

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ EXTRAIT DE GRAINES DE PASSIFLORE ET COMPOSITIONS COSMETIQUES, PHARMA-
CEUTIQUES OU DERMATOLOGIQUES LE COMPRENANT.

②② Date de dépôt : 21.12.15.

③③ Priorité :

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

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

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 23.06.17 Bulletin 17/25.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 23.08.19 Bulletin 19/34.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑦② Inventeur(s) : *LECLERE-BIENFAIT SOPHIE* et
BREDIF STEPHANIE.

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

⑦④ Mandataire(s) : *REGIMBEAU*.



5 L'invention se rapporte à un extrait de graines de Passiflore, *Passiflora incarnata* ou *edulis* et préférentiellement *edulis*, particulièrement riche en polyphénols et un procédé de préparation d'un tel extrait. La présente invention porte également sur l'utilisation cosmétique, dermatologique ou thérapeutique d'une telle composition ou d'un tel extrait. L'invention concerne enfin un procédé de soin cosmétique de la peau,
 10 des phanères ou des muqueuses, consistant à administrer une telle composition ou un tel extrait.

LES PASSIFLORES

La famille des passiflores (*Passiflora*) est constituée d'environ 500 espèces. Les espèces
 15 sont souvent distribuées dans les régions chaudes tempérées et tropicales et notamment sur le continent américain, mais sont plutôt rares en Asie, Australie et Afrique tropicale.

Botanique

Les plantes se présentent sous forme d'arbrisseaux ou herbes grimpantes. Les feuilles sont alternes, parfois simples, lobées ou palmées. Les fleurs peuvent atteindre 9 cm de diamètre, sont bisexuelles ou unisexuelles et régulières. Elles sont blanches et violettes
 20 et présentent des appendices pétaloïdes fins, garnis d'appendices filiformes symbolisant la couronne d'épines du Christ. Le fruit de 4 à 5 cm de longueur est ovalaire et souvent de couleur jaune à orangée.

Les espèces les plus répandues sont notamment *Passiflora incarnata* (*P. incarnata*) et
 25 *Passiflora edulis* (*P. edulis*).

Eléments de Phytochimie

P. incarnata : les constituants majeurs sont représentés par la famille des flavonoïdes qui sont présentes en grande quantité dans les feuilles. Les feuilles contiennent, en particulier, une forte teneur en isovitexine. Les feuilles de *P. incarnata* contiennent
 30 également en faible quantité des alcaloïdes indoliques simples (harmane, harmine...), des sucres comme le raffinose, le saccharose, fructose, glucose, et des huiles essentielles

et du maltol décrit comme la molécule qui serait à l'origine des effets sédatifs et anti-convulsifiants attribués à cette plante.

P. edulis : à partir d'un extrait méthanolique de feuilles séchées, un composé spécifique a été identifié : la passiflorine - cyclopropane triterpène glycoside (E. Bombardelli et al., 1975).

Les feuilles de *P. edulis* contiennent en particulier de l'isoorientine, un flavonoïde qui n'est pas retrouvé dans l'espèce *P. incarnata*. Elles contiennent également des traces d'huile essentielle et d'alcaloïdes identiques à l'espèce *P. incarnata*.

La pulpe du fruit contient des flavonoïdes, schaftoside, isoschaftoside, isoorientine, orientine, isovitexine, dérivés de lutéoline (M.L. Zeraik, J.H. Yariwake - 2010), de l'acide ascorbique (environ 60 mg/100 g).

La pulpe contient également des dérivés cyanogéniques glycosylés : la prunasine, la sambunigrine et l'amygdaline, ainsi que deux mandelonitrile β -rutinosides récemment identifiés (D. Chassagne and J. Crouzet, 1998 ; D.S. Seigler, 2002).

15 **Toxicologie**

Des constituants cyanogéniques sont présents essentiellement dans les parties aériennes de différentes variétés de passiflore.

Caractéristiques de la graine

Les graines constituent 6 à 12% du fruit de *P. Edulis* et elles contiennent :

- 20 – des polyphénols dont le Piceatannol (structure proche du resveratrol) et son dimère la scirpusine B (S. Sano ; K. Sugiyama ; T. Ito, 2011), substances à effets vasorelaxant et anti-oxydant.
- de l'huile, (rendement de 18% après extraction par solvant) contenant des phytostérols (0.2% dont campestérol, stigmastérol, sitostérol, avenasterol) ; 60 à 25 73% d'acide linoléique (oméga 6), 14% à 20% d'acide oléique et 465 ppm de tocophérols (G. Piobom, N. Barou et al, 2006 ; R. de V.V. Lopes et al.).
- Des sucres et des protéines.

ART ANTERIEUR

30 **Usage Alimentaire**

Le fruit semble être consommé depuis la préhistoire. Au XVIème siècle au Pérou, les magnifiques fleurs de passiflores étaient déjà considérées comme un remède et de

nombreuses espèces de passiflores sont toujours utilisées dans de nombreux pays dans les pratiques thérapeutiques courantes.

Usage Médical

Les passiflores (souvent les parties aériennes et parfois les fruits) sont souvent utilisées partout dans le monde comme anxiolytique, sédatif, diurétique ou analgésique (« Passiflora : review update. K. Dhawan, S. Dhawan, A. Sharma, 2004 »). Le maltol et certains de ses dérivés seraient à l'origine de cet effet sédatif.

Cette activité serait plus constante et plus significative pour l'espèce *P. incarnata*.

Des extraits de *P. incarnata* seraient capables de lutter contre la dépendance à la morphine.

Un effet anti-hypotenseur d'un extrait méthanolique d'écorces de fruits de *P. edulis*, ainsi qu'un effet hypocholestémiant d'un extrait de graines délipidées riches en fibres ont également été mis en évidence.

Un effet anti-tumoral d'une décoction des fruits via l'inhibition de métalloprotéinases matricielles (MMP2 et MMP9) impliquées dans l'invasion tumorale, les métastases et l'angiogénèse, a également été mis en évidence (S.S. Patel, 2009).

Usages Dermo-cosmétiques

Au Brésil, les feuilles de *P. foetida* sont utilisées par voie topique pour traiter les maladies cutanées d'origine inflammatoire, en particulier grâce à la présence de l'isoorientine. A Maurice et Rodrigues, les décoctions de feuilles de *P. suberosa* sont également utilisées en bain pour traiter les maladies de peau.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

La Demanderesse a découvert que les extraits de graines de passiflore, en particulier *Passiflora incarnata* ou *Passiflora edulis*, et avantageusement *Passiflora edulis*, présentent des propriétés cosmétiques, pharmaceutiques et dermatologiques jamais décrites jusqu'à présent. En particulier, c'est la première fois que de tels extraits de graines de passiflore sont utilisés en tant que tels, pour leurs propriétés spécifiques.

L'invention a ainsi pour objet un extrait polyphénolique de graines de Passiflore, en particulier de graines de *Passiflora incarnata* ou de *Passiflora edulis*, plus particulièrement de *Passiflora edulis*, comprenant au moins 30% en poids de polyphénols, exprimés en équivalent d'acide gallique, par rapport au poids de l'extrait

sec. Cette teneur équivaut à au moins 3 mg de polyphénols par millilitre d'extrait liquide.

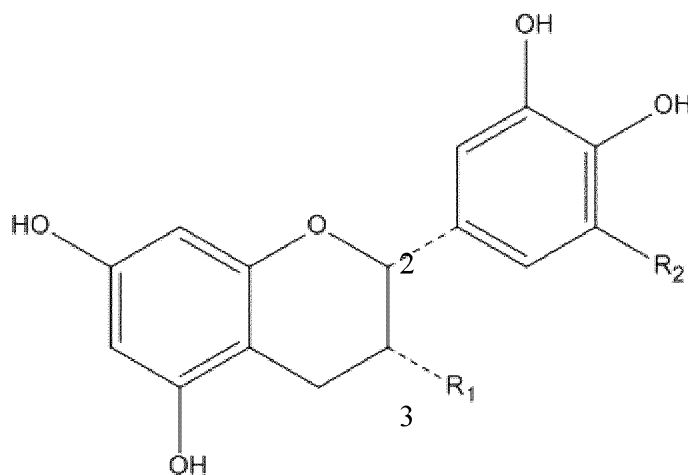
L'extrait selon la présente invention comprend avantageusement au moins 35% en poids de polyphénols, exprimés en équivalent d'acide gallique, par rapport au poids total dudit extrait sec, c'est-à-dire au moins 3,5 mg de polyphénols par millilitre d'extrait liquide.

L'extrait selon la présente invention comprend plus avantageusement au moins 40% en poids de polyphénols, exprimés en équivalent d'acide gallique, par rapport au poids total dudit extrait sec, c'est-à-dire au moins 4 mg de polyphénols par ml d'extrait liquide.

Parmi les polyphénols présents dans l'extrait selon l'invention, on retrouve majoritairement les dérivés catéchiques.

Par « dérivés catéchiques » on entend, au sens de la présente invention, les flavonoïdes de la famille de la catéchine, également connue sous le nom de catéchol.

Les dérivés catéchiques sont plus particulièrement des composés de formule générale (I) suivante :

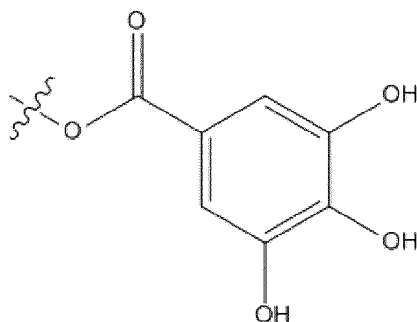


(I)

dans laquelle :

----- représente une liaison simple de configuration R ou S ;

R_1 représente OH ou un groupe galloyl de formule (II) suivante :



(II) ; et

R_2 représente H ou OH.

