction barrière de la peau.

10 Cette étude a été réalisée sur 20 volontaires caucasiens, sains, de sexe féminin, d'âge moyen 53 ± 2 ans, sélectionnés.

Les mesures de la perte insensible en eau du visage ont été réalisées avant et après 14 et 28 jours d'applications biquotidiennes en héli-visage du placebo et du principe actif (exemple 3) selon l'invention. La moyenne des résultats obtenus est présentée sur le tableau 11.

	Variation / Placebo (%)
J14	-8,4% (<i>p</i> = 0,0396)
J28	-11,2% (<i>p</i> = 0,0012)

15 **Tableau 11**

On constate que dans les conditions de cette étude, dès 14 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison au placebo, un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention formulé à 3% en émulsion, diminue significativement la perte insensible en eau de la peau de 8,4% (*p* = 0,0396).

20 Cet effet se poursuit après 28 jours d'applications biquotidiennes pour atteindre une diminution significative de la perte insensible en eau, de 11,2% (*p* = 0,0012), sur une peau non altérée artificiellement.

Cet effet a été observé chez 80% des volontaires.

25 Un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention améliore donc bien la fonction barrière de la peau.

- Effet du principe actif de *Pichia Heedii* sur la capacité de récupération de la barrière cutanée après altération artificielle (strippings). Mesure de la PIE.

L'objectif de l'étude a été d'évaluer, *in vivo*, l'effet du principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention formulé à 3% en gel-émulsionné sur la capacité de récupération de la fonction barrière de la peau après une agression unique par stripping.

Cette étude a été réalisée sur 20 volontaires caucasiens, sains, de sexe féminin, d'âge moyen 56 ± 2 ans.

L'effet d'un principe actif selon l'invention sur la capacité de récupération de la barrière cutanée suite à une agression unique par stripping a été étudié après un prétraitement de 28 jours d'applications biquotidiennes du placebo et d'un principe actif de *Pichia Heedii* (exemple 3), au niveau de la face interne des avant-bras.

Un résumé des résultats est présenté dans le tableau 12.

	J1	J3	J4	J7	J10	J14
Zone agressée non traitée	61%	81%	84%	95%	94%	97%
Zone agressée traitée placebo	59%	79%	83%	96%	97%	95%
Zone agressée traitée Exemple 3	65%	88%	91%	98%	99%	99%
p-valeur	0,0584	0,0142	0,0736	0,3521	0,3104	0,0869

Tableau 12

Dans les conditions de cette étude, après un prétraitement de 28 jours en applications biquotidiennes et en comparaison au placebo, un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention formulé à 3% en gel-émulsionné permet à la peau une récupération de la fonction barrière plus rapide suite à une agression unique par stripping.

En effet après une agression unique, la récupération de la fonction barrière est pratiquement totale avec l'invention (91%) en seulement 4 jours (96h), contrairement à la zone traitée par le placebo qui a nécessité 7 jours avant d'observer une récupération totale. La récupération sur la zone traitée avec l'invention est significativement supérieure à celle sur la zone placebo dès 24h et 72h (respectivement $p = 0,0584$ et $p = 0,0142$).

Un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention formulé à 3% améliore donc la capacité de récupération de la fonction barrière de la peau.

▪ Etude de l'effet de *Pichia Heedii* sur l'éclat du teint

• *Etude sur un panel caucasien*

L'objectif de cette étude a été d'évaluer, *in vivo*, l'effet d'un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention formulé à 3% en émulsion sur l'éclat du teint de la peau contre placebo.

5 Cette étude a été réalisée sur 20 volontaires caucasiens, sains, de sexe féminin, d'âge moyen 53 ± 2 ans.

L'évaluation de l'éclat du teint du visage a été réalisée en aveugle, par deux experts entraînés, avant et après 14 et 28 jours d'applications biquotidiennes en héli-visage du placebo et de l'invention (exemple 3).

10 Un résumé des résultats est présenté sur le Tableau 13.

	Variation / Placebo (%)	
	J14	J28
Rayonnement	+7% ($p = 0,0184$)	+12% ($p = 0,0092$)
Couleur rose	+14% ($p = 0,0019$)	+17% ($p = 0,0002$)
Couleur olive	-7% ($p = 0,0430$)	-15% ($p = 0,0011$)
Etat de fatigue des yeux	-7% ($p = 0,0378$)	-14% ($p = 0,0047$)

Tableau 13

On constate que dans les conditions de cette étude, dès 14 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison au placebo, un principe actif de *Pichia Heedii* formulé à 3% en émulsion :

- 15
- améliore significativement le rayonnement de la peau de 7% ($p = 0,0184$) et la couleur rose, caractéristique d'un teint frais, de 14% ($p = 0,0019$).
 - diminue significativement la couleur olive de 7% ($p = 0,0430$) et l'état de fatigue des yeux de 7% ($p = 0,0378$).

