

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

2 946 531

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

②1 N° d'enregistrement national :

09 53988

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 8/97** (2006.01), **A 61 Q 19/08**, 19/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 15.06.09.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 17.12.10 Bulletin 10/50.

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 :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE Etablissement public —
FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *BAKALA JOHANNA, LALLEMAND
JEAN YVES, ACHAB MARIA CONCEPCION, POUPAT
CHRISTIANE et NONGONIERMA RITA.*

⑦3 Titulaire(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA RECHER-
CHE SCIENTIFIQUE Etablissement public.*

⑦4 Mandataire(s) : *CABINET REGIMBEAU.*

⑤4 **UTILISATION COSMETIQUE D'UN EXTRAIT DE SALVINIA NYMPHELLULA DESV.**

⑤7 La présente invention a pour objet un extrait de la
plante aquatique *Salvinia nymphellula* Desv. pour la restruc-
turation de la peau telle qu'une activité anti-âge, ainsi que
son procédé de préparation. La présente invention concer-
ne également une composition cosmétique comprenant
l'extrait et un support cosmétiquement acceptable. Elle a
encore pour objet l'utilisation de la composition cosmétique
ou de l'extrait ou d'une préparation de tout ou partie de la
plante aquatique *Salvinia nymphellula* Desv., pour la res-
turation de la peau.

FR 2 946 531 - A1



5 La présente invention a pour objet un extrait de la plante aquatique *Salvinia nymphellula* Desv. pour la restructuration de la peau telle qu'une activité anti-âge, ainsi que son procédé de préparation. La présente invention concerne également une composition cosmétique comprenant l'extrait et un support cosmétiquement acceptable. Elle a encore pour objet l'utilisation de la composition cosmétique ou de
10 l'extrait ou d'une préparation de tout ou partie de la plante aquatique *Salvinia nymphellula* Desv., pour la restructuration de la peau.

15 La peau est un organe à part entière, jouant un rôle fondamental dans la santé et également dans l'apparence. Barrière à la fois résistante et fragile, elle est en perpétuel renouvellement. Malgré cela, les premiers signes du vieillissement cutané se manifestent, discrètement, avant 30 ans. En vieillissant, la peau se ride, se relâche, est moins hydratée et se répare plus difficilement. Ces signes cliniques qui affectent l'apparence résultent de la superposition d'un processus «extrinsèque»,
20 essentiellement dû à l'action des UV, et de facteurs dits «intrinsèques» correspondant au vieillissement chronologique.

25 La peau est formée de deux couches jointes : l'épiderme et le derme auxquelles on peut associer les tissus sous-cutanés. L'épiderme dont le rôle principal est la protection du corps constitue la couche la plus superficielle de la peau et assure l'imperméabilité de la peau et sa résistance. Il se renouvelle toutes les quatre semaines environ. Si différents types cellulaires coexistent dans l'épiderme, les kératinocytes sont largement majoritaires (90 %). Leur activité caractéristique est la synthèse des kératines qui représentent 95 % des protéines totales de l'épiderme. Les kératines, protéines fibreuses et insolubles dans l'eau, entrent dans la
30 constitution de la couche cornée de l'épiderme qui protège la peau contre les agressions extérieures (chaleur, froid, déshydratation).

L'épiderme est relié au derme par une zone appelée la jonction dermo-épidermique ou membrane basale épidermique. Cette structure assure l'adhérence du derme à l'épiderme et joue le rôle de support mécanique responsable en partie de la tonicité de la peau. Elle est élaborée à la fois par les kératinocytes basaux et par
5 les fibroblastes dermiques et elle contient un taux important de collagène de type IV qui fait partie des plaques d'ancrage reliant la membrane basale à des plaques d'ancrage présentes dans le derme papillaire.

Le derme, la couche interne de la peau, est un tissu conjonctif fibro-élastique composé de cellules (les fibroblastes) dispersées dans un milieu complexe appelé
10 matrice extracellulaire. Cette matrice est constituée de fibres de collagène et d'élastine, de glycoprotéines (fibronectine et laminine) et de protéoglycanes (protéine centrale + glycoaminoglycanes, GAGs). La nature et la quantité de ces composants régissent les propriétés mécaniques de la peau normale et sont à l'origine des modifications physiopathologiques les plus visibles du relief cutané
15 observées au cours du vieillissement. Les fibres donnent à la peau solidité, résistance, élasticité et tonicité. Les glycoprotéines et protéoglycanes apportent le volume et participent à l'hydratation.

Les collagènes, les protéines composant 75 % du derme, représentent le « ciment » du derme. Leur arrangement spatial particulier confère une rigidité à la
20 molécule de collagène, contribuant ainsi à la fonction mécanique de celle-ci. Les mouvements répétés du visage et le vieillissement entraînent progressivement une diminution du taux de collagène qui assure en grande partie le soutien et l'élasticité de la peau.

Les protéoglycanes, macromolécules complexes de grande taille dispersées
25 entre les fibres du tissu conjonctif dermique, assurent en grande partie la tonicité de la peau. En fait, la structure des glycosaminoglycanes (GAGs), polymères formés de longues chaînes de polysaccharides qui font partie de ces macromolécules, confère aux protéoglycanes des charges négatives permettant de "piéger" les ions, l'eau et divers métabolites, contribuant ainsi principalement à l'hydratation de la peau et à la
30 résistance aux forces de pression et d'étirement.

Le vieillissement affecte d'abord l'épiderme. Le pouvoir de division des kératinocytes dans sa couche basale diminue et le temps de renouvellement de la

couche cornée superficielle se rallonge. La maturation de ces cellules est imparfaite et la kératinisation n'aboutit plus à créer une couche cornée régulière et homogène d'où la diminution de l'épaisseur de l'épiderme, son dessèchement et son aspect rêche.

5 On note dans le même temps une désorganisation de la partie profonde de la peau. En effet, le derme qui assure à la fois les fonctions fondamentales de cohésion et de nutrition de la peau est la cible principale d'endommagement cutané.

 En vieillissant, les fibroblastes qui sont à l'origine des substances constitutives du derme disparaissent ou se transforment en fibrocytes. En
10 conséquence, on assiste à la réduction du taux de la fibronectine qui joue un grand rôle dans l'adhésion et la fonction cellulaire ainsi qu'à la diminution du nombre et de la qualité des fibres élastiques. La diminution de la quantité de collagène (1 % par an) explique la perte d'élasticité du derme et la diminution de l'épaisseur de la peau à partir de l'âge de 20 ans. La perte de souplesse des liens unissant les cellules
15 dermiques entre elles est à l'origine des différentes plaies et déchirures observables chez les personnes âgées. Ceci explique également l'apparition de poche sous les yeux et de rides cutanées.

 Le prolongement de la durée de vie, associé à un désir de conserver une
20 apparence jeune, a stimulé la recherche dans la compréhension des changements de structure de la peau lors du vieillissement. Aujourd'hui, avec des crèmes, des laits et des compléments nutritionnels, il est possible de retarder le vieillissement de la peau.

 En effet, les tissus structurants de la peau (conjonctif, cornéen et
25 fibroplasmique) sont les premiers responsables de notre apparence. Parmi leurs constituants, les collagènes, la laminine et les glycosaminoglycanes (GAGs) jouent tous un rôle important dans l'évolution des tissus. C'est en partie sur eux qu'agissent les produits cosmétiques.

30 Les Inventeurs ont mis au point un extrait de la fougère aquatique *Salvinia nymphellula* Desv. appartenant à la famille des Salviniacées et largement distribuée dans le monde, majoritairement dans les régions tropicales. Ils ont pu démontrer que

cet extrait permet de stimuler la production du collagène IV, de la laminine-5 et des glycosaminoglycanes (GAGs), et qu'il a donc un effet anti-vieillessement sur l'épiderme et le derme.