Les dérivés catéchiques sont plus particulièrement des composés de formule générale (I) choisis dans le groupe constitué de :

Nom	Configuration	R_1	R_2
(+)-catéchine	2R, 3S	OH	H
(-)-épicatéchine	2R, 3R	OH	H
(-)-catéchine	2S, 3R	OH	H
(+)-épicatéchine	2S, 3S	OH	H
(-)-épigallocatechine	2R, 3R	OH	OH
(-)-épicatéchine gallate	2R, 3R	Groupe galloyl	H
(-)-épigallocatechine gallate	2R, 3R	Groupe galloyl	OH
(+)-gallocatechine	2R, 3S	OH	OH
(+)-gallocatechine gallate	2R, 3S	Groupe galloyl	OH

5

L'extrait selon l'invention comprend avantageusement au moins 20 % en poids, en particulier au moins 24 % en poids de dérivés catéchiques, exprimés en équivalent d'acide gallique, par rapport au poids de l'extrait sec. Ainsi, dans l'extrait selon l'invention, au moins 50% en poids, en particulier au moins 60% en poids des polyphénols sont des dérivés catéchiques, exprimés en équivalent d'acide gallique, par rapport au poids de polyphénols dans l'extrait sec.

Avantageusement, l'extrait selon l'invention comprend en outre au moins 10% en poids d'acides organiques, notamment d'acide acétique, d'acide malique, d'acide citrique ou leurs mélanges, par rapport au poids de l'extrait sec.

15

L'extrait selon l'invention est avantageusement obtenu par extraction solide/liquide des graines de Passiflore dans un solvant choisi parmi l'eau, les glycérols, les glycols, et leurs mélanges.

Le solvant est plus particulièrement choisi parmi les mélanges binaires eau/glycérol, eau/glycol, et leurs mélanges, avantageusement dans une proportion comprise entre 30 et 90% de glycérol et/ou de glycol dans l'eau.

De préférence le solvant utilisé est choisi parmi les mélanges binaires eau/glycérol ou eau/propanediol, en particulier eau/propanediol, plus particulièrement eau/1,3-propanediol.

En particulier, l'extrait selon l'invention contient avantageusement en poids par rapport à l'extrait sec obtenu :

- Environ 40 % de polyphénols ;
- Environ 10 % de sucres ;
- Environ 11 % d'acides de fruits ; et
- Environ 5 % de protéines.

De manière particulière, l'extrait selon l'invention ne comprend pas d'isoorientine, orientine, vitexine ou encore d'isovitexine.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un extrait polyphénoliques de passiflore en particulier de graines de *Passiflora incarnata* ou de *Passiflora edulis*, avantageusement de *Passiflora edulis*, comprenant au moins 30% en poids de polyphénols, exprimés en équivalent d'acide gallique, par rapport au poids de l'extrait sec, ledit procédé comprenant au moins une étape d'extraction solide/liquide dans un solvant choisi parmi l'eau, les glycérols, les glycols, et leurs mélanges.

Avantageusement, ledit procédé de préparation d'un extrait polyphénolique de graines de passiflore selon l'invention comprend les étapes successives suivantes :

- a) broyage des graines ;
- b) éventuellement délipidation des graines, de préférence par pressage, extraction éthanolique ou extraction CO₂ ;
- c) extraction solide/liquide des graines broyées et éventuellement délipidées dans un solvant choisi parmi l'eau, les glycérols, les glycols, et leurs mélanges ;

- d) séparation de la phase solide et de la phase liquide par décantation, et/ou centrifugation et/ou filtrations successives ;
- e) éventuellement séchage de l'extrait obtenu à l'étape d).

5 L'étape a) de broyage des graines peut être réalisée par des méthodes connues de l'homme du métier, notamment à l'aide d'un broyeur à couteaux, d'un broyeur à marteaux, etc.

A l'étape c), la phase d'extraction solide/liquide est réalisée de préférence à une température comprise entre 20°C et 90°C, en particulier entre 30°C et 80 °C, plus
10 particulièrement entre 45 °C et 75°C, typiquement 70°C.

La durée d'extraction est avantageusement comprise entre 30 minutes et 4h, en particulier entre 1h et 3h, avantageusement elle est d'environ 2 heures.

Avantageusement, le solvant d'extraction utilisé à l'étape c) est choisi parmi les mélanges binaires eau/glycérol, eau/glycol, et leurs mélanges, avantageusement dans
15 une proportion comprise entre 30 et 90% de glycérol et/ou de glycol dans l'eau. En particulier, le solvant d'extraction est choisi parmi les mélanges binaires eau/glycérol ou eau/propanediol, en particulier eau/propanediol, plus particulièrement eau/1,3-propanediol.

Dans une variante avantageuse du procédé, préalablement à l'étape c), les
20 graines de passiflore sont délipidées. Avant d'être dispersées, les graines broyées peuvent être délipidées, notamment dans de l'éthanol. L'élimination des lipides permet une meilleure efficacité des étapes d'extraction et de filtrations. Il est également et préférentiellement possible d'utiliser des tourteaux de ces graines, c'est-à-dire le résidu issu de l'extraction préalable de l'huile par solvant, technique de CO₂ supercritique par
25 exemple et préférentiellement par pressage mécanique.

L'étape d) de séparation de la phase solide et de la phase liquide est réalisée par des méthodes connues de l'homme du métier, notamment par décantation, centrifugation et/ou filtrations successives jusqu'à parfaite limpidité et propreté microbiologique.

30 Avantageusement, l'extrait polyphénolique selon l'invention peut être stabilisé par l'étape de séchage e), par des procédés connus de l'homme de l'art.

L'étape de séchage peut, par exemple, être réalisée en présence d'un support de type, par exemple, maltodextrines ou fibres d'acacia (Fibregum® société CNI). La teneur en support varie typiquement selon un ratio allant de 0% à 80% de support par rapport au pourcentage de matière sèche obtenu dans la forme liquide de l'extrait.

5 L'extrait est préférentiellement séché par lyophilisation afin d'obtenir une poudre finale. La poudre finale comprend avantageusement 30 à 70% en poids de matière sèche de l'extrait, le complément à 100% étant le support de lyophilisation. Plus avantageusement la poudre finale comprend 50% de matière sèche issue de l'extrait et 50% de support de lyophilisation.

10 Alternativement, la matière première de départ du procédé selon l'invention peut être un tourteau de graines de passiflore délipidées, notamment par pressage. Dans ce cadre et à titre d'exemple non limitatif, l'extrait polyphénolique selon l'invention peut être obtenu selon le procédé suivant :

- a') mise en solution de tourteau de graines de passiflore délipidées par pressage, à 15 10% de matière sèche dans l'eau ;
- b') extraction solide/liquide sous agitation pendant 2 heures à une température de 70°C ;
- c') purification par étapes de filtrations successives ; et
- d') filtration stérile.

20

L'extrait obtenu par le procédé selon l'invention, tel que décrit dans les paragraphes précédents, comprend avantageusement au moins 35% en poids, plus avantageusement au moins 40% en poids, de polyphénols, exprimés en équivalent d'acide gallique, par rapport au poids de l'extrait sec.

25 Avantageusement, l'extrait obtenu par le procédé selon l'invention comprend au moins 20 % en poids, en particulier au moins 24 % en poids de dérivés catéchiques, exprimés en équivalent d'acide gallique, par rapport au poids de l'extrait sec. Ainsi, dans l'extrait obtenu par le procédé selon l'invention, au moins 50% en poids, en particulier au moins 60% en poids des polyphénols sont des dérivés catéchiques
30 exprimés en équivalent d'acide gallique, par rapport au poids de polyphénols dans l'extrait sec.

Avantageusement, l'extrait obtenu par le procédé selon l'invention comprend au moins 10% en poids d'acides organiques, notamment d'acide acétique, d'acide malique, d'acide citrique ou leurs mélanges, par rapport au poids de l'extrait sec.

La présente invention a donc également pour objet un extrait de graines de
 5 passiflore en particulier de graines de *Passiflora incarnata* ou de *Passiflora edulis*,
 avantageusement de *Passiflora edulis*, susceptible d'être obtenu par le procédé
 mentionné ci-dessus. Un tel extrait répond aux spécifications définies précédemment
 concernant l'extrait selon l'invention.

10 Dans la suite de la description, on parlera d'« extrait selon l'invention » pour
 désigner l'extrait en tant que tel, tel que défini ci-dessus, ou l'extrait susceptible d'être
 obtenu par le procédé selon l'invention tel que décrit ci-dessus.

L'invention a en outre pour objet une composition comprenant un extrait riche
 en polyphénols de graines de passiflore selon l'invention, en tant que principe actif, et le
 15 cas échéant un excipient approprié. L'extrait selon l'invention est tel que défini dans les
 paragraphes ci-dessus concernant l'extrait en tant que tel et ceux concernant l'extrait
 susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention.

La composition selon l'invention comprend avantageusement de 0,001 à 10% en
 poids, avantageusement de 0,01 à 5% en poids, dudit extrait polyphénolique de graines
 20 de Passiflore selon l'invention, le poids de l'extrait étant exprimé en extrait sec, par
 rapport au poids total de la composition.

La composition est avantageusement cosmétique, pharmaceutique ou
 dermatologique. Ladite composition est de préférence formulée pour être administrée
 par voie topique externe.

25 La composition selon l'invention peut comprendre en outre un ou plusieurs
 autres principes actifs.

La composition selon l'invention peut être formulée sous la forme de différentes
 préparations adaptées à une administration topique.

En particulier, les compositions topiques peuvent être notamment les crèmes, les
 30 émulsions, les laits, les pommades, les lotions, les huiles, les solutions aqueuses ou
 hydro-alcooliques ou glycoliques, les poudres, les patchs, les sprays, les shampooings,
 les vernis ou tout autre produit pour application externe.

Selon sa nature (cosmétique, dermatologique ou pharmaceutique), la composition selon l'invention peut en outre comprendre au moins un excipient cosmétiquement, pharmaceutiquement ou dermatologiquement acceptable. Notamment, la composition selon la présente invention peut en outre comprendre au moins un
 5 adjuvant cosmétiquement, pharmaceutiquement ou dermatologiquement connu de l'homme du métier, choisi parmi les tensioactifs, les épaississants, les conservateurs, les parfums, les colorants, des filtres chimiques ou minéraux, les agents hydratants, les eaux thermales, etc. L'homme du métier sait adapter la formulation de la composition selon l'invention en utilisant ses connaissances générales.

10 Les modes d'administration, les posologies et les formes galéniques optimales des compositions selon l'invention peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement pharmaceutique, dermatologique ou cosmétique adapté à un patient ou à un animal, comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient ou de l'animal, la gravité de son état général, la
 15 tolérance au traitement, les effets secondaires constatés, le type de peau.