20 Cet effet se poursuit après 28 jours d'applications, en effet un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention:

- augmente significativement le rayonnement de la peau de 12% ($p = 0,0092$; effet validé chez 80% des volontaires) ainsi que la couleur rose de 17% ($p = 0,0002$; effet validé chez 80% des volontaires).

- permet une diminution significative de la couleur olive de 15% ($p = 0,0011$) et de l'état de fatigue des yeux de 14% ($p = 0,0047$). Cet effet a été observé chez respectivement 65% et 80% des volontaires.

5 • *Etude sur un panel asiatique*

L'objectif de cette étude a été d'évaluer, *in vivo*, l'effet d'un principe actif de *Pichia Heedii* formulé à 3% en émulsion sur l'éclat du teint de sujets asiatiques.

28 volontaires sains, de sexe féminin, d'âge moyen 50 ± 5 ans ont été inclus dans cette étude.

- 10 L'évaluation de l'éclat du teint du visage a été réalisée en aveugle, par un expert entraîné, avant et après 14 et 28 jours d'applications biquotidiennes du placebo et de l'invention (exemple 3) en héli-visage.

Un résumé des résultats est présenté dans le tableau 14.

	Variation / Placebo (%)
Couleur marron	-9% ($p = 0,031$)
Couleur marron clair	-8% ($p = 0,013$)
Couleur olive	-7% ($p = 0,064$)
Couleur jaune	-12% ($p = 0,006$)
Couleur beige	-4% ($p = 0,092$)
Couleur rose clair	+24% ($p < 0,001$)
Luminosité	+7% ($p = 0,250$)
Rayonnement	+6% ($p = 0,264$)

Tableau 14

- 15 Dans les conditions de cette étude, après 28 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison au placebo, on constate qu'un principe actif de *Pichia Heedii* formulé à 3% en émulsion :

- * Diminue significativement les couleurs de la peau de personnes d'origine asiatique évaluées cliniquement. En effet, l'invention diminue :

- la couleur marron de 9% ($p = 0,031$), cet effet a été observé chez 61% des volontaires ;
 - la couleur marron clair de 8% ($p = 0,013$), cet effet a été observé chez 68% des volontaires ;
- 5
- la couleur olive de 7% ($p = 0,064$), cet effet a été observé chez 61% des volontaires ;
 - la couleur jaune de 12% ($p = 0,006$), cet effet a été observé chez 68% des volontaires.
- * De plus, l'invention améliore significativement la couleur rose clair de 24% ($p < 0,001$).
 - * Enfin, l'invention améliore les paramètres ayant trait à la réflexion de la lumière, en
- 10 augmentant :
- la luminosité de la peau de 7% ($p = 0,250$) ;
 - le rayonnement de la peau de 6% ($p = 0,264$) ;
 - la transparence de la peau de 6% ($p = 0,115$).

Ainsi, un principe actif de *Pichia Heedii* selon l'invention améliore l'éclat du teint de

15 personnes d'origine asiatique.

- Effet de *Pichia Heedii* sur l'éclaircissement de la peau de sujets d'origine asiatique. Etude colorimétrique.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer, in vivo, l'effet du principe actif selon l'invention

20 formulé à 3% en émulsion contre placebo sur l'éclaircissement de la peau de sujets asiatiques.

28 volontaires sains, de sexe féminin, d'âge moyen 50 ± 5 ans, ont été inclus dans cette étude.

Les mesures ont été réalisées en aveugle au niveau du visage à l'aide d'un Chromamètre® avant et après 14 et 28 jours d'applications biquotidiennes du placebo et du principe actif (exemple 3) en héli-visage.

25

Un résumé des résultats est présenté dans le tableau 15.

	Paramètre L*		Paramètre ITA°	
	Placebo	Principe actif 3%	Placebo	Principe actif 3%
J0	57,96	57,91	89,00	89,00
J28	58,32	58,62	89,01	89,02
p-valeur	0,101	0,031	0,124	0,028

Tableau 15

Dans les conditions de cette étude, après 28 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison au placebo, le principe actif selon l'invention formulé à 3% en émulsion tend à éclaircir la peau de personnes d'origine asiatique.