5 Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention a pour objet un extrait de la plante *Salvinia nymphellula* Desv.

Salvinia nymphellula Desv. (ou *Salvinia nigropunctata*) appartient à l'embranchement des *Pteridophyta*, au sous-embranchement des Cryptogames, à la classe des *Filicopsidae* (communément appelées *Fougères*), à la sous-classe des
10 *Amphylophoreae*, au groupe des *Leptosporangieae-Hydropterideae*, à l'ordre des *Salviniales*, à la famille des *Salviniaceae* et au genre *Salvinia* (Miralles J. et al, 1989).

Les *Salvinias* sont des fougères aquatiques flottantes non enracinées. Elles sont composées d'une tige ramifiée. À chaque nœud de celle-ci, il apparaît trois
15 feuilles présentant un dimorphisme marqué : deux feuilles chlorophylliennes sont étalées à la surface de l'eau (rôle de flottaison) et la troisième feuille réduite à ses nervures, ressemble à des racines. Cette dernière porte les fructifications (sporangies).

Le genre *Salvinia* compte une trentaine d'espèces, dont *Salvinia nymphellula*
20 Desv., caractérisée par des feuilles chlorophylliennes opposées intimement soudées à la base, de couleur vert-brun ou vert bleuté, à la face inférieure lisse ou avec de très rares poils et à la face supérieure recouverte d'un duvet de poils courts.

Le genre *Salvinia* se développe dans les climats chauds de l'Amérique du Sud, d'Asie et d'Afrique. *Salvinia nymphellula* Desv. est originaire d'Amérique du
25 Sud, elle affectionne aussi les eaux chaudes entre 20 et 30° C des fleuves, des lacs d'eau douce, des barrages, des canaux, des rigoles d'Afrique (Burkina, Congo Démocratique, Ghana, Nigéria, Sénégal).

De préférence, l'extrait de la plante *Salvinia nymphellula* Desv. est un extrait de la plante entière *Salvinia nymphellula* Desv.

30 Dans la présente invention, on entend par « extrait de la plante *Salvinia nymphellula* Desv. » tout extrait issu de cette plante par voie physique et/ou chimique. De telles voies d'extraction sont bien connues de l'homme de l'art. Par

exemple, sans toutefois s'y limiter, une extraction par voie physique peut consister en une extraction dans des phases supercritiques telles que le CO₂ supercritique, ou encore en une extraction par ultrasons. Egalement, sans toutefois s'y limiter, une extraction par voie chimique peut consister en une extraction à l'aide d'un solvant
5 organique (extraction organique), une extraction à l'aide de l'eau (extraction aqueuse) ou encore une extraction organique-aqueuse. Dans ce dernier cas, on utilisera tout solvant organique miscible à l'eau (mélange acétone-eau, acétonitrile-eau, éthanol-eau, isopropanol-eau, dioxane-eau, etc...).

De préférence, l'extrait de la plante *Salvinia nymphellula* Desv. est un extrait
10 obtenu à l'aide d'un solvant organique, auquel cas l'extrait est un extrait organique.

Les solvants organiques pouvant être utilisés pour l'extraction dans le cadre de la présente invention sont bien connus de l'homme de l'art. Il peut s'agir par exemple, sans toutefois s'y limiter, des alcools, des esters, du glycérol, des solvants apolaires tel que l'hexane ou l'éther de pétrole, des éthers, des solvants chlorés, des
15 solvants polaires aprotiques tels que les cétones, ainsi que des mélanges d'au moins deux de ces solvants miscibles.

De préférence, le solvant organique utilisé est un solvant polaire aprotique. De manière encore plus préférée, le solvant polaire aprotique est une cétone. De manière préférée entre toutes, la cétone est l'acétone, auquel cas l'extrait est un
20 extrait acétonique.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un extrait organique de la plante *Salvinia nymphellula* Desv., comprenant les étapes suivantes :

- 25
- a) le séchage de la plante ;
 - b) le broyage de la plante séchée obtenue à l'étape a) pour obtenir une poudre ;
 - c) au moins une extraction de la poudre obtenue à l'étape b) avec au moins un solvant organique dans des conditions appropriées afin
30 d'obtenir un marc et un extrait ; et
 - d) l'élimination du solvant organique présent dans l'extrait afin d'obtenir l'extrait organique de *Salvinia nymphellula* Desv.

De préférence, on procède à l'étape a) au séchage de la plante entière *Salvinia nymphellula* Desv.

Les conditions appropriées pour l'extraction à l'aide d'un solvant organique sont bien connues de l'homme du métier, et incluent la durée et la température
5 d'extraction ainsi que le volume de solvant organique en fonction de la quantité de poudre de départ.

L'étape d) d'élimination du solvant organique peut être obtenue selon toute méthode connue de l'homme de l'art, telle que l'évaporation dudit solvant à température et pression variables.

10 Les solvants organiques pouvant être utilisés sont tels que décrits ci-dessus. Avantagement, le solvant organique est choisi parmi les alcools, les esters, le glycérol, les solvants apolaires tel que l'hexane ou l'éther de pétrole, les éthers, les solvants chlorés, les solvants polaires aprotiques tels que les cétones, ainsi que les
15 mélanges d'au moins deux de ces solvants miscibles. De préférence, le solvant organique est un solvant polaire aprotique de type cétone, de préférence l'acétone.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé de préparation selon l'invention, l'étape c) comprend au moins deux extractions successives. De préférence, lesdites extractions successives de l'étape c) sont réalisées avec deux
20 solvants organiques différents ou mélanges de solvants organiques différents miscibles.

De manière encore plus préférée, le procédé de préparation selon la présente invention comprend les étapes suivantes :

- a) le séchage de ladite plante ;
- b) le broyage de la plante séchée obtenue à l'étape a) pour obtenir la
25 poudre ;
- c1) une première extraction de la poudre obtenue à l'étape b) avec de l'éther de pétrole dans des conditions appropriées afin d'obtenir un marc et un premier extrait;
- c2) une deuxième extraction du marc obtenu à l'étape c1) avec de
30 l'acétone dans des conditions appropriées afin d'obtenir un marc et un deuxième extrait ;

- d) l'élimination de l'acétone présente dans le deuxième extrait afin d'obtenir l'extrait acétonique de *Salvinia nymphellula* Desv.

Par « marc » on entend désigner dans la présente invention le résidu de la plante obtenu après extraction organique. Ainsi, lors d'une extraction organique, on obtient d'une part le marc ou résidu de plante, d'autre part l'extrait organique. Il est ensuite possible de procéder à une deuxième extraction à partir de ce marc, et ainsi de suite.

L'extraction à l'éther de pétrole permet de dégraisser la poudre.

De manière également préférée, le procédé de préparation selon la présente invention comprend les étapes successives suivantes :

- a) le séchage de ladite plante ;
- b) le broyage de la plante séchée obtenue à l'étape a) pour obtenir la poudre ;
- c1) une première extraction de la poudre obtenue à l'étape b) avec de l'éther de pétrole dans des conditions appropriées afin d'obtenir un marc et un premier extrait;
- c2) une deuxième extraction du marc obtenu à l'étape c1) avec de l'acétone dans des conditions appropriées afin d'obtenir un marc et un deuxième extrait ;
- d1) l'élimination de l'acétone présente dans le deuxième extrait afin d'obtenir l'extrait acétonique de *Salvinia nymphellula* Desv.
- c3) une troisième extraction du marc obtenu à l'étape c2) avec de l'éthanol dans des conditions appropriées afin d'obtenir un marc et un troisième extrait ;
- d2) l'élimination de l'éthanol présent dans le troisième extrait afin d'obtenir l'extrait éthanolique de *Salvinia nymphellula* Desv.