L'invention a également pour objet un extrait selon l'invention ou une composition selon l'invention pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter des troubles ou pathologies de la peau et/ou des muqueuses et/ou des phanères, avant
 20 avantageusement des réactions inflammatoires, des réactions d'oxydation, des désordres liés à des attaques radicalaires liées ou non à la pollution, des troubles de la barrière ou de l'homéostasie, du vieillissement, notamment du vieillissement chronologique et/ou actinique, de la peau et/ou des muqueuses et/ou des phanères.

L'invention a également pour objet un extrait selon l'invention ou une
 25 composition selon l'invention pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter des troubles vasculaires et/ou des altérations du tissu adipeux.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un extrait de graines de passiflores selon l'invention ou d'une composition selon l'invention, pour la fabrication d'une composition cosmétique, pharmaceutique ou dermatologique pour prévenir et/ou
 30 traiter des troubles ou pathologies de la peau et/ou des muqueuses et/ou des phanères, avant avantageusement des réactions inflammatoires, des réactions d'oxydation, des désordres liés à des attaques radicalaires liées ou non à la pollution, des troubles de la barrière ou

de l'homéostasie, du vieillissement, notamment du vieillissement chronologique et/ou actinique, de la peau et/ou des muqueuses et/ou des phanères.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un extrait de graines de passiflores selon l'invention ou d'une composition selon l'invention, pour la fabrication
5 d'une composition cosmétique, pharmaceutique ou dermatologique pour prévenir et/ou traiter des troubles vasculaires et/ou des altérations du tissu adipeux.

L'invention a en outre pour objet une méthode pour prévenir et/ou traiter des troubles ou pathologies de la peau et/ou des muqueuses et/ou des phanères, avantageusement des réactions inflammatoires, des réactions d'oxydation, des désordres
10 liés à des attaques radicalaires liées ou non à la pollution, des troubles de la barrière ou de l'homéostasie, du vieillissement, notamment du vieillissement chronologique et/ou actinique, de la peau et/ou des muqueuses et/ou des phanères, comprenant l'administration, notamment l'administration topique, d'une quantité efficace d'un extrait de graines de passiflores selon l'invention ou d'une composition selon
15 l'invention, à un sujet en ayant besoin.

L'invention a en outre pour objet une méthode pour prévenir et/ou traiter des troubles vasculaires et/ou des altérations du tissu adipeux, comprenant l'administration, notamment l'administration topique, d'une quantité efficace d'un extrait de graines de passiflores selon l'invention ou d'une composition selon l'invention, à un sujet en ayant
20 besoin.

En particulier, la composition ou l'extrait selon l'invention est destiné(e) à la prévention et/ou au traitement des réactions inflammatoires, des réactions d'oxydation, des désordres liés à des attaques radicalaires liées au stress environnemental, tel que la pollution, les UV, la cigarette, etc., des troubles de la barrière ou de l'homéostasie, du
25 vieillissement, notamment du vieillissement chronologique et/ou actinique, de la peau, des phanères (cheveux et ongles) et/ou des muqueuses (gencives, parodontes, muqueuses génitales) immature(s), normale(s) ou mature(s)/âgée(s).

Notamment, la composition ou l'extrait selon l'invention est destiné(e) à la prévention et/ou au traitement des troubles liés à des réactions inflammatoires et/ou
30 radicalaires provoqués par des expositions UV, et/ou à des polluants ou des réactions intrinsèques, et engendrant ainsi un vieillissement accéléré, des troubles de la barrière, des troubles vasculaires, des rougeurs, etc.

Notamment, la composition ou l'extrait selon l'invention est destiné(e) à lutter contre le vieillissement de la peau, notamment contre le vieillissement chronologique et/ou actinique.

Les troubles ou pathologies de la peau cité(e)s ci-dessus sont plus particulièrement des troubles vasculaires, la dermatite atopique, l'eczéma, la dermatite irritative, la peau sensible, la peau réactive, la peau avec rougeur, l'érythème cutané, la peau âgée ou photoâgée, la peau photosensibilisée, les coups de soleil et les inflammations dues aux rayons de toutes sortes.

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

L'invention concerne un procédé de soin cosmétique de la peau, en vue d'en prévenir le vieillissement, consistant à appliquer sur la peau une composition ou un extrait selon la présente invention.

Les exemples qui suivent permettent d'illustrer l'invention.

20 DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1 représente le pourcentage d'activation du NrF2 par un extrait selon l'invention.

La Figure 2 représente l'Immunomarquage de la Claudine 4 dans des explants de peau traités par le BaP (Protocole 1)

25 La Figure 3 représente l'Immunomarquage de la filaggrine dans des explants de peau traités par le BaP+Nicotine (Protocole 2)

La Figure 4 représente l'Immunomarquage de la loricrine dans des explants de peau traités par le BaP+Nicotine (Protocole 2)

30 La Figure 5 représente l'Immunomarquage du Collagène I dans des explants de peau traités par le BaP+Nicotine (Protocole 2)

La Figure 6 représente l'Immunomarquage de l'Elastine dans des explants de peau traités par le BaP (Protocole 1)

La Figure 7 représente l'Immunomarquage de la fibronectine dans des explants de peau traités par le BaP (Protocole 1)

La Figure 8 représente l'aspect visuel de comète après électrophorèse de kératinocytes humains normaux traités. La Figure 8A correspond à un échantillon de contrôle négatif, la Figure 8B à un échantillon de contrôle UV et la Figure 8C à un extrait selon l'invention à 0.001 %.

EXEMPLE

Exemple 1 : extrait selon l'invention

- 10 Un extrait polyphénolique est obtenu selon le procédé suivant :
- a) mise en solution de tourteau de graines de *Passiflore edulis* délipidées par pressage et broyées, à 10% de matière sèche dans un mélange 1, 3-propanediol / eau 70/30 p/p ;
 - b) extraction sous agitation 2h à 70°C ;
 - 15 c) élimination de la plante résiduelle par filtration grossière ; et
 - d) purification de l'extrait obtenu par filtrations dont une filtration stérile supplémentaire.

L'extrait polyphénolique liquide ainsi obtenu présente les caractéristiques suivantes (% sur Extrait Sec):

- 20
- Extrait sec (étuve): 0,9% (m/m)
 - Teneur en polyphénols totaux (par spectrophotométrie – en équivalent acide gallique) : 43%
 - Teneur en dérivés catéchiques (par HPLC – en équivalent acide gallique) : 22,3
 - 25 %
 - Teneur en acide malique (par kit enzymatique) : 5,4%
 - Teneur en acide citrique (par kit enzymatique): 3,7%
 - Teneur en Protéines (par Kjeldahl x 6.25) : 4,5%

Exemple 2 : extrait selon l'invention

Un extrait polyphénolique est obtenu selon le procédé suivant :

- a) mise en solution de 13.3% graines de *Passiflore edulis* non délipidées et broyées dans un mélange 1, 3 – propanediol / Eau 70/30
- b) extraction sous agitation 2h à 70°C
- c) élimination de la plante résiduelle par filtration grossière
- 5 d) purification de l'extrait obtenu par filtrations, dont une filtration stérile supplémentaire.

L'extrait polyphénolique liquide ainsi obtenu présente les caractéristiques suivantes (% sur Extrait Sec) :

- 10 • Extrait sec (étuve) : 1.07 % (m/m)
- Teneur en polyphénols totaux (par spectrophotométrie – équivalent acide gallique) : 40%
- Teneur en Protéines (Kjeldahl x 6.25) : 5,7%

15 **Exemple 2 : Activité biologique de l'extrait selon l'invention**

1. Potentiel biologique

Le potentiel Biologique d'un extrait selon l'invention a été recherché grâce à un test de modulation de l'expression génique sur des Fibroblastes Humains Normaux (FHN) et sur des épidermes humains reconstruits et mélanisés.

Ainsi, l'expression de 46 gènes impliqués dans divers voies physiologiques de l'Epiderme (Barrière, pigmentation, inflammation...) et du Derme (Cicatrisation, élasticité, fermeté...) a été étudiée par PCR-array.

25 **Matériel et méthodes :**

Des fibroblastes humains normaux (FHN) et des épidermes reconstruits mélanisés ont été incubés pendant 24h en présence d'un extrait selon l'invention, tel qu'obtenu dans l'exemple 1, à 0,002% et 0,05% (p/v) pour les FHN ou à 0,002% et 0,005% (p/v) pour les épidermes reconstruits, et en présence de TGF-β1 à 20ng/ml sur les FHN ou en présence de Vitamine D3 à 1nM sur les épidermes reconstruits (contrôles de validation des essais).

Au terme du traitement, les ARN ont été extraits et les expressions géniques ont été analysées par qRT-PCR à l'aide de carte TaqMan ciblant les fonctions clés du derme et de l'épiderme.

Résultats et conclusion:

- 5 Les résultats sont présentés dans les tableaux 2 et 3 ci-dessous et montrent notamment que l'extrait selon l'invention, en faisant varier l'expression génique de certains marqueurs, a un intérêt particulier dans les activités suivantes :
- l'homéostasie et la structure de la matrice extracellulaire dermique (↘ MMP3) ; et
 - 10 - la Jonction Dermo-Epidermique (↗ LAMC2).
- Plus particulièrement, les polyphénols de l'extrait selon l'invention ont permis de moduler l'expression génique de gènes impliqués dans les défenses anti-oxydantes et le phénomène de l'Hormesis (↗ HMOX1, FTL et G6PD).
- 15 Cela démontre que l'extrait selon l'invention a une activité antioxydante, anti-radicalaire et anti-âge.