En effet, une augmentation significative des paramètres L* et ITA°, caractéristique d'une
5 peau plus claire et plus lumineuse, est observée après 28 jours d'applications biquotidiennes du principe actif.

▪ Evaluation subjective de l'effet du principe actif selon l'invention *Pichia Heedii*

10 • *Etude sur panel caucasien*

L'objectif de cette étude a été de quantifier les sensations observées lors de l'utilisation biquotidienne du principe actif selon l'invention formulé à 3% en émulsion (exemple 3) et testé contre placebo pendant 28 jours en traitement biquotidien en héli-visage.

Cette étude a été réalisée sur 20 volontaires caucasiens, sains, de sexe féminin, d'âge
15 moyen 53 ± 2 ans, sélectionnés selon les critères décrits.

Les résultats des questions fermées sont présentés dans le tableau 16.

Avec cette émulsion,	Cumul des réponses "plutôt d'accord" et "d'accord" (%)		
	Côté traité par placebo	Côté traité par Principe actif 3%	p-valeur
ma peau est plus éclatante.	74	94	0,1065
mon teint est plus frais.	74	94	0,0459
ma peau est purifiée.	63	83	0,0337
ma peau est revitalisée.	63	74	0,1003
ma peau paraît plus résistante.	61	68	0,0484
mon teint est dégrisé.	84	100	0,0821

Tableau 16

20 Dans les conditions de cette étude, après 28 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison au placebo :

- le principe actif rend la peau plus éclatante pour 94% des volontaires, contre 74% pour le placebo (p = 0,1065).

- 94% d'entre elles trouvent que le principe actif permet à leur teint de paraître plus frais, contre 74% pour le placebo ($p = 0,0459$).
 - Pour respectivement 83% et 74% des volontaires, le principe actif purifie la peau et apporte un effet revitalisant, contre 63% pour le placebo (respectivement $p = 0,0337$ et $p = 0,1003$).
- 5
- De plus, pour 68% des volontaires, le principe actif rend la peau plus résistante, elles sont 61% à faire le même constat après 28 jours d'applications du placebo ($p = 0,0484$).
 - Enfin, l'ensemble des volontaires trouve qu'avec le principe actif, leur teint est dégrisé, contre 84% pour le placebo ($p = 0,0821$).

Après 28 jours d'applications biquotidiennes, le principe actif formulé à 3% en émulsion est perçu d'une manière générale comme plus efficace que le placebo.

En effet, les volontaires ont trouvé majoritairement leur peau plus résistante et purifiée ainsi que leur teint plus frais et dégrisé.

- *Etude sur panel asiatique*

15 L'objectif de cette étude a été de quantifier les sensations observées lors de l'utilisation biquotidienne du principe actif formulé à 3% en émulsion (exemple 3) et testé contre placebo pendant 28 jours en traitement biquotidien en hémi-visage.

28 volontaires asiatiques, sains, de sexe féminin, d'âge moyen 50 ± 5 ans, sélectionnés selon les critères définis. Les résultats des questions fermées sont présentés dans le tableau 17.

20

Avec cette émulsion,	Cumul des réponses "d'accord" (%)		
	Côté traité par placebo	Côté traité par le principe actif à 3%	<i>p-valeur</i>
ma peau est plus lumineuse.	79	93	<i>0,1335</i>
mon teint est dégrisé.	86	89	<i>0,6993</i>
mon grain de peau est affiné	89	93	<i>0,6527</i>
ma peau est revitalisée.	79	89	<i>0,2851</i>
ma peau est purifiée.	82	96	<i>0,0896</i>
ma peau paraît plus lisse.	89	100	<i>0,0813</i>
Cette émulsion réduit les signes de fatigue.	86	96	<i>0,1686</i>
la couleur de mon teint est plus uniforme.	82	96	<i>0,0896</i>
Cette émulsion réduit les imperfections.	82	97	<i>0,2352</i>