De manière encore plus préférée, le procédé de préparation selon l'invention comprend en outre, après l'étape d) d'élimination du solvant organique, l'étape suivante :

- e) le fractionnement de l'extrait organique obtenu à l'étape d).

Le fractionnement de l'extrait organique peut être réalisé selon toute méthode connue de l'homme de l'art, telle que, sans toutefois s'y limiter, la chromatographie ou la cristallisation. Avantageusement, le fractionnement est effectué par chromatographie. Toutes les méthodes chromatographiques sont envisageables. Par exemple, il peut s'agir d'une chromatographie d'adsorption
5 liquide/solide en phase normale ou en phase inverse. Il peut également s'agir d'une chromatographie à basse, moyenne ou haute pression.

De préférence, le fractionnement de l'extrait organique à l'étape e) est effectué par chromatographie liquide haute performance en phase inverse où, de préférence, la silice est greffée de chaînes alkyle à 18 atomes de carbone (« colonne
10 C-18 »). Ladite chromatographie est suivie de l'élimination du solvant d'élution utilisé pour ladite chromatographie.

Le solvant d'élution peut être éliminé selon toute méthode connue de l'homme de l'art, telle que l'évaporation et/ou la lyophilisation.

De manière préférée entre toutes, le procédé de préparation selon l'invention comprend en outre, après l'étape d1) d'élimination de l'acétone, l'étape suivante :

e) le fractionnement de l'extrait acétonique obtenu à l'étape d1).

De préférence, le rendement d'extraction du procédé de préparation selon la présente invention est compris entre 0,01 % et 10 % en poids par rapport au poids
20 de la plante sèche, avantageusement entre 0,05 % et 7,5 %, de manière encore plus préférée entre 0,1 % et 5 %, de manière encore plus préférée entre 0,25 % et 3 %, de manière préférée entre toutes entre 0,5 % et 2,8 % en poids par rapport au poids de la plante sèche.

25

L'invention a également pour objet l'extrait organique susceptible d'être obtenu par le procédé de préparation selon la présente invention.

Selon encore un autre aspect, l'invention a pour objet une composition
30 cosmétique comprenant l'extrait selon la présente invention et un support cosmétiquement acceptable.

La composition cosmétique selon l'invention comprend un support cosmétiquement acceptable, c'est-à-dire un support compatible avec la peau. Elle peut avantageusement se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées pour une application topique, notamment sous forme d'une solution
5 aqueuse, hydroalcoolique ou huileuse, d'une émulsion huile-dans-eau ou eau-dans-huile ou multiple, d'un gel aqueux ou huileux, d'un produit anhydre liquide, pâteux ou solide, d'une dispersion d'huile dans une phase aqueuse à l'aide de sphérules (nanosphères, nanocapsules, vésicules lipidiques), d'un dispositif trans-dermique ou sous toute autre forme pour application topique.

10 Cette composition peut être plus ou moins fluide et avoir l'aspect d'une crème, d'une pommade, d'un lait, d'une lotion, d'un sérum, d'une pâte, d'un baume, d'une mousse, d'un gel ou d'un gel moussant. Elle peut également être appliquée sur la peau sous forme d'aérosol. Elle peut également se présenter sous forme solide, et par exemple sous forme de stick. Elle peut aussi être appliquée au
15 moyen d'un patch.

La composition cosmétique selon l'invention peut également comprendre les adjuvants habituels dans le domaine cosmétique, tels que les stabilisants, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les agents chélateurs, les absorbeurs d'odeur, les filtres chimique ou minéraux, les pigments minéraux, les
20 tensioactifs, les polymères, les huiles de silicone, les matières colorantes, les émulsionnants, les épaississants, les gélifiants, les fixateurs d'eau et les agents d'étalement.

Avantageusement, la teneur de l'extrait est comprise entre 0,01 % et 10 % en poids, de préférence 0,05 % et 10 % en poids, de manière encore plus préférée
25 entre 0,1 % et 10 % en poids, de manière encore plus préférée entre 0,5 % et 5 % en poids, de manière préférée entre toutes égale à 1 % en poids par rapport au poids total de la composition.

Selon un mode de réalisation préféré, la composition cosmétique selon la présente invention comprend en outre au moins un autre principe cosmétiquement
30 actif tel que, sans toutefois s'y limiter, un agent dépigmentant, par exemple l'acide rétinoïque, le rétinol, le resvératrol, les extraits de soja, un agent anti-oxydant, par exemple la vitamine C, la vitamine E, les polyphénols (notamment ceux extraits du

thé vert ou de raisin ou de pin), un filtre ou écran solaire UVB et UVA, par exemple les filtres minéraux et/ou organiques connus de l'homme du métier qui adaptera leur choix et leurs concentrations en fonction du degré de protection recherché, un agent exfoliant, une eau thermale, marine ou reconstituée à partir d'oligoéléments
5 exogènes.

L'invention a encore pour objet l'utilisation de la composition cosmétique selon la présente invention ou de l'extrait selon la présente invention ou d'une préparation de tout ou partie de la plante *Salvinia nymphellula* Desv., pour la
10 restructuration de la peau.

Dans la présente invention, on entend par « restructuration de la peau » une activité pouvant être déterminée en utilisant des critères tels que la stimulation de la structure épidermique (morphologie de la peau) et/ou la stimulation de la production de collagène et/ou la stimulation de la production de laminine-5 et/ou la stimulation
15 de la production de glycosaminoglycanes (GAGs). L'évaluation de tels critères est bien connue de l'homme de l'art. Ceux-ci peuvent être analysés à partir d'explants de peau au moyen de la microscopie optique et en utilisant des immunomarquages en ce qui concerne les composants protéiques étudiés. De préférence, on utilisera au moins l'un des critères cités ci-dessus, et de manière encore plus préférée
20 l'ensemble des critères cités ci-dessus. De préférence, la restructuration de la peau correspond à une activité anti-âge, de manière encore plus préférée une activité anti-rides.

Dans la présente invention, on entend par « préparation de tout ou partie de la plante *Salvinia nymphellula* Desv. » toute modification physique et/ou chimique
25 de *Salvinia nymphellula* Desv. ou d'une partie de cette plante, telle que, sans toutefois s'y limiter, le malaxage, en vue d'obtenir une composition pouvant être utilisée dans une composition cosmétique.

L'invention a également pour objet l'utilisation de la composition cosmétique selon la présente invention ou de l'extrait selon la présente invention ou
30 d'une préparation de tout ou partie de la plante *Salvinia nymphellula* Desv., pour son activité anti-âge, avantageusement pour son activité anti-rides.

L'invention a encore pour objet l'utilisation de la composition cosmétique selon la présente invention ou de l'extrait selon la présente invention ou d'une préparation de tout ou partie de la plante *Salvinia nymphellula* Desv., pour lutter contre le vieillissement intrinsèque de la peau et/ou pour stimuler le renouvellement épidermique et/ou pour améliorer l'élasticité et/ou la tonicité et/ou la souplesse de la peau et/ou pour prévenir, diminuer et/ou supprimer l'apparition des rides et ridules de la peau et/ou l'apparition de poches sous les yeux.

Les exemples et figures qui suivent permettent d'illustrer la présente invention sans pour autant en limiter la portée.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Chromatogrammes extraits à 280 nm. A : SN-S ; B : SN-I ; c : SN-I fraction 4.

Système CLHP Waters équipé d'une pompe Waters 600 couplé à un détecteur à barrette photodiode ultraviolet Waters 2996 ;
Conditions CLHP : Colonne : Waters Symmetry (4,6x250 mm) C-18, 5 µm; solvant A: H₂O + 0,1% ATF; solvant B: CH₃CN + 0,1% ATF; élution : en isocratique 5% B pendant 10 minutes, ensuite en gradient linéaire de 5% à 30% B en 15 minutes, de 30% à 55% B en 15 min et de 55% à 100% en 10 min, puis cette concentration a été maintenue; débit 1 ml/min.