Tableau 2 - Screening sur FHN

	Extrait selon l'invention à 0,002%		Extrait selon l'invention à 0,05%	
	QR*	p-value	QR*	p-value
Heme oxygenase (HMOX1)	-	-	4,0641	0,0025
Ferritin, Light polypeptide (FTL)	-	-	2,3263	0,0221
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)	-	-	1,7197	0,0218
Matrix metalloproteinase 1 (MMP1)	-	-	0,6052	0,0282
Matrix metalloproteinase 3 (MMP3)	0,5513	0,0173	-	-

- 20 * Niveau d'expression génique exprimé en quantité relative (QR) par rapport au contrôle non traité =1

Tableau 3 - Screening sur Epidermes reconstruits

	Extrait selon l'invention à 0,002%		Extrait selon l'invention à 0,05%	
	QR*	p-value	QR*	p-value
Laminin subunit gamma-2 (LAMC2)	2,2309	0,0387	4,1885	0,0165
Proopiomelanocortin (POMC)	2,3447	0,0398	1,7019	0,0183
Melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R)	0,7109	0,0175	0,6188	0,0127
Cytosolic phospholipase A2 (PLA2G4A)	0,6829	0,0391	-	-
L-dopachrome tautomerase (DCT)	-	-	0,4637	0,0296

* Niveau d'expression génique exprimé en quantité relative (QR) par rapport au contrôle non traité =1

5

2. Activité inductrice de l'Hormesis et de la détoxification cellulaire

- Une molécule Hormétique (ou Hormétine) est une substance ayant un effet biphasique, qui à faible dose va avoir un effet bénéfique mais qui à forte dose aura l'effet inverse (Ex : Prooxydant ou Antioxydant). Une Hormétine est également décrite comme étant
- 10 une molécule reproduisant les effets d'un léger stress sur l'organisme mais qui en retour va permettre à la cellule de se protéger de futures agressions et ainsi protéger l'organisme de diverses maladies (cancers) ou phénomènes physiques liés à l'âge (vieillesse cutanée, mauvaise cicatrisation...) ou encore des effets nocifs de l'environnement (UV, pollution...).
- 15 Les analyses suivantes permettent d'étudier l'activité inductrice de l'Hormesis et de la détoxification cellulaire d'un extrait selon l'invention.

A- *Activation de la translocation du facteur de transcription Nrf2 :*

- L'effet de l'extrait selon l'invention a été évalué vis-à-vis de l'activation de la
- 20 translocation du Nrf2, précurseur de la cascade responsable de la réponse hormétique et de certaines voies de détoxification de l'organisme.

Matériel et méthodes

- Des kératinocytes HaCaT transfectés ARE-Luciférase, contenant le plasmide Nqo1
- 25 Antioxydant Response Element (ARE) qui est un plasmide spécifique de l'activation du Nrf2 et la luciférase (gène rapporteur), ont été traités pendant 6h à 37°C par un extrait

selon l'invention, tel qu'obtenu dans l'exemple 1, à des concentrations allant de 0,01% à 0,0005% (p/v) et par une référence positive le Ter-buthylhydroquinone à 20µM.

A la fin du traitement les tapis cellulaires sont lysés, l'activité de la luciférase est dosée grâce à un « Luciferase Assay Kit » de chez PROMEGA et la teneur en protéines de chaque lysat est dosée par la méthode de Bradford (BioRad).

Résultats et conclusion

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4 et à la Figure 1. Ces résultats montrent que l'extrait selon l'invention a induit une augmentation de l'activité du Nrf2 dans les noyaux et donc une translocation de celui-ci à travers la membrane nucléaire montrant une activation de ce facteur de transcription.

Cela démontre que l'extrait selon l'invention a une activité antioxydante, anti-radicalaire et anti-âge.

Tableau 4 - Activité Nrf2 dans des HaCaT ARE-Luciférase
(RLU = Relative Luciferase Activity)

	Activité NRF2 (moyenne normalisée RLU/µg de protéines)	Activation (%)	
Control	0	0	
Tert-butylhydroquinone 20µM	23216,4	100	***
Extrait selon l'invention à 0,0005%	4149,6	18	*
Extrait selon l'invention à 0,001%	8178,2	35	***
Extrait selon l'invention à 0,005%	9998,6	43	***
Extrait selon l'invention à 0,01%	6324,6	27	***

* $0,01 < p < 0,05$; ** $0,001 < p < 0,01$; *** $p < 0,001$ et ns = non significatif vs cellules contrôles ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett

B- Expression génique des marqueurs principaux de l'Hormesis et de la détoxification cellulaire.

L'effet d'un extrait selon l'invention a été étudié sur l'expression génique de différents marqueurs impliqués dans les voies de l'Hormesis et dans la détoxification cellulaire.

5

Matériel et méthodes :

Des Fibroblastes humains normaux, ont été traités pendant 6h, 24h et 48 heures à 37°C par un extrait selon l'invention, tel qu'obtenu dans l'exemple 1, à 0,005% et 0,002% (p/v).

10 A la fin du traitement, l'expression génique des marqueurs de l'Hormesis (HMOX1, FTL, G6PD et Nrf2) ainsi que des marqueurs impliqués dans la détoxification cellulaire (la SOD1 et la Catalase) a été analysée par RT-PCR quantitative en temps réel et normalisée vis-à-vis du gène de ménage HPRT (technologie SybrGreen).

15 Les résultats ont été analysés statistiquement par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett (Logiciel GraphPad Prism version 5.02, GraphPad Software, San Diego California USA).

Résultats :

20 Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5. Ces résultats montrent que l'extrait selon l'invention a significativement stimulé l'expression génique de la HMOX1 en 6h et 24h, de FTL aux trois temps, de la G6PD en 6h et 24h, de la SOD1 en 24h, du Nrf2 en 24h et 48h ainsi que la Catalase en 24h.

Cela démontre que l'extrait selon l'invention a une activité antioxydante, anti-

25 radicalaire et anti-âge.

Tableau 5 - Expression génique des marqueurs de l'Hormesis dans des fibroblastes humains normaux (Quantité Relative)

6h	HMOX1	FTL	G6PD	SOD1	Nrf2	Catalase
Cellules contrôles	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Extrait selon l'invention à 0,002%	3,38 (+238% ***)	0,94 (-6% ns)	1.31 (+31% *)	1.03 (+3% ns)	1.00 (+0% ns)	0.97 (-3% ns)
Extrait selon l'invention à 0,005%	23.06 (+2206% ***)	1.37 (+37% ***)	1.31 (+31% *)	1.05 (+5% ns)	1.04 (+4% ns)	1.02 (+2% ns)

24h	HMOX1	FTL	G6PD	SOD1	Nrf2	Catalase
Cellules contrôles	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Extrait selon l'invention à 0,002%	1.66 (+66% ***)	1.62 (+62% **)	1.41 (+41% ns)	1.13 (+13% ns)	1.25 (+25% *)	1.23 (+23% ns)
Extrait selon l'invention à 0,005%	2.68 (+168% ***)	2.40 (+140% ***)	1.70 (+70% **)	1.33 (+33% *)	1.30 (+30% *)	1.31 (+31% *)

48h	HMOX1	FTL	G6PD	SOD1	Nrf2	Catalase
Cellules contrôles	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Extrait selon l'invention à 0,002%	0.98 (-2% ns)	1.10 (+10% ns)	0.88 (-12% ns)	1.39 (+39% ns)	1.34 (+34%*)	1.06 (+6% ns)
Extrait selon l'invention à 0,005%	1.00 (0% ns)	1.66 (+66% ***)	0.86 (-14% ns)	0.97 (-3% ns)	1.26 (+26% ns)	1.04 (+4% ns)

* $0,01 < p < 0,05$; ** $0,001 < p < 0,01$; *** $p < 0,001$ et ns = non significatif vs cellules contrôles ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett

5 C- Production de la Heme Oxygenase :

Un extrait selon l'invention a été analysé sur l'expression protéique de la Heme Oxygénase.

Matériel et méthodes :

- 10 Des fibroblastes humains normaux, ont été traités pendant 24h, par un extrait selon l'invention, tel qu'obtenu dans l'exemple 1, à 0,002% et 0,005% (p/v) et par le Curcumin à 5 et 10 μ M (Hormétine de référence).

- 15 A la fin du traitement la Hème Oxygénase 1 (ou HMOX1 ou HO1) intracellulaire a été quantifiée par une technique ELISA. La coloration, proportionnelle à la quantité du marqueur étudié, a été mesurée par lecture de la densité optique (DO) à 450nm et la valeur obtenue a été ramenée à la quantité de cellules obtenue par un dosage des protéines par la technique du BC Assay (Interchim).

- 20 Les résultats ont été analysés statistiquement par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett (Logiciel GraphPad Prism version 5.02, GraphPad Software, San Diego California USA).

Résultats :

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6. Ces résultats montrent que l'extrait selon l'invention a une induction de même intensité que le Curcumin sur la production de la Heme Oxygénase 1. Ce résultat confirme l'action de l'extrait selon l'invention que nous avons observée lors de l'étude de l'expression génique de ce même marqueur.

Cela démontre que l'extrait selon l'invention a une activité antioxydante, anti-radicalaire et anti-âge.

Tableau 6 - Production d'HMOX1 par des fibroblastes

	HMOX1 (ng/ml sur quantité de cellules)	Inhibition
Cellules contrôles	0.033 ± 0.003	
Curcumin à 5µM	0.060 ± 0.002	82% ***
Curcumin à 10µM	0.105 ± 0.006	218% ***
Extrait selon l'invention à 0,002%	0.056 ± 0.002	69% ***
Extrait selon l'invention à 0,005%	0.098 ± 0.004	197% ***

*** $p < 0,001$ vs cellules contrôles - ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett

D- Production de la Heme Oxygenase en condition siRNA Nrf2 :

Afin de vérifier si la voie d'activation de la hème oxygénase par un extrait selon l'invention passe bien par une activation du Nrf2, le potentiel d'induction de la production de Heme Oxygenase a été vérifié dans un système où l'expression du Nrf2 est bloquée (small interference siRNA).

Matériel et méthodes :

Des fibroblastes humains normaux, ont été prétraités pendant 24h par du siRNA Nrf2 et par du siRNA Scrambled (témoin siRNA sans actions) puis, sur chacune des conditions précédentes, pendant 24h par un extrait selon l'invention, tel qu'obtenu dans l'exemple 1, à 0,005% (p/v).

A la fin du traitement la Hème Oxygénase 1 (ou HMOX1) intracellulaire a été quantifiée par une technique ELISA. La coloration, proportionnelle à la quantité du marqueur étudié, a été mesurée par lecture de la densité optique (DO) à 450nm.

- 5 Les résultats ont été analysés statistiquement par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (Logiciel GraphPad Prism version 5.02, GraphPad Software, San Diego California USA).