Tableau 17

- Le côté traité par le principe actif rend la peau plus lumineuse et affine le grain de peau pour 93% des volontaires, contre respectivement 79% et 89% pour le côté traité par le placebo (respectivement $p = 0,1335$ et $p = 0,6527$).
- 89% d'entre elles s'accordent à dire qu'avec le principe actif le teint paraît dégrisé et la peau revitalisée, contre respectivement 86% et 79% pour le côté traité par le placebo (respectivement $p = 0,6993$ et $p = 0,2851$).
- Pour 96% des volontaires, le principe actif purifie la peau, et uniformise le teint. Elles sont 82% à faire le même constat sur le côté traité par le placebo ($p = 0,0896$).
- Elles sont 96% à constater que le principe actif réduit les signes de fatigue contre 86% pour le placebo ($p = 0,1686$).
- De plus, l'ensemble des volontaires trouve qu'avec le principe actif leur peau paraît plus lisse. Elles sont 89% à faire le même constat après 28 jours d'application du placebo ($p = 0,0813$).
- Enfin, pour 97% des volontaires le principe actif réduit les imperfections, contre 82% pour le placebo ($p = 0,2352$).

Après 28 jours d'applications biquotidiennes, le principe actif formulé à 3% en émulsion est perçu d'une manière générale comme plus efficace que le placebo.

En effet, les volontaires d'origine asiatique ont trouvé majoritairement leur teint plus uniforme, leur peau plus lumineuse et lisse.

REVENDICATIONS

1. Principe actif cosmétique caractérisé en ce qu'il s'agit d'un principe actif de *Pichia Heedii*.
2. Principe actif cosmétique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 30% de carbohydrates en poids par rapport au poids total de matière sèche du principe actif.
5
3. Principe actif cosmétique selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend des glucomannanes de masses molaires comprises entre 360 et 4000 Da.
4. Principe actif cosmétique selon la précédente revendication, caractérisé en ce que les glucomannanes de masses molaires comprises entre 360 et 4000 Da représentent
10 au moins 50% en poids des carbohydrates du principe actif.
5. Principe actif selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il présente un taux de matières sèches compris entre 13 et 57g/l.
6. Principe actif selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il présente un taux de matières sèches compris entre 26 et 38g/l.
- 15 7. Principe actif selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un hydrolysate de *Pichia Heedii*.
8. Principe actif selon l'une des revendications 1 à 7 pour une utilisation pour lutter contre les effets délétères de la pollution sur la peau en renormalisant la synthèse de la prohibitine-1.
- 20 9. Principe actif selon l'une des revendications 1 à 7 pour une utilisation pour lutter contre les effets délétères de la pollution sur la peau en inactivant le récepteur Aryl-hydrocarbène (AhR).
10. Utilisation de *Pichia Heedii* ou d'un principe actif de *Pichia Heedii* comme principe actif cosmétique destiné à être appliqué sur la peau en application topique au
25 sein d'une composition cosmétique.
11. Utilisation selon la revendication 10, pour un effet cosmétique anti-pollution sur la peau.
12. Utilisation selon l'une des revendications 10 ou 11, pour lutter contre les effets délétères de la pollution sur la peau.

13. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 12, pour améliorer la couleur et l'éclat de la peau.
14. Utilisation selon la précédente revendication, pour améliorer la couleur de la peau en réduisant la synthèse de mélanine des cellules de la peau.
- 5 15. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 14, pour améliorer la fonction barrière de la peau.
16. Utilisation selon la précédente revendication, pour améliorer la fonction barrière de la peau en améliorant la différenciation épidermique.
17. Utilisation selon la précédente revendication, pour améliorer la fonction
- 10 barrière de la peau en réduisant la perte insensible en eau de la peau.
18. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 17, caractérisée en ce que le principe actif de *Pichia Heedii* est un principe actif selon l'une des revendications 2 à 7.
19. Composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 0,25% en poids de matières sèches de *Pichia Heedii* ou d'un principe actif de *Pichia Heedii*.
- 15 20. Composition cosmétique selon la revendication 19, caractérisé en ce que le principe actif de *Pichia Heedii* est un principe actif cosmétique selon l'une des revendications 2 à 7.
21. Procédé cosmétique de soin de la peau pour lutter contre les effets délétères de la pollution sur la peau, caractérisé en ce qu'il consiste à appliquer au moins une fois
- 20 par jour sur la peau du visage une composition selon l'une des revendications 19 à 20.
22. Procédé cosmétique de soin de la peau selon la revendication 21, pour augmenter l'efficacité de la fonction barrière de la peau et/ou améliorer la couleur et l'éclat des peaux polluées.