Figure 2 : Morphologie générale de l'explant au J6 (A) et au J10 jours (B) de survie.

Explants non-traités : structure épidermique normale avec 4 à 5 assises cellulaires.
Explants traités avec l'extrait acétonique de *Salvinia* : structure épidermique épaisse (acanthose) avec 6 à 8 assises cellulaires.

Figure 3 : Expression de la laminine-5 dans l'explant au J10 de survie.

(A) Explant non-traité : la bande de la laminine-5 fine et régulière le long de la jonction dermo-épidermique. (B) Explant traité avec l'extrait acétonique de *Salvinia* : la bande de la laminine-5 plus épaisse et très régulière.

5

Figure 4 : Expression du collagène IV dans l'explant au J10 de survie.

(A) Explant non-traité : une expression du collagène nette et régulière au niveau de la jonction dermo-épidermique (B) Explant traité avec l'extrait acétonique de *Salvinia* : une forte expression du collagène IV au niveau de la jonction dermo-épidermique ainsi que dans le derme papillaire.

10

Figure 5 : Expression des GAGs dans l'explant au J10 de survie.

(A) Explant non-traité : les GAGs neutres présents le long de la jonction dermo-épidermique forment une bande plus ou moins régulière et peu épaisse (B) Explant traité avec l'extrait : les GAGs neutres présents le long de la jonction dermo-épidermique (JDE) sont très nets, formant une bande rose/violacée assez régulière et assez épaisse, par zones, dans le derme papillaire.

15

Figure 6 : Schéma du protocole d'extraction décrit dans l'exemple I.

20

EXEMPLES

25

Exemple I. Extraction et caractéristiques de la fraction active

Salvinia nymphellula Desv. a été récoltée en juin 2004 à Koudougou au Burkina Faso par A. Sanoko, directeur de l'Herbier de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD) et déposée sous le numéro 015SN.

30

Après séchage, la plante entière a été broyée pour obtenir une poudre qui a servi à la préparation des extraits. En effet, 200 g de poudre ont été extraits

successivement avec l'éther de pétrole (30 - 60°C), l'acétone et l'éthanol à 96%. Chaque extraction a été effectuée en continu (Soxhlet) avec 2,5 l de solvant pendant 24h. Après l'élimination du solvant sous pression réduite, nous avons obtenu 1,74 g, 4,88 g et 5,49 g de résidus secs correspondant à des rendements de 0,87 %, 2,4 % et 2,7% par rapport au poids de la plante sèche.

Les résultats des études biologiques *ex-vivo* réalisées sur des explants de peau humaine maintenus en survie ont révélé l'activité anti-âge de l'extrait acétonique de *Salvinia*.

Afin de caractériser davantage la composition de la fraction active de *S. nymphellula*, un fractionnement de l'extrait acétonique a été réalisé : 100 mg de l'extrait ont été repris par H₂O (2 x 10 ml) ; la centrifugation de la suspension formée a permis de séparer le surnageant (SN-S, 26,1 mg) du culot (SN-I, 73,9 mg). L'analyse chromatographique de ces deux extraits, par PR-CLHP analytique avec détection à barrette photodiode ultraviolet, a montré que les produits les plus apolaires se trouvaient majoritairement en SN-I tandis que les plus polaires étaient concentrés en SN-S (Figure 1: A et B). Le fractionnement de SN-I a été réalisé sur colonne PR-CLHP semi-préparative (Waters Symmetry 300, C18, 19 x 300 mm, 5 µm). Les solvants d'élution utilisés ont été : A : H₂O + 0,1% ATF; B : CH₃CN + 0,1% ATF. Le système d'élution à 3 ml/min a été le suivant: en isocratique 5% B de 0 à 10 minutes, ensuite en gradient linéaire de 5 à 30% B en 15 minutes, de 30 à 55% B en 15 min et de 55 à 100% en 15 min, puis ces conditions finales d'élution ont été maintenues isocratiquement pendant 20 minutes. Quatre fractions ont été ainsi obtenues : F1 (de 2 à 6 min ; 4,8 mg), F2 (de 6 à 15 min ; 9,5 mg), F3 (de 15 à 35 min ; 2,47 mg) et F4 (de 35 à 70 min ; 27,8mg).

L'évaluation de l'activité anti-âge de ces quatre fractions ainsi que celle de l'extrait SN-S a permis de montrer que l'activité anti-âge se trouvait concentrée dans la fraction F4 de l'extrait SN-I. Le rendement de cette fraction a été de 27,8% de l'extrait acétonique de *S. nymphellula* Desv. (rendement = 0,7% par rapport au poids de la plante sèche). Son profil chromatographique en CLHP est présenté dans la Figure 1C.

Exemple II. Etude biologique *ex vivo* de l'effet d'une préparation contenant de l'extrait acétonique de *Salvinia nymphellula* Desv. sur les structures épidermiques et dermiques d'explants de peau humaine maintenus en survie

5

II.1 Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée sur les explants de peau humaine (diamètre d'environ 10 mm) préparés à partir d'une plastie abdominale d'une femme de 43 ans. Tous les explants ont été maintenus en survie en milieu de culture pendant 10 jours.

L'extrait acétonique de *Salvinia nymphellula* Desv. a été incorporé à 1% dans de l'hydrocérine après dissolution dans du méthanol. Cette préparation a été appliquée sur les explants de peau par voie topique à la dose de 2 mg/explant au J0, J2, J4, J6 et J8. Aux J0, J6 et J9 des explants contrôles et traités ont été prélevés et préparés pour des études histologiques.

Chaque explant a été immédiatement coupé en deux. Une moitié a été fixée dans du Bouin ordinaire pendant 48h et l'autre congelée à - 80°C.

Les explants fixés au Bouin ordinaire ont été déshydratés et imprégnés en paraffine à l'aide d'un automate de déshydratation Leica 1020. Ils ont été mis en bloc à l'aide d'une station d'enrobage Leica EG 1160. Des coupes de 5 µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome type Minot, Leica RM 2125 et collées sur des lames de verre histologiques silanisées Superfrost®.

Les explants congelés ont été coupés à 7 µm dans un cryostat Leica CM 3050. Les coupes ont été collées sur des lames de verre histologique silanisées pour les marquages immunologiques.

Les observations microscopiques ont été réalisées en microscopie optique, à l'aide d'un microscope Leica type DMLB, à l'objectif x40. Les prises de vue ont été réalisées avec une caméra tri CCD Sony DXC 390P et stockées à l'aide du logiciel d'archivage de données Leica IM1000.

Les coupes en paraffine ont été colorées au trichrome de Masson pour l'observation de la morphologie générale et au bleu alcian-P.A.S. (coloration de Mowry) pour la coloration des GAGs.

5 Les coupes congelées réalisées au cryostat (7 μ m) ont été utilisées pour les immunomarquages des composants protéiques de la peau :

- l'immunomarquage de la laminine-5 a été réalisé avec l'anticorps monoclonal anti-laminine-5, clone P3E4 (Santa Cruz ref. 13587) avec un système amplificateur biotine/streptavidine et révélé en FITC. Les noyaux ont été contre colorés à l'iodure de propidium,
- 10 - L'immunomarquage du collagène IV a été réalisé avec l'anticorps polyclonal anti-collagène IV (SBA, ref. 1340-01) avec un système amplificateur biotine/streptavidine et révélé en FITC. Les noyaux ont été contre colorés à l'iodure de propidium.

15 La description de la morphologie générale ainsi que l'évaluation de l'expression du collagène IV, de la laminine 5 et des glycoaminoglycanes (GAG) ont été choisies comme critères de l'activité recherchée de l'extrait acétonique de *Salvinia*.