Résultats :

- 10 Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7. Ces résultats montrent que la stimulation de la production d'HMOX1 induite par un extrait selon l'invention est largement diminuée (-62%, $p < 0,001$) lorsque la voie Nrf2 est partiellement bloquée (siRNA Nrf2).

- 15 L'activité d'un extrait selon l'invention sur la production d'Hème Oxygénase passe donc bien par la voie du Nrf2.

Cela démontre que l'extrait selon l'invention a une activité antioxydante, anti-radicalaire et anti-âge.

20 Tableau 7 - Production d'HMOX1 par des fibroblastes
- Comparatif siRNA Scrambled vs siRNA Nrf2

	HMOX1 (ng/ml)	Inhibition liée au siRNA Nrf2	
Cellules contrôles Scrambled	3,371 \pm 0.702	-	-
Cellules contrôles siRNA Nrf2	2.199 \pm 0.089	-35%	*
Extrait selon l'invention à 0,005% Scrambled	18.821 \pm 0.316	-	-
Extrait selon l'invention à 0,005% siRNA Nrf2	7.105 \pm 0.131	-62%	***

*** $p < 0,001$ vs cellules contrôles - ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey

- 25 *E- Effet sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO):*

Le potentiel antioxydant d'un extrait selon l'invention vis-à-vis de l'induction d'espèces réactives de l'oxygène induit par de l'H₂O₂ a été étudié.

Matériel et méthodes :

- Des kératinocytes humains normaux ont été incubés, pendant 24 heures, en présence d'un extrait selon l'invention, tel qu'obtenu dans l'exemple 1, à 0,002%; 0,005% et 0,01% (p/v) ou de la vitamine C à 500 μ M et de la Quercétine à 10 μ M (Antioxydants de références) avant incorporation de la sonde H2DCF-DA (incubation de 60 minutes).
- Les kératinocytes ont ensuite été stimulés par du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 100 μ M pendant 20 minutes et la production d'ERO (Espèces Réactives de l'Oxygène) a été évaluée par mesure de fluorescence.
- Les résultats ont été analysés statistiquement par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey (Logiciel GraphPad Prism version 5.02, GraphPad Software, San Diego California USA).

Résultats :

- Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8. Ces résultats montrent que l'extrait selon l'invention a significativement inhibé la production d'ERO par des kératinocytes en réponse à un stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cette activité antioxydante étant d'un niveau équivalent à celle des deux témoins antioxydants (Vitamine C et Quercétine).
- Cela démontre que l'extrait selon l'invention a une activité antioxydante, anti-radicalaire et anti-âge.

Tableau 8 - Production d'ERO dans des kératinocytes traités par H₂O₂

	ERO (Unités de fluorescence)	Significativité	
Cellules contrôles	30752.921 \pm 4555.136	-	-
Cellules stimulées (H ₂ O ₂)	44179.976 \pm 7445.110	+44%	***
Référence (Vit. C)	21719.018 \pm 3174.253	-51%	***
Référence (Quercétine)	14367.847 \pm 1790.753	-67%	***
Extrait selon l'invention à 0,002%	18769.676 \pm 2780.206	-58%	***
Extrait selon l'invention à 0,005%	14404.891 \pm 2974.938	-67%	***
Extrait selon l'invention à 0,01%	16531.685 \pm 1902.378	-63%	***

*** $p < 0,001$ - ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey

3. Protection contre les effets néfastes de la pollution

Les précédents résultats ont montré qu'un extrait selon l'invention stimule la production de l'hème oxygénase 1 via l'activation de la translocation du facteur de transcription Nrf2. En conséquence, l'extrait selon l'invention a permis une protection cellulaire anti-oxydante via la diminution de la formation des ERO induits par un stress H₂O₂.

L'extrait selon l'invention permettant de stimuler les défenses de la peau, nous avons évalué leur effet protecteur vis-à-vis de divers stress environnementaux, ici la pollution.

10 *A- Effet sur le stress oxydant :*

Matériel et méthodes :

Des kératinocytes humains normaux ont été traités pendant 24 heures par un extrait selon l'invention, tel qu'obtenu dans l'exemple 1, à 0,002% (p/v), la vitamine C à 500µM et la Quercétine à 10µM (Antioxydants de référence), par le Curcumin à 10µM (Hormétine de référence) ou par le Resveratrol à 10µM avant incorporation de la sonde H₂DCF-DA (incubation de 45 minutes).

Les kératinocytes ont ensuite été stimulés par du Benzo-α-pyrène (BaP) à 9 µg/ml pendant 20 minutes.

La production d'ERO a été évaluée par mesure de fluorescence.

20 La significativité des résultats a été vérifiée par un test t de Student.

Résultats et conclusion :

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 9. Ces résultats montrent que l'extrait selon l'invention à 0,002% a inhibé la production de ROS par des kératinocytes en réponse à un stress oxydant induit par le BaP à 6 et 9µg/ml.

Donc l'extrait selon l'invention exerce un effet protecteur vis-à-vis du stress oxydant induit par la pollution. L'extrait selon l'invention a donc une activité antioxydante, anti-radicalaire, anti-pollution et anti-âge.

30

35

Tableau 9 - Production d'ERO dans des kératinocytes traités par du BaP à 9 µg/ml

	ROS (Unités de fluorescence)	Significativité	
Cellules contrôles	4730 ± 324	-	-
Cellules stimulées (BaP à 9µg/ml)	16777 ± 1755	+255%	***
Référence (Vit. C)	14089 ± 1719	-16%	NS
Référence (Quercétine)	17140 ± 930	-32%	NS
Curcumin à 10µM	14065 ± 1231	-16%	NS
Resveratrol à 10µM	20357 ± 503	-21%	*
Extrait selon l'invention à 0,002%	11052 ± 828	34%	**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ et ns = non significatif - test t de Student

5 B- Protection des structures cutanées :

La capacité d'un extrait selon l'invention à protéger l'intégrité de la peau (derme et épiderme) des effets néfastes de la pollution a été étudiée sur des explants de peau humaine.

10 Matériel et méthodes :

Des explants de peau humaine, provenant d'une femme de 45 ans, ont été prétraités pendant 24h par une application topique d'une formule cosmétique contenant ou non (placébo) un extrait selon l'invention, tel qu'obtenu dans l'exemple 1 à 3%.

Ces explants ont ensuite à nouveau été traités par les formules cosmétiques en présence de Benzo- α -Pyrène (BaP à 20µM) pour le protocole 1 ou de BaP+Nicotine (20µM) pour le protocole 2.

Des Immunomarquages de différents marqueurs des structures cutanées ont été réalisés.

Résultats et conclusion :

20 Les résultats obtenus sont présentés par les Figures 2 à 7.

Le stress mimant la pollution induit par le BaP +/- Nicotine a conduit à une altération de l'expression des marqueurs structuraux étudiés.

Dans ces conditions, l'extrait selon l'invention a protégé les marqueurs épidermiques suivants :

- la Claudine 4 (Marqueur des jonctions serrées/fonction barrière),
- la Filaggrine (Marqueur de la fonction barrière et précurseur des facteurs naturels d'hydratation), et
- la Loricrine (Marqueur impliqué dans la différenciation cellulaire/fonction barrière) ;

Ainsi que les marqueurs dermiques comme :

- le Collagène I (Marqueur impliqué dans la fermeté de la peau),
- l'Elastine (Marqueur impliqué dans l'élasticité de la peau), et
- de la Fibronectine (Marqueur impliqué dans la structure du Derme).

Ces résultats montrent un réel effet protecteur de l'intégrité structurale de l'épiderme et de sa fonction barrière ainsi que le maintien d'une structure normale du derme et donc une action protectrice globale de la peau vis-à-vis de la pollution environnementale.

L'extrait selon l'invention a donc une activité antioxydante, anti-radicalaire, anti-pollution et anti-âge.

4. Protection contre les effets délétères liés au soleil

Les Ultraviolets (UV) et les infrarouges (IR) pénètrent plus ou moins profondément dans la peau et sont responsables, entre autre, d'une diminution de sa fermeté et d'une augmentation de la quantité de radicaux libres relargués entraînant un vieillissement cutané prématuré. Ils sont également responsables de la formation des mélanomes et d'une immunodépression de la peau.

L'effet protecteur d'un extrait selon l'invention vis-à-vis d'un stress induit par les UV ou les IR a été étudié.

A- Protection contre les dommages à l'ADN induits par les UV (Comet Assay) :

Le maintien de l'intégrité nucléaire de la cellule, vis-à-vis des UVs, a été testé grâce à un test des comètes (Comet Assay).

Matériel et méthodes :

Des kératinocytes humains normaux ont été traités pendant 2h par un extrait selon l'invention, tel qu'obtenu dans l'exemple 1, à 0,001% (p/v).

Un Comet Assay est réalisé suivant la méthode décrite par “Singh and al” en 1988 et par “De Meo and al” en 1991, et qui consiste en une irradiation des cellules par de la lumière à 4,5J/cm² (0,28J/cm² d’UVA ; 0,08J/cm² d’UVB et 4,14J/cm² de lumière visible) correspondant à une exposition de 1 à 3 min au soleil en plein été. Puis en une migration électrophorétique en gel d’agarose des ADN sur un gel.

Une valeur relative de χ^2 OTM est calculée grâce au logiciel “Systat Software”, celle-ci étant directement proportionnel à la taille de la comète et donc au degré de protection de l’actif vis-à-vis des UV.

La significativité des résultats a été vérifiée par une analyse de variance sur le logiciel SigmaPlot (version 11.0, Systat Software, Chicago, IL, USA).

Résultats et conclusion :

Les résultats sont présentés dans le tableau 10 et par la Figure 8

Ces résultats montrent que l’extrait selon l’invention à 0,001%, a protégé les kératinocytes vis-à-vis des dommages à l’ADN induits par une irradiation UV (54% de protection, $p < 0,001$).

L’extrait selon l’invention a donc une activité antioxydante, anti-radicalaire, anti-pollution et anti-âge.

Tableau 10 - Pourcentage de protection des cellules vis-à-vis des UV

	χ^2 OTM	% de Protection	
Témoin sans UV	2,09 ± 0,1	100	
Témoin Irradié à 4,5J/cm ²	11.59 ± 0.41	0	***
Extrait selon l’invention à 0,001%	6.43 ± 0.28	54.4	***

*** $p < 0,001$ vs cellules non irradié et vs cellules irradié à 4,5J/cm².

Statistiques sur SigmaPlot

B- Inhibition de la production de MMP1 induite par les IR

Les Infrarouge (IR), qui représentent plus de la moitié du spectre solaire, peuvent induire la dégradation de la matrice dermique, contribuant au vieillissement cutané, en stimulant la production de protéases telles que la MMP1.