1/2

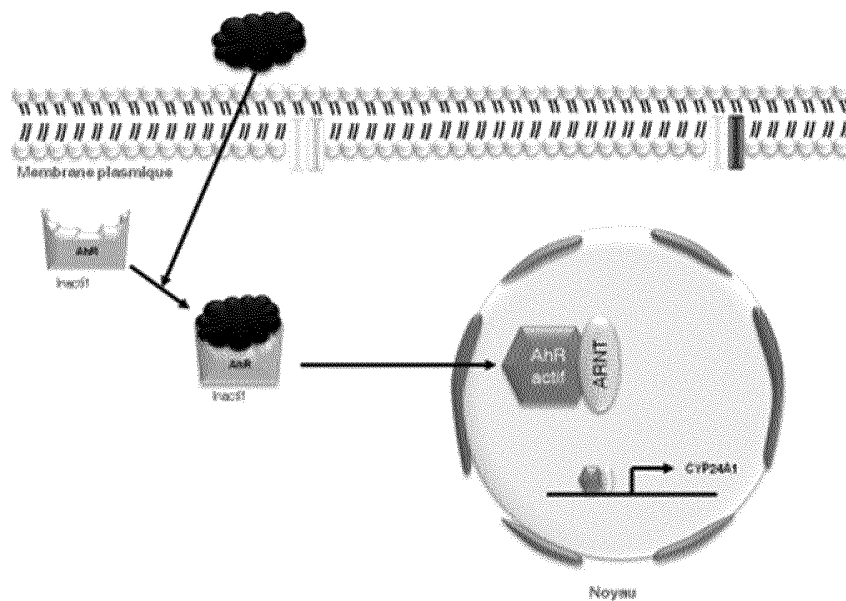


Figure 1

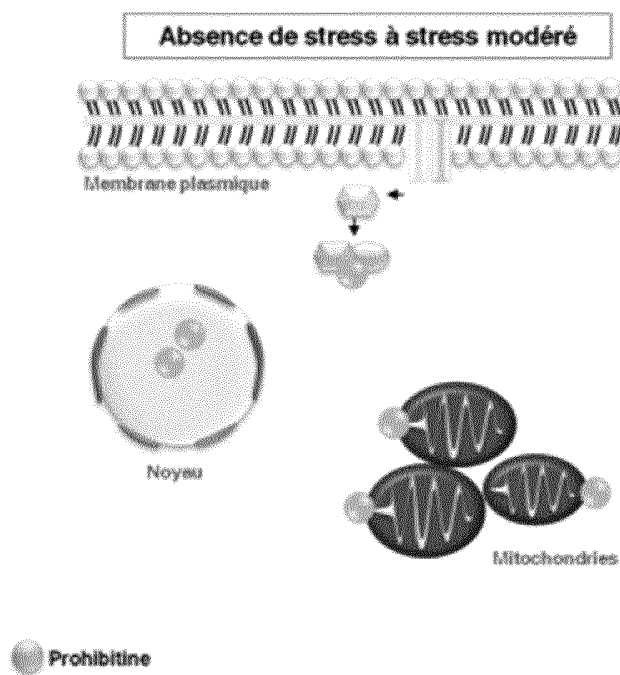


Figure 2

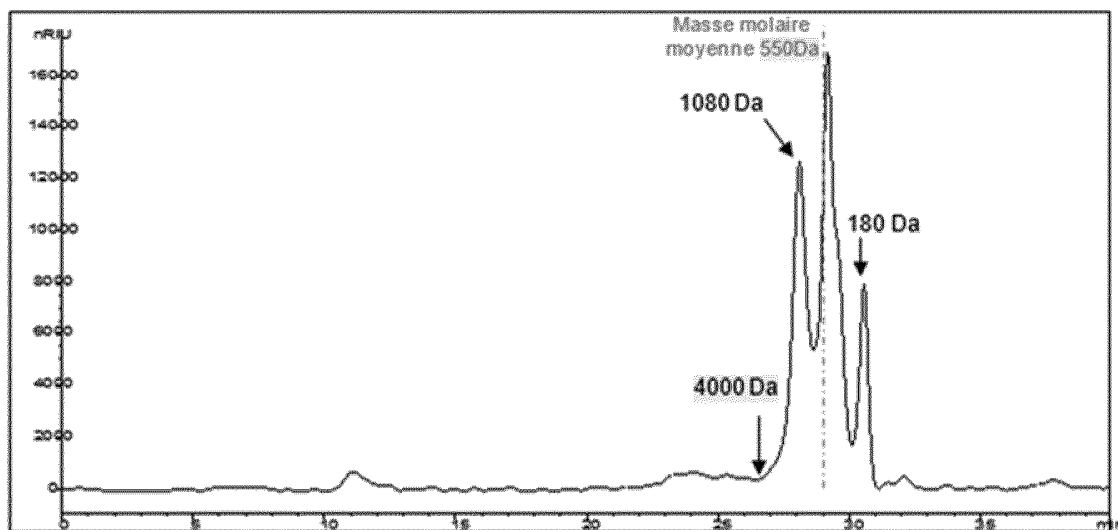


Figure 3

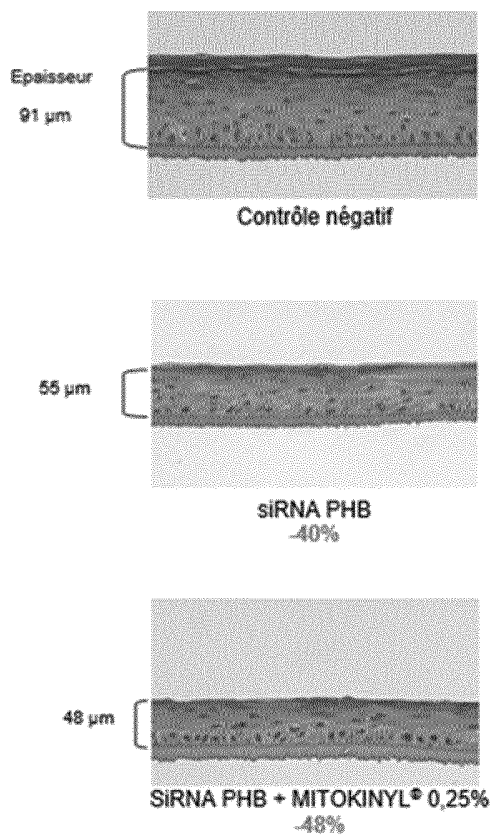


Figure 4

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement
national

FA 821900
FR 1650193

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2014/162036 A1 (INMUNOTEK SL) 9 octobre 2014 (2014-10-09)	1-22	A61K8/97 A61K8/73 A61Q17/00 A61Q19/00
Y	* page 10; revendications 1, 2, 3 *	1-22	
X	EP 0 789 079 A2 (KANSAI PAINT CO LTD [JP]) 13 août 1997 (1997-08-13) * revendications 1, 2; exemple 2 *	1-22	
X	VIRGINIA ROJAS ET AL: "Measurement of alcohol acetyltransferase and ester hydrolase activities in yeast extracts", ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 30, no. 2, 1 février 2002 (2002-02-01), pages 224-230, XP055157579, ISSN: 0141-0229, DOI: 10.1016/S0141-0229(01)00483-5 * alinéa [04.1]; tableau 1 *	1-22	
X	US 2008/230399 A1 (SODE KOJI [JP]) 25 septembre 2008 (2008-09-25) * alinéa [0033] *	1-22	
Y	FR 2 938 768 A1 (LIMOUSINE D APPLIC BILOG DITE [FR]) 28 mai 2010 (2010-05-28) * page 1, ligne 16 - page 3, ligne 11 * * page 7, ligne 10 - page 9, ligne 13 * * page 12 - page 14; revendications 1-11 *	1-22	
T	"Silab's new active protects the skin against pollution", premium beauty news 22 février 2016 (2016-02-22), XP002759028, Extrait de l'Internet: URL: http://www.premiumbeautynews.com/en/silab-s-new-active-protects-the,9326 [extrait le 2016-06-21] * le document en entier *		
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		21 juin 2016	Szarek, Sophie
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1650193 FA 821900**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 21-06-2016

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

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2014162036	A1	09-10-2014	CN 105492022 A	13-04-2016
			EP 2982381 A1	10-02-2016
			ES 2503516 A2	06-10-2014
			JP 2016515603 A	30-05-2016
			US 2016058859 A1	03-03-2016
			WO 2014162036 A1	09-10-2014

EP 0789079	A2	13-08-1997	DE 69621765 D1	18-07-2002
			DE 69621765 T2	06-03-2003
			EP 0789079 A2	13-08-1997
			US 5780275 A	14-07-1998

US 2008230399	A1	25-09-2008	EP 1614746 A1	11-01-2006
			JP 2004275168 A	07-10-2004
			US 2008230399 A1	25-09-2008
			WO 2004083419 A1	30-09-2004

FR 2938768	A1	28-05-2010	AUCUN	