20 II.2 Résultats

a) Morphologie générale

Les observations réalisées sur l'ensemble d'explants montrent que l'application de l'extrait acétonique de *Salvinia nymphellula* Desv. à la concentration 1% induit à partir du J6 du traitement une stimulation de la structure épidermique qui se traduit par une augmentation du nombre d'assises cellulaires vivantes. En effet, on observe 4 à 5 assises cellulaires dans l'épiderme des explants témoins et 6 à 7 assises cellulaires avec des kératinocytes présentant une bonne morphologie dans l'épiderme des explants traités. Cette augmentation est optimale au J10 de survie : l'épiderme est alors composé de 7 à 8 assises cellulaires avec des kératinocytes présentant une bonne morphologie. Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré. De plus, le derme papillaire des explants traités est bien

cellularisé et riche en fibres de collagène assez épaisses formant un réseau dense surtout le long de la jonction dermo-épidermique (Fig. 2).

b) Expression de la laminine-5

5 Les résultats des études *ex vivo* réalisées sur les explants de la peau humaine montrent que l'extrait acétonique de *Salvinia nymphellula* Desv. stimule la production de la laminine-5 dans la peau traitée. L'immunomarquage de la laminine-5 sur les coupes histologiques des explants traités a révélé une augmentation progressive du taux de cette protéine le long de la jonction dermo-
10 épidermique à partir du J6 du traitement par rapport aux explants témoins. La plus importante augmentation de l'expression de la laminine-5 a été visualisée au J10 de la survie (Fig. 3).

c) Expression du collagène de membrane basale (type IV)

15 L'application de l'extrait acétonique de *Salvinia nymphellula* Desv. sur les explants de peau humaine induit une augmentation significative de la production du collagène IV dans le tissu traité. L'immunomarquage du collagène IV a permis de mettre en évidence une bande de cette protéine nettement plus dense que celle visualisée dans les explants témoins. Une surexpression du collagène IV le long de la
20 jonction dermo-épidermique et dans le derme papillaire a été visualisée dans les explants traités avec l'extrait de *Salvinia* au J6 d'application avec maximum de réponse observé au J10 (Fig. 4).

d) Expression des glycoaminoglycanes (GAGs)

25 Une coloration des coupes histologiques des explants de la peau au bleu alcian P.A.S. a permis de mettre en évidence une augmentation significative des GAGs suite au traitement des explants avec l'extrait acétonique de *Salvinia nymphellula* Desv. Les GAGs neutres sans groupements acides apparaissant sous forme d'une bande festonnée P.A.S. positive (rose/violacée) ont été observés dans
30 les parties hautes du derme papillaire et le long de la jonction dermo-épidermique. L'effet d'application de l'extrait de *Salvinia* bien visible à J6 et à J10 résulte d'une augmentation du nombre de fibroblastes nettement P.A.S. positifs dans le derme

papillaire, surtout dans une bande située le long de la jonction dermo-épidermique et d'une augmentation des GAGs dans ces fibroblastes (Fig. 5).

e) Conclusions

5 L'ensemble de ces observations traduit la restructuration de l'épiderme et du derme sous l'action de l'extrait acétonique de *Salvinia nymphellula* Desv. Ce type de modifications représente les critères d'une peau plus jeune et permet de proposer une préparation cosmétique contenant cet extrait adaptée au traitement du vieillissement cutané.

10

Exemple III. Compositions type

Composition 1 : Emulsion H/E

15	Polyéthylène glycol oxyéthyléné par 50 moles d'oxyde d'éthylène		3 %
	Monodiglycérystéarate		3 %
	Huile de vaseline		3 %
	Alcool cétylique		5 %
	Extrait de <i>Salvinia nymphellula</i> Desv.		1 %
20	Eau	qsp	100 %

Composition 2 :

	Octylpalmitate		10 %
	Glycérylisostéarate		4 %
25	Huile de vaseline		10 %
	Sorbitol		2 %
	Vitamine E		1 %
	Extrait de <i>Salvinia nymphellula</i> Desv.		1 %
	Glycérol		3 %
30	Eau	qsp	100 %

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- 5 ■ MIRALLES J. et al, Etude de la composition en acide gras et en stérols d'une ptéridophyte : *Salvinia nymphellula* Desv., Herba Hungarica, 1989. Tom.28.No.3, p.79-81

REVENDICATIONS

1. Extrait de la plante *Salvinia nymphellula* Desv.
5
2. Extrait selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un extrait organique.
3. Extrait selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un
10 extrait acétonique.
4. Procédé de préparation d'un extrait organique de la plante *Salvinia nymphellula* Desv., comprenant les étapes suivantes :
 - a) le séchage de la plante ;
 - 15 b) le broyage de la plante séchée obtenue à l'étape a) pour obtenir une poudre ;
 - c) au moins une extraction de la poudre obtenue à l'étape b) avec au moins un solvant organique dans des conditions appropriées afin d'obtenir un marc et un extrait ; et
 - 20 d) l'élimination du solvant organique présent dans l'extrait afin d'obtenir l'extrait organique de *Salvinia nymphellula* Desv.
5. Procédé de préparation selon la revendication 4, caractérisé en ce que le solvant organique est choisi parmi les alcools, les esters, le glycérol, les solvants
25 apolaires tel que l'hexane ou l'éther de pétrole, les éthers, les solvants chlorés, les solvants polaires aprotiques tels que les cétones ainsi que les mélanges d'au moins deux de ces solvants miscibles.
6. Procédé de préparation selon la revendication 5, caractérisé en ce que
30 le solvant organique est un solvant polaire aprotique de type cétone, de préférence l'acétone.

7. Procédé de préparation selon l'une des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que l'étape c) comprend au moins deux extractions successives.

8. Procédé de préparation selon la revendication 7, caractérisé en ce que lesdites extractions successives de l'étape c) sont réalisées avec deux solvants organiques différents ou mélanges de solvants organiques différents miscibles.

9. Procédé de préparation selon l'une des revendications 4 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 10 a) le séchage de ladite plante ;
- b) le broyage de la plante séchée obtenue à l'étape a) pour obtenir la poudre ;
- c1) une première extraction de la poudre obtenue à l'étape b) avec de l'éther de pétrole dans des conditions appropriées afin d'obtenir un marc et un premier extrait;
- 15 c2) une deuxième extraction du marc obtenu à l'étape c1) avec de l'acétone dans des conditions appropriées afin d'obtenir un marc et un deuxième extrait ;
- d) l'élimination de l'acétone présente dans le deuxième extrait afin
- 20 d'obtenir l'extrait acétonique de *Salvinia nymhellula* Desv.

10. Procédé de préparation selon l'une des revendications 4 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend en outre, après l'étape d) d'élimination du solvant organique, l'étape suivante :

- 25 e) le fractionnement de l'extrait organique obtenu à l'étape d).

11. Procédé de préparation selon la revendication 10, caractérisé en ce que le fractionnement de l'extrait organique à l'étape e) est effectué par chromatographie, de préférence par chromatographie liquide haute performance en phase inverse, ladite chromatographie étant suivie de l'élimination du solvant d'élution utilisé pour ladite chromatographie.

30

12. Procédé de préparation selon l'une des revendications 4 à 11, caractérisé en ce que son rendement d'extraction est compris entre 0,01 % et 10 % en poids par rapport au poids de la plante sèche, avantageusement entre 0,5 % et 2,8 % en poids par rapport au poids de la plante sèche.

5

13. Extrait organique susceptible d'être obtenu par le procédé de préparation selon l'une des revendications 4 à 12.

14. Composition cosmétique comprenant l'extrait selon l'une des revendications 1 à 3 et 13 et un support cosmétiquement acceptable.

10

15. Composition cosmétique selon la revendication 14, caractérisée en ce que la teneur de l'extrait est comprise entre 0,1 % et 10 % en poids, de préférence 1 % en poids par rapport au poids total de la composition.