La capacité d’un extrait selon l’invention à protéger les cellules dermiques des effets néfastes des IR a été étudiée en évaluant la production de MMP1.

Matériel et méthodes :

Des Fibroblastes Humains Normaux (FHN) ont été incubés en présence d'un extrait selon l'invention, tel qu'obtenu dans l'exemple 1, à 0,001% ou par de la dexaméthasone à 10^{-7} M (référence antiinflammatoire) pendant 48h à la suite d'une irradiation de 1h par des infrarouges (0,57kJ/cm²).

Après incubation, les surnageants sont récupérés afin de doser la MMP1 (Kit ELISA, R&D Systems) libérée.

La significativité des résultats a été vérifiée par un test t de Student.

Résultats et conclusion :

Les résultats sont présentés dans le tableau 11. Ces résultats montrent que l'extrait selon l'invention à 0,001%, a significativement inhibé la production de MMP1 induite par les Infra Rouges dans des Fibroblastes humains normaux.

L'extrait selon l'invention a donc une activité antioxydante, anti-radicalaire, anti-pollution et anti-âge.

Tableau 11 - Production de MMP1 induite par les IR dans des fibroblastes humains normaux

	MMP1 (ng/ml)	% de Protection	
Témoin sans IR	11	100	***
Témoin Irradié à 0,57kJ/cm ²	88.6	0	
Dexaméthasone à 10^{-7} M	9.3	102	***
Extrait selon l'invention à 0,001%	77.4	14	*

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs cellules irradiées

5. Protection contre les effets d'un stress chimique

Effet sur la production de PGE2 induit par le PMA :

La protection antiinflammatoire d'un extrait selon l'invention vis-à-vis d'une molécule chimique, le PMA, a été étudiée grâce à l'analyse du relargage de la Prostaglandine 2 (PGE2)

Matériel et méthodes :

Des kératinocytes humains normaux ont été prétraités par un extrait selon l'invention, tel qu'obtenu dans l'exemple 1, à 0,002% et 0,005% et par de l'Indométacine à 10^{-6} M (témoin-anti inflammatoire de la voie des Prostaglandines) pendant 24h à 37°C, et ce afin de pouvoir mesurer un niveau de protection de l'actif vis-à-vis d'une inflammation au PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) à 0,1µg/ml utilisé sur ces mêmes tapis cellulaire pendant 24h de plus.

A la fin du traitement les surnageant sont récoltés et un dosage de la Prostaglandine E2 (PGE2 ; RetD Systems) est réalisé. La coloration, proportionnelle à la quantité de PGE2, a été mesurée par lecture de la densité optique (DO) à 450nm. La significativité des résultats a été vérifiée par un test t de Student.

Résultats :

Les résultats sont présentés dans le tableau 12. Ces résultats montrent que l'extrait selon l'invention aux deux concentrations a significativement diminué le relargage de la PGE2 vis-à-vis d'une induction par le PMA à 0,1µg/ml.

L'extrait selon l'invention a donc une activité antioxydante, anti-radicalaire, anti-pollution et anti-âge.

Tableau 2 - Production de PGE2 dans des kératinocytes traités par du PMA

	PGE2 (pg/ml)	Inhibition	
Cellules contrôles	39 ± 0	100%	***
PMA à 0,1µg/ml	113806 ± 11441	0%	
Indométacine à 10^{-6} M	52 ± 8	100%	***
Extrait selon l'invention à 0,002%	35750 ± 2192	69%	**
Extrait selon l'invention à 0,005%	30382 ± 2401	73%	**

*** 0,001 < p < 0,01 et *** p < 0,001 vs cellules stimulées le PMA
test t de Student*

6. Protection contre les effets du vieillissement

L'action répétée de stress environnementaux, tels que, la pollution, les effets néfastes du soleil, les molécules chimiques et toutes autres formes d'inductions d'un stress oxydant, entraîne une dégradation de la matrice dermique et donc un vieillissement cutané prématuré.

Un extrait selon l'invention a été analysé sur un modèle de vieillissement cellulaire afin d'analyser leurs actions vis-à-vis de protéines qui sont sous-exprimées ou surexprimées avec l'âge.

10

Matériel et méthodes :

Des kératinocytes sont mis en culture, et trypsinés toutes les semaines, pendant 4 semaines dans un milieu de culture induisant un phénotype de vieillissement (milieu « pro-âge ») en présence ou en absence d'un extrait selon l'invention, tel qu'obtenu dans l'exemple 1, à 0,000025% de MS.

15

Au bout de 3 semaines de cultures/passages une analyse protéomique est réalisée. Celles-ci étant impliquées dans divers voies cellulaires regroupées ensuite en 6 domaines : métabolisme, apoptose, détoxification, catabolisation protéique et synthèse protéique.

20

Résultats et conclusion :

Les résultats sont présentés dans le tableau 13. Dans ce contexte d'induction du vieillissement, l'extrait selon l'invention a stimulé et/ou protégé l'expression de plusieurs protéines impliquées principalement dans la détoxification/protection cellulaire et dans les défenses immunitaires :

25

Détoxification et protection cellulaire :

- **Stimulation de la Peroxiredoxine 2 (PRDX2)** : enzyme antioxydante jouant un rôle dans la protection cellulaire contre les dommages causés par les ERO intracellulaire.
- **Stimulation de la Carbonyl Reductase 1 (CBR1)** : dehydrogénase/réductase permettant de réduire les composés carbonylés (médicaments) et intervient dans la détoxification lors de la peroxydation lipidique. Celle-ci est inhibée dans les conditions « pro-âges » et stimulée par l'extrait selon l'invention dans ces conditions.
- **Inhibition de l'Aldehyde Dehydrogenase 2 (ALDH2)** : enzyme mitochondriale jouant un rôle dans la protection cellulaires et dans la

30

35

différentiation qui vont catalyser/détoxifier des molécules aldéhydes/carbonyles (médicaments, pollution...). Cette protéine est stimulée dans les conditions « pro-âge », l'extrait selon l'invention restaure son niveau d'expression à un niveau basal.

- 5 • **Stimulation de la Fatty Acid Binding Protein 5 (FABP5)** : protéine chaperonne essentiellement exprimée dans l'épiderme et impliquée dans la régulation de l'homéostasie lipidique et donc jouant un rôle dans la fonction barrière. Les conditions « pro-âge » inhibent son expression, celle-ci est restaurée par les polyphenols de Maracuja.
- 10 • **Stimulation des Proteasome subunits β 2 et β 6 (PSMB2 et PSMB6)** : Le Proteasome est impliqué dans l'élimination des protéines altérées/oxydées et dans le renouvellement des protéines intracellulaires. Il est constitué de sous unités α et β qui vont, entre autre, couper les protéines altérées au niveau de la glutamine (β 6) et au niveau trypsine (β 2). L'âge diminue l'activité du
- 15 Proteasome ce qui entraîne une accumulation des protéines altérées/oxydées ; cet effet de l'âge est retrouvé dans les conditions « pro-âge » et dans ces conditions l'extrait selon l'invention stimule l'expression de ces deux sous-unités du protéasome.

20 Défense immunitaire :

- 25 • **Inhibition de la Beta-2-microglobuline (B2MG)**: petite protéine de surface (épiderme) impliquée dans la réponse immunitaire. Elle fait partie du complexe majeur d'Histocompatibilité et est surexprimée en condition pathologique ce qui va induire la production d'interleukines, notamment 6 et
- 30 8, ainsi que la 10 qui est une interleukine immunosuppressive. Ici, dans les conditions induisant un vieillissement, son expression est augmentée. L'extrait selon l'invention empêche cette augmentation.
- **Inhibition de la Lectin, mannose-binding, 1 (LMAN1)** : protéine faisant partie de la réponse immunitaire inné en permettant la phagocytose des
- cellules apoptotiques et des pathogènes. Une déficience en ce gène implique une augmentation des débris cellulaires dans la peau. Il n'est pas ou peu
- présent à l'état basal et est augmenté en condition inflammatoire (Ex : UV). Dans les conditions « pro-âge », son expression est augmentée et modulée
- sous l'action de l'extrait selon l'invention.

Tableau 13 - Expression protéiques de marqueurs impliqués dans la détoxification et dans l'immunité (en %)

Protéines	% d'induction vis-à-vis du Milieu normal		% d'induction vis-à-vis du milieu « Pro-Age »	
	Milieu « Pro-Age »	Extrait selon l'invention 0,000025%	Milieu « Pro-Age »	Extrait selon l'invention 0,000025%
Peroxiredoxin 2 (PRDX2)	11.46	16.68	0.00	45.51
Carbonyl reductase 1 (CBR1)	-15.87	-7.46	0.00	52.99
Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2)	46.81	4.97	0.00	-89.38
Fatty acid binding protein 5 (FABP5)	-24.82	4.68	0.00	118.87
Proteasome β2 (PSMB2)	-21.15	-10.96	0.00	48.21
Proteasome β6 (PSMB6)	-16.85	-10.92	0.00	35.21
Beta-2-microglobulin (B2MG)	31.16	-0.57	0.00	-101.83
Lectin, mannose-binding, 1 (LMAN1)	40.13	3.71	0.00	-90.75

5 7. Conclusion

Ces différents tests montrent un effet anti-inflammatoire, anti-oxydant, et anti-pollution et donc anti-âge de l'extrait polyphénolique selon l'invention.

10 Exemple 3 : Compositions pour application par voie topique

Plusieurs compositions pour application par voie topique sont présentées ci-dessous. L'extrait polyphénolique de graines de Passiflore, de l'exemple 1 ou 2, peut être incorporé à divers produits cosmétiques, tels que des eaux nettoyantes, des émulsions huile dans eau, des émulsions eau dans huile, des huiles, des laits, des lotions, des shampooings, des produits moussants et sprays, dont les compositions sont présentées ci-dessous à titre d'exemples.

EAU NETTOYANTE PEAU SENSIBLE

Matière première / Nom commercial ou Nom INCI	%
CAPRYLOYL GLYCINE	De 0 à 1 %
LESSIVE SOUDE	De 0 à 1 %
SEQUESTRANT	De 0 à 1 %
BUTYLENE GLYCOL	De 1 à 5 %
BETA CAROTENE	De 0 à 2 %
<i>EXTRAIT POLYPHENOLIQUE DE PASSIFLORE</i>	De 0,001 à 10 %
CONSERVATEURS	De 0 à 1 %
PEG-32	De 1 à 5 %
PEG-7 PALMCOCOATE	De 1 à 5 %
GLUCONATE ZINC	De 0 à 1 %
ACIDE CITRIQUE	De 0 à 1 %
EAU PURIFIÉE	QSP 100 %
PARFUM	De 0 à 1 %
POLOXAMER 184	De 1 à 5 %

EMULSION ANTI-AGE

5

Matière première / Nom commercial ou Nom INCI	%
ISOPARAFFINE LIQUIDE	De 5 à 20 %
STEARATE D'ISOCETYLE	De 5 à 20 %
HYDROXYSTEARATE AL - MG	De 5 à 20 %
ABIL WE 09	De 1 à 5 %
GLYCEROL	De 1 à 5 %
HUILE VASELINE	De 1 à 5 %
ZINC OXYDE MICRONISE	De 1 à 5 %
BUTYLENE GLYCOL	De 1 à 5 %
RETINOL	De 0 à 1%
VITAMINE C	De 0 à 5%
<i>EXTRAIT POLYPHENOLIQUE DE PASSIFLORE</i>	De 0,01 à 10 %
ISONONYL ISONONANOATE	De 1 à 5 %
CIRE D'ABEILLE	De 1 à 5 %
TARTRATE DE SODIUM	De 1 à 5 %
CHLORURE DE SODIUM	De 0 à 5 %
GLYCINE	De 1 à 5 %
CONSERVATEURS	De 0 à 1 %
CHOLESTEROL	De 0 à 1 %
PHYTOSPHINGOSINE	De 0 à 1 %
ACIDE TARTRIQUE	De 0 à 1 %
EAU PURIFIÉE	QSP 100 %

REVENDECATIONS

1. Extrait polyphénolique de graines de Passiflore, en particulier de graines de *Passiflora incarnata* ou de *Passiflora edulis*, comprenant au moins 30% en poids de polyphénols, exprimés en équivalent d'acide gallique, par rapport au poids de l'extrait sec, dans lequel ledit extrait comprend au moins 10% en poids d'acides organiques, notamment d'acide acétique, d'acide malique, d'acide citrique ou leurs mélanges, par rapport au poids de l'extrait sec.
2. Extrait selon la revendication 1, comprenant au moins 35%, avantageusement au moins 40%, en poids de polyphénols, exprimés en équivalent d'acide gallique, par rapport au poids de l'extrait sec.
3. Extrait selon la revendication 1 ou 2, dans lequel au moins 50% en poids desdits polyphénols sont des dérivés catéchiques, exprimés en équivalent d'acide gallique, par rapport au poids de polyphénols dans l'extrait sec.
4. Extrait selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est obtenu par extraction solide/liquide des graines de Passiflore dans un solvant choisi parmi l'eau, les glycérols, les glycols, et leurs mélanges.
5. Extrait selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est obtenu par extraction solide/liquide des graines de Passiflore dans un solvant choisi parmi les mélanges binaires eau/glycérol, eau/glycol, et leurs mélanges, avantageusement dans une proportion comprise entre 30 et 90% de glycérol et/ou de glycol dans l'eau.
6. Procédé de préparation d'un extrait polyphénolique des graines de passiflore tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, ledit procédé comprenant au moins une étape d'extraction solide/liquide dans un solvant choisi parmi l'eau, les glycérols, les glycols, et leurs mélanges.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :
 - a) broyage des graines ;

- b) éventuellement délipidation des graines, de préférence par pressage, par extraction éthanolique ou par extraction CO₂ supercritique ;
- c) extraction solide/liquide des graines broyées et éventuellement délipidées dans un solvant choisi parmi l'eau, les glycérols, les glycols, et leurs mélange ;
- d) séparation de la phase solide et de la phase liquide par décantation, et/ou centrifugation et/ou filtrations successives ; et
- e) éventuellement séchage de l'extrait obtenu à l'étape d).

8. Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que ledit solvant d'extraction solide/liquide est choisi parmi les mélanges binaires eau/glycérol, eau/glycol, et leurs mélanges, avantageusement dans une proportion comprise entre 30 et 90% de glycérol et/ou de glycol dans l'eau.

9. Composition comprenant en tant que principe actif, un extrait polyphénolique de graines de Passiflore tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou d'un extrait susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, et avantageusement un excipient approprié.

10. Composition selon la revendication 9, comprenant de 0,001 à 10% en poids, avantageusement de 0,01 à 5% en poids, dudit extrait polyphénolique de graines de Passiflore, le poids de l'extrait étant exprimé en extrait sec, par rapport au poids total de la composition.

11. Extrait selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou extrait susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou composition selon l'une quelconque des revendications 9 et 10 pour son utilisation pour prévenir et/ou traiter :

- des troubles ou pathologies de la peau et/ou des muqueuses et/ou des phanères, avantageusement des réactions inflammatoires, des réactions d'oxydation, des désordres liés à des attaques radicalaires liées ou non à la pollution, des troubles de la barrière ou de l'homéostasie, du vieillissement, notamment du vieillissement chronologique et/ou actinique, de la peau et/ou des muqueuses et/ou des phanères, et/ou
- des troubles vasculaires, et/ou
- des altérations du tissu adipeux.

12. Procédé de soin cosmétique de la peau et/ou des phanères et/ou des muqueuses, en vue d'améliorer leur état et/ou leur aspect, consistant à administrer un extrait tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou un extrait susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 8 ou une composition cosmétique telle que définie selon l'une quelconque des revendications 9 et 10.