15

16. Composition cosmétique selon la revendication 14 ou 15, comprenant en outre au moins un autre principe cosmétiquement actif.

20

17. Utilisation d'un extrait de la plante *Salvinia nymphellula* Desv selon l'une des revendications 1 à 3 et 13 ou d'une préparation de tout ou partie de la plante *Salvinia nymphellula* Desv., pour la restructuration de la peau.

25

18. Utilisation d'un extrait de la plante *Salvinia nymphellula* Desv selon l'une des revendications 1 à 3 et 13 ou d'une préparation de tout ou partie de la plante *Salvinia nymphellula* Desv., pour son activité anti-âge, avantageusement pour son activité anti-rides.

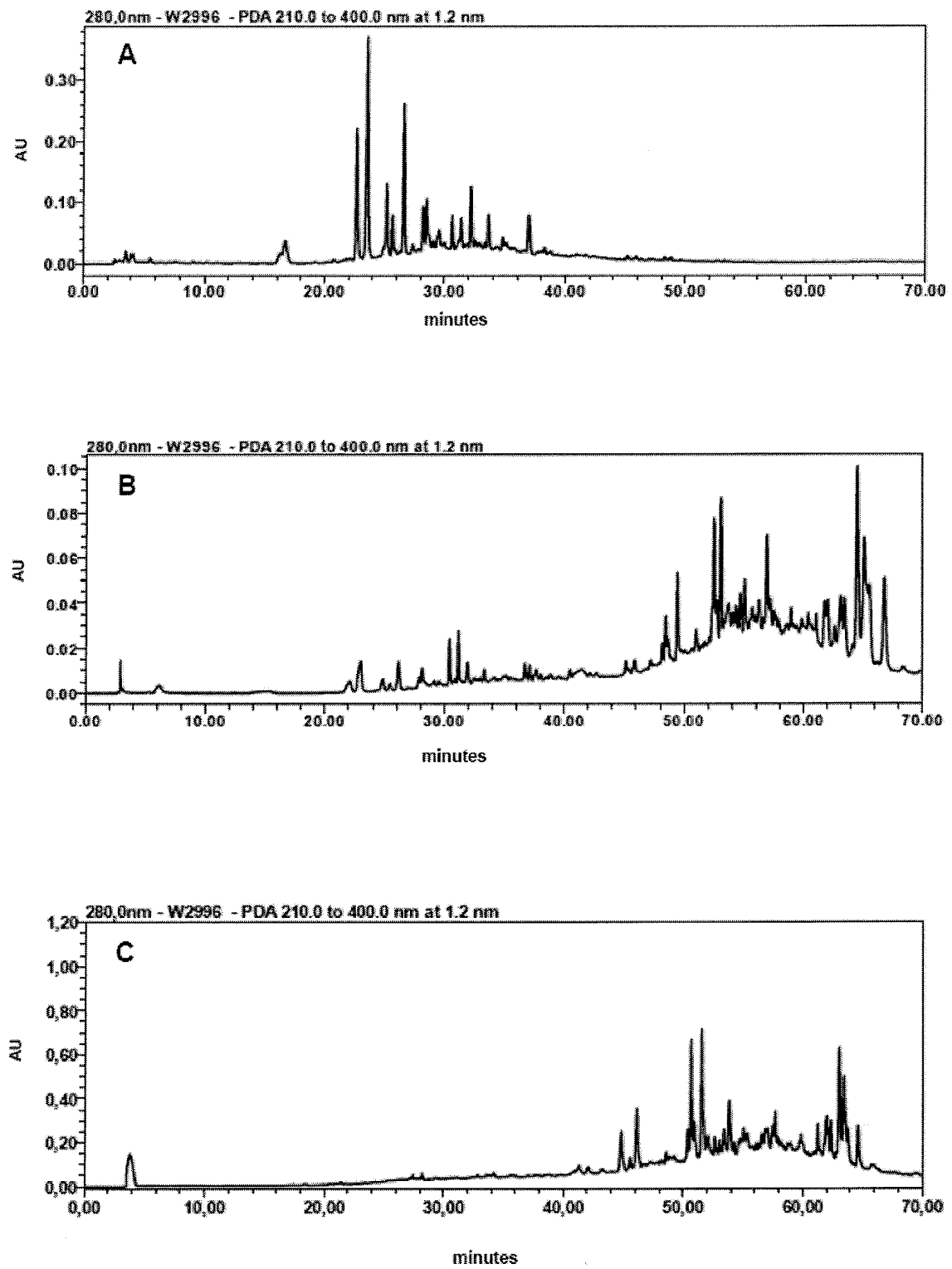


Figure 1

2/6

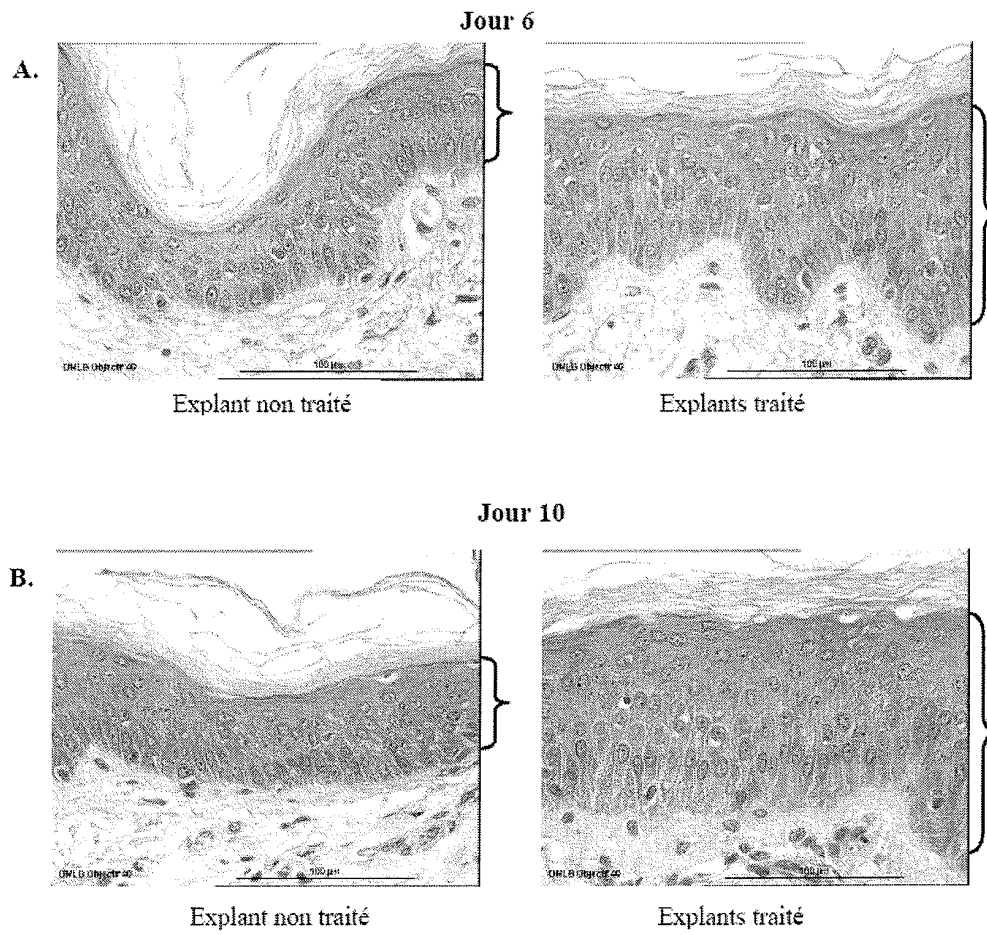


Figure 2

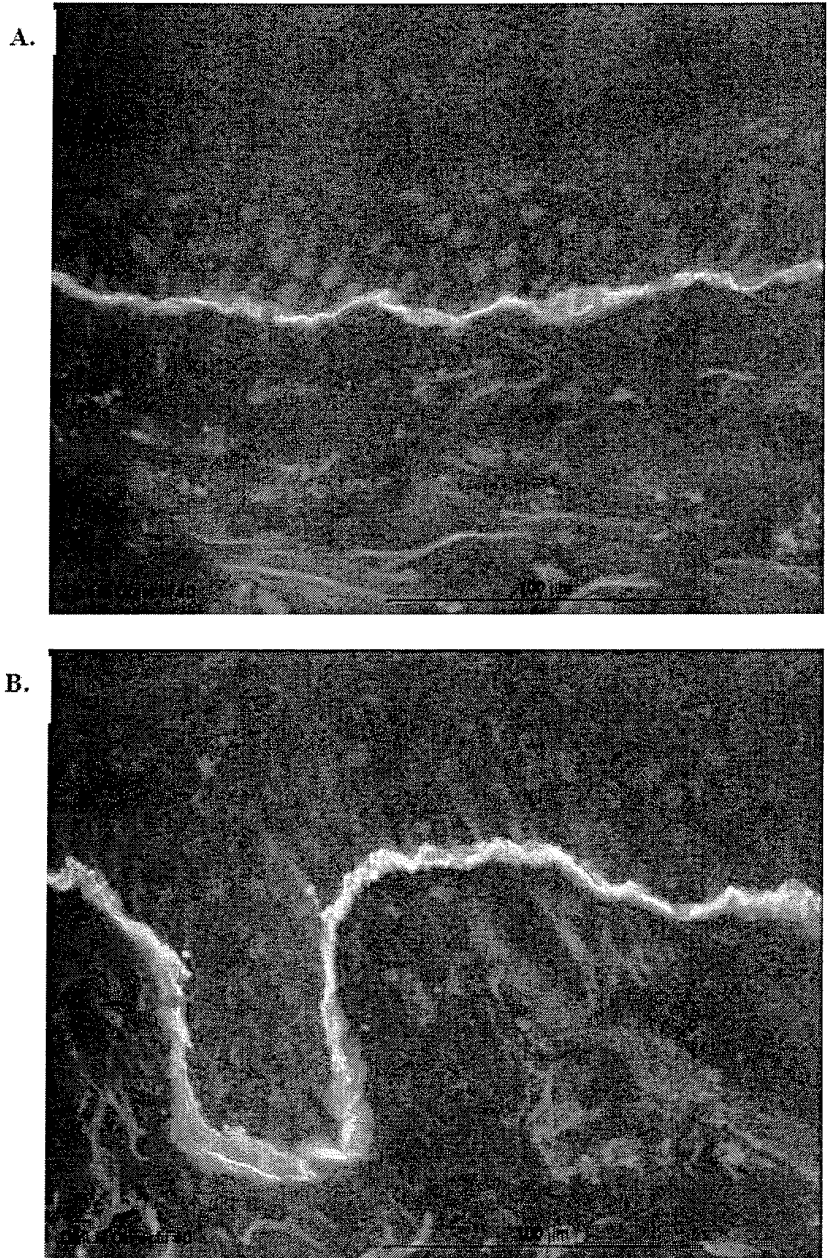


Figure 3

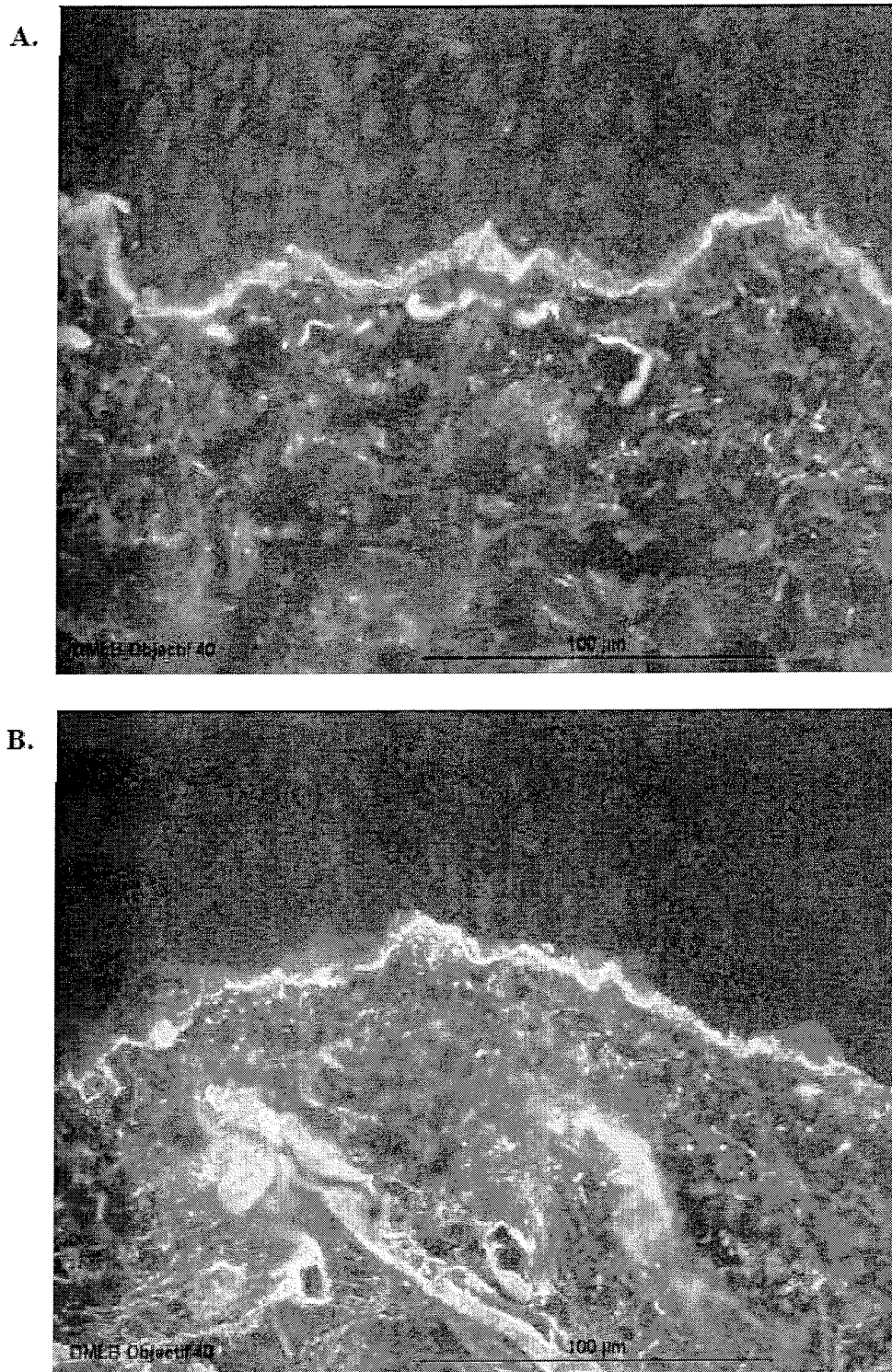
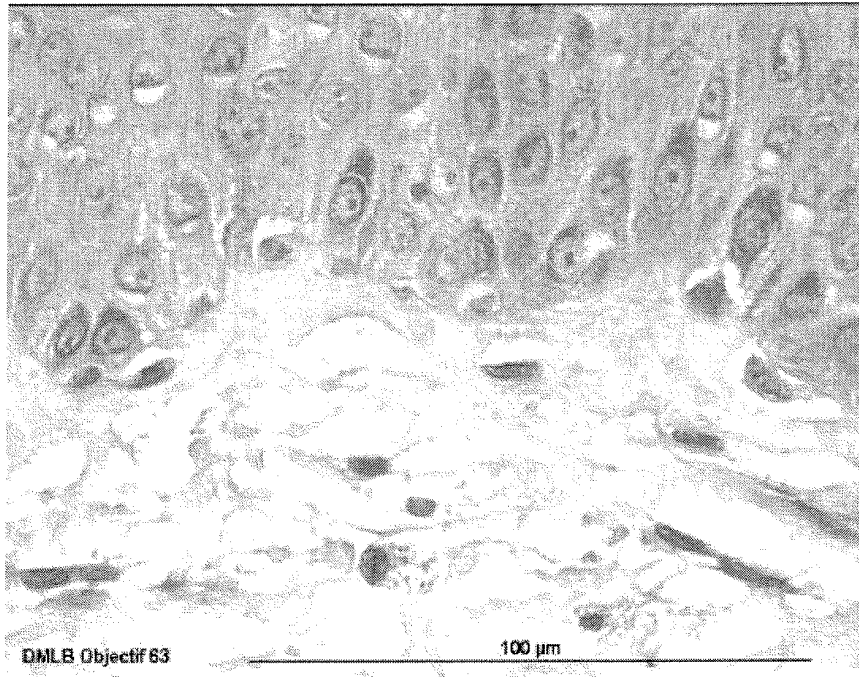


Figure 4

A.



B.

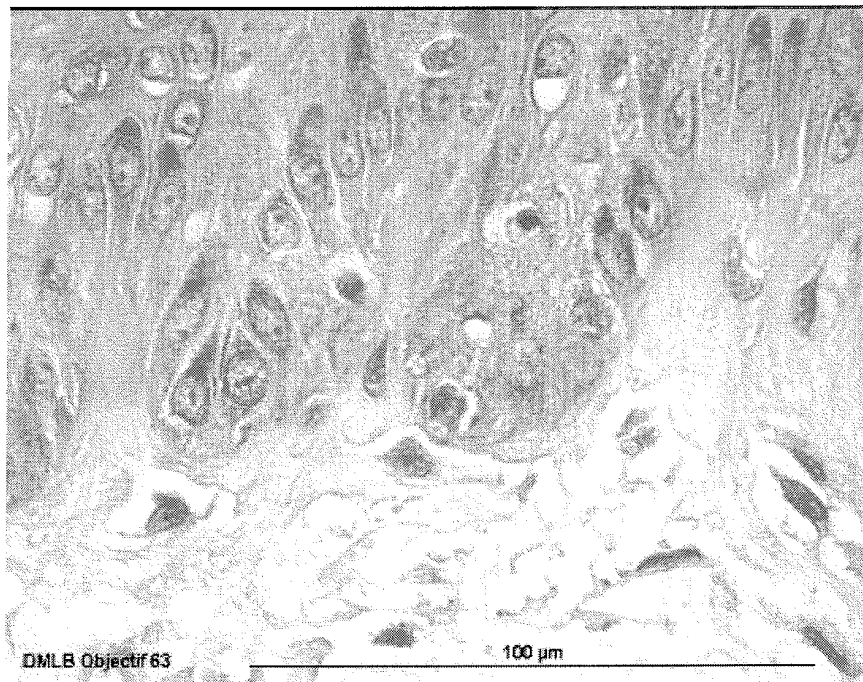


Figure 5

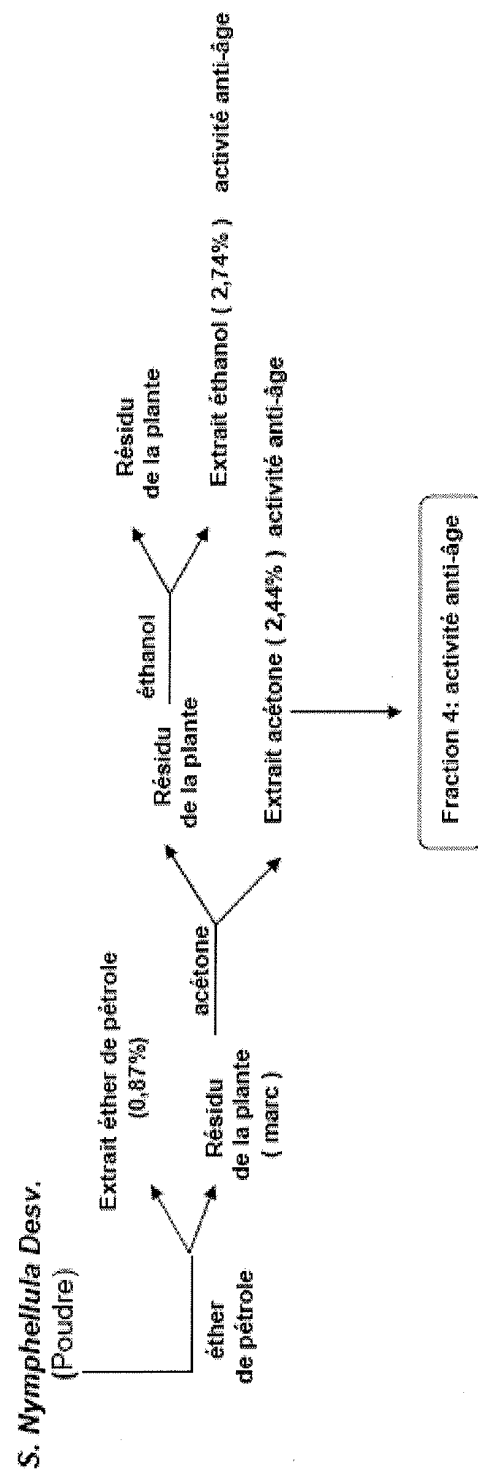


Figure 6



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 724225
FR 0953988

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	JEAN YAОВI HOUNKANLI: "Utilisation d'une fougère d'eau douce (Salvinia nymhellula) en alimentation des volailles" 30 juin 1982 (1982-06-30), FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE DAKAR , DAKAR 16 , XP002567969 * page 30, ligne 5 - ligne 29 * -----	1,2	A61K8/97 A61Q19/08 A61Q19/00
X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989, MIRALLES J ET AL: "STUDY OF THE FATTY ACID AND STEROL COMPOSITION OF A PTERIDOPHYTE SALVINIA-NYMPHELLULA DESV" XP002567970 Database accession no. PREV199089075889 * le document en entier * & HERBA HUNGARICA, vol. 28, no. 3, 1989, pages 79-82, ISSN: 0018-0580 -----	1,2	
A	LETERME P ET AL: "Nutritional value of aquatic ferns (Azolla filiculoides Lam. and Salvinia molesta Mitchell) in pigs" ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY, ELSEVIER, vol. 149, no. 1-2, 2 mars 2009 (2009-03-02), pages 135-148, XP025927974 ISSN: 0377-8401 [extrait le 2008-06-09] * le document en entier * ----- -/--	1-18	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K A61Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
11 février 2010		Diebold, Alain	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		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.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 724225
FR 0953988

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		
A	<p>CHOUDHARY ET AL: "Phenolic and other constituents of fresh water fern <i>Salvinia molesta</i>" PHYTOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 69, no. 4, 4 janvier 2008 (2008-01-04), pages 1018-1023, XP022473186 ISSN: 0031-9422 * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-18	
P,A	<p>ALVES DE OLIVEIRA J ET AL: "Sulphate uptake and metabolism in water hyacinth and <i>salvinia</i> during cadmium stress" AQUATIC BOTANY, ELSEVIER SCIENTIFIC, AMSTREDAM, NL, vol. 91, no. 4, 1 novembre 2009 (2009-11-01), pages 257-261, XP026603213 ISSN: 0304-3770 [extrait le 2009-07-15] * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-18	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		11 février 2010	Diebold, Alain
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		
		& : membre de la même famille, document correspondant	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)