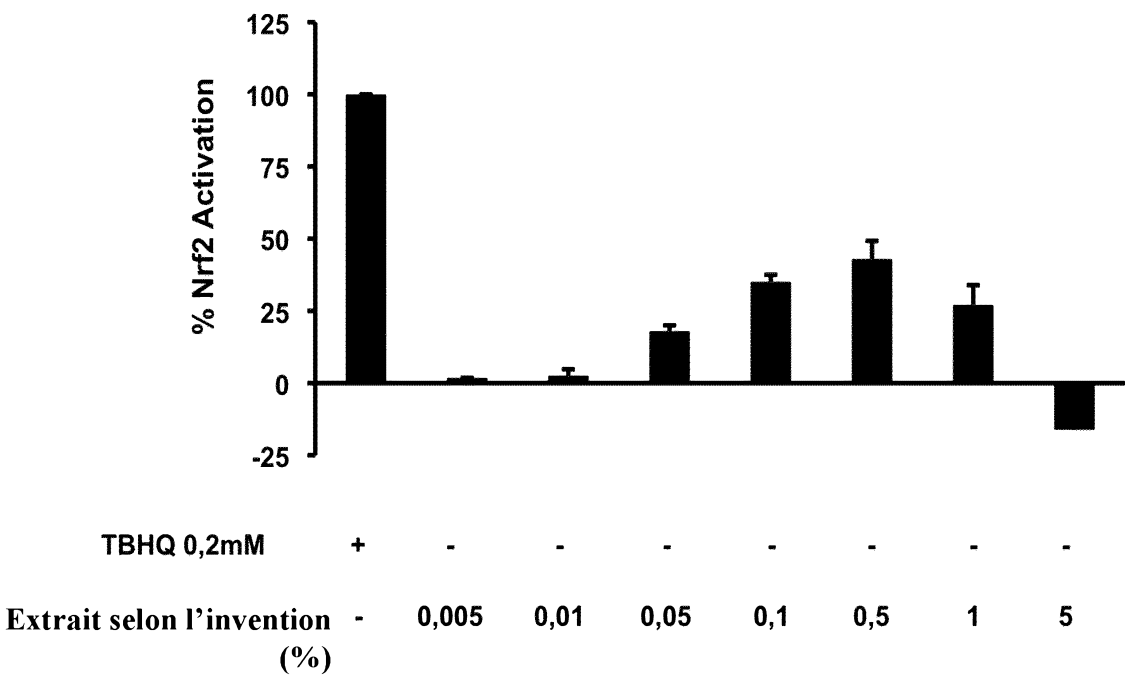


Fig. 1

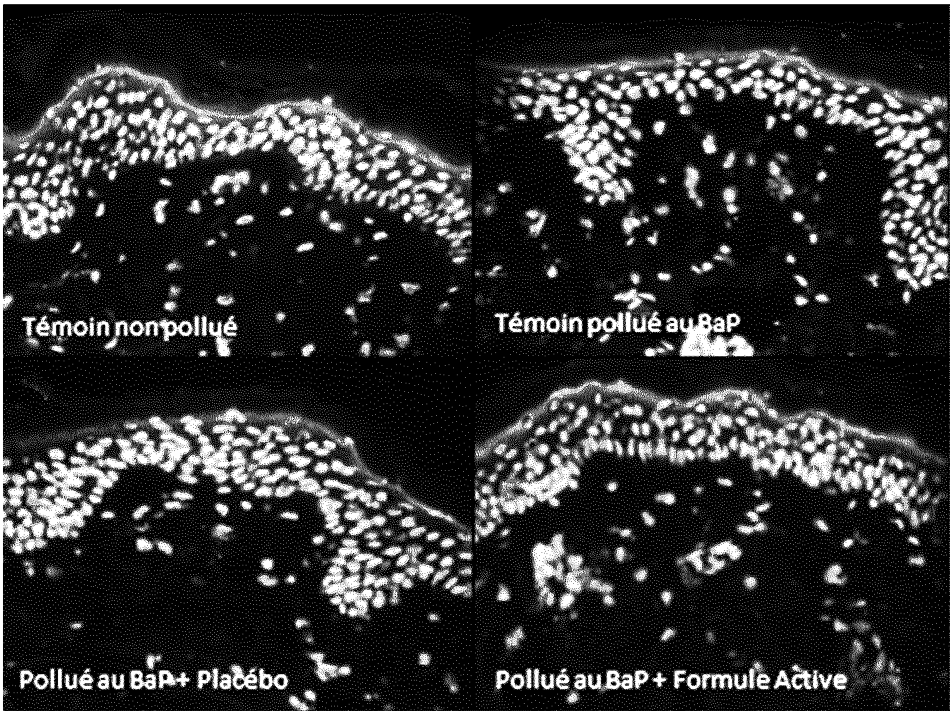


Fig. 2

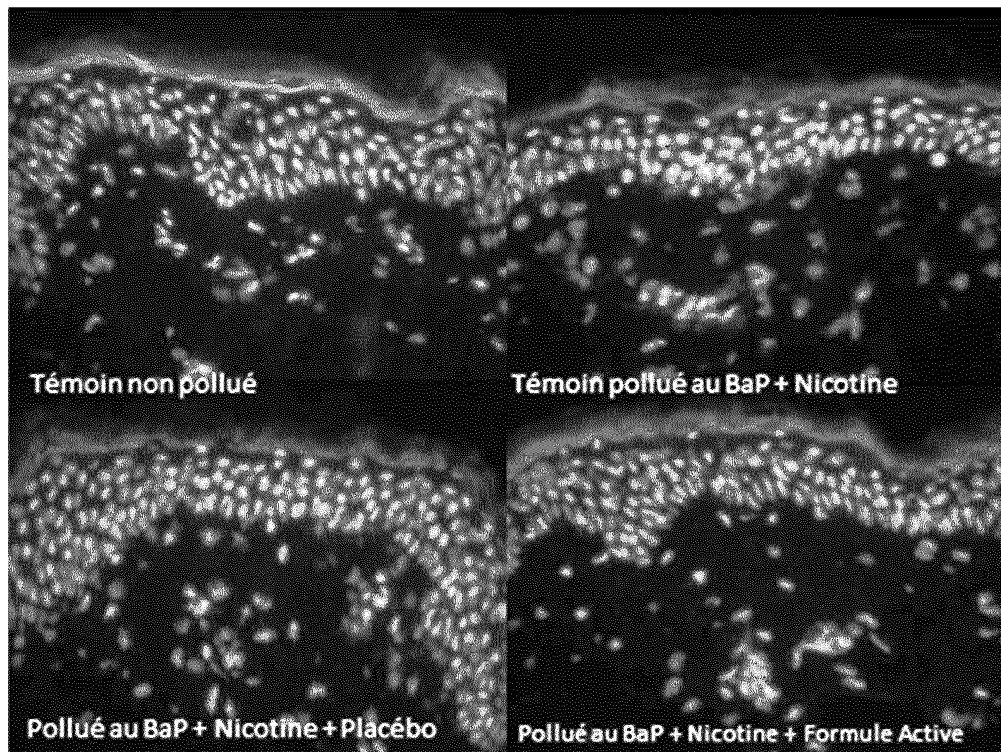


Fig. 3

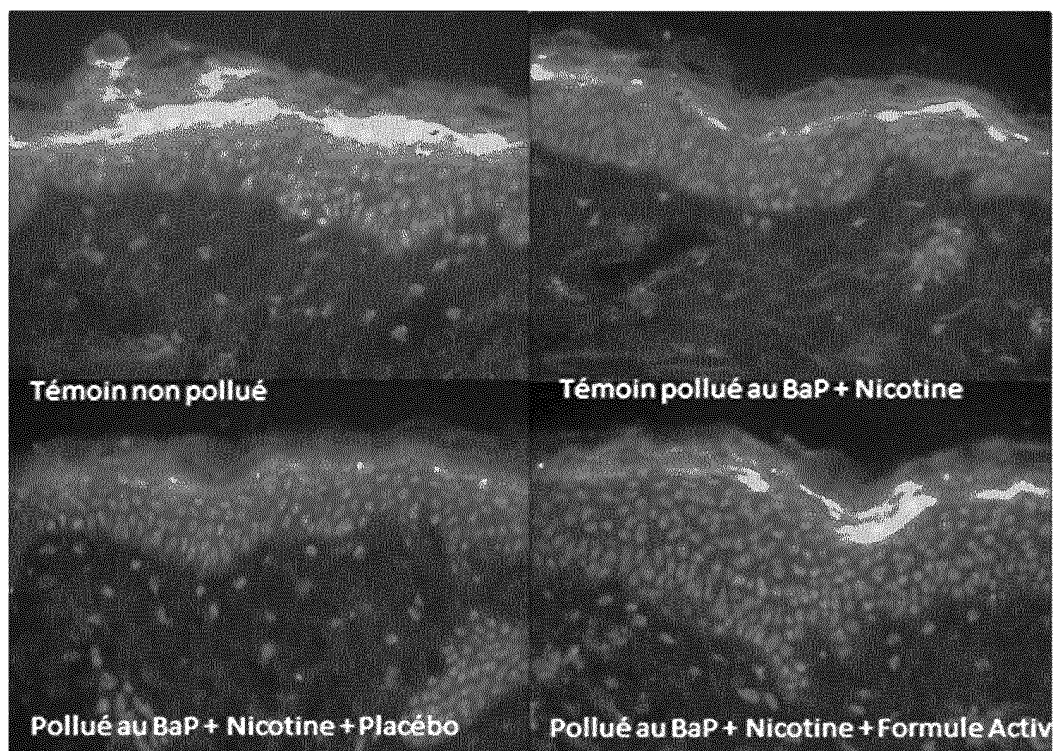


Fig. 4

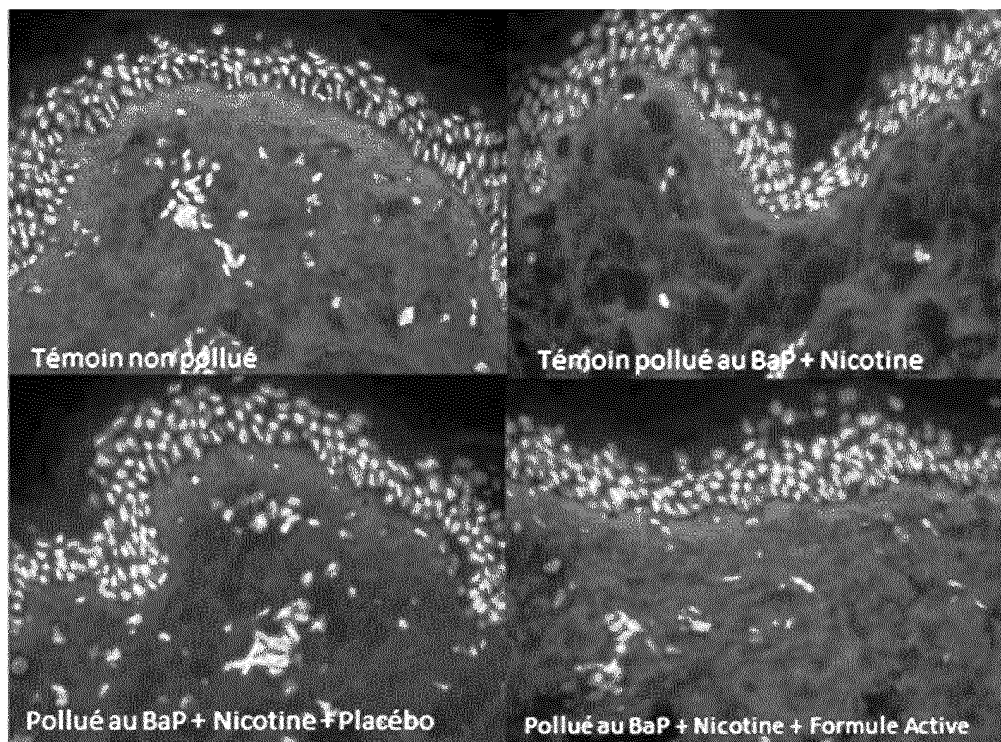


Fig. 5

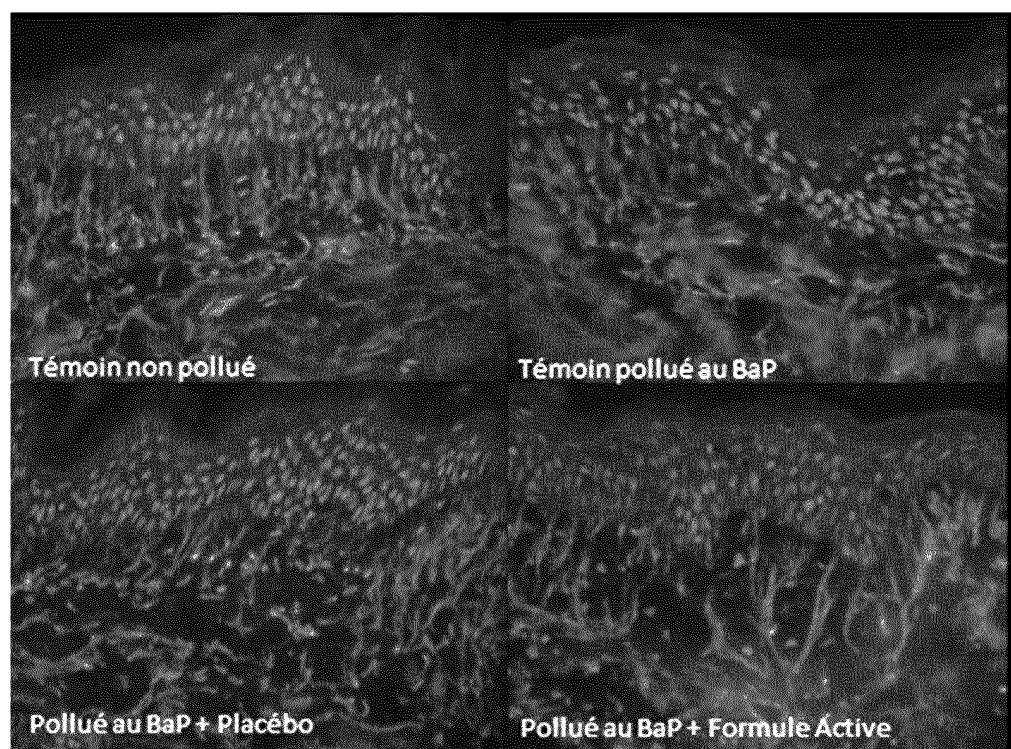


Fig. 6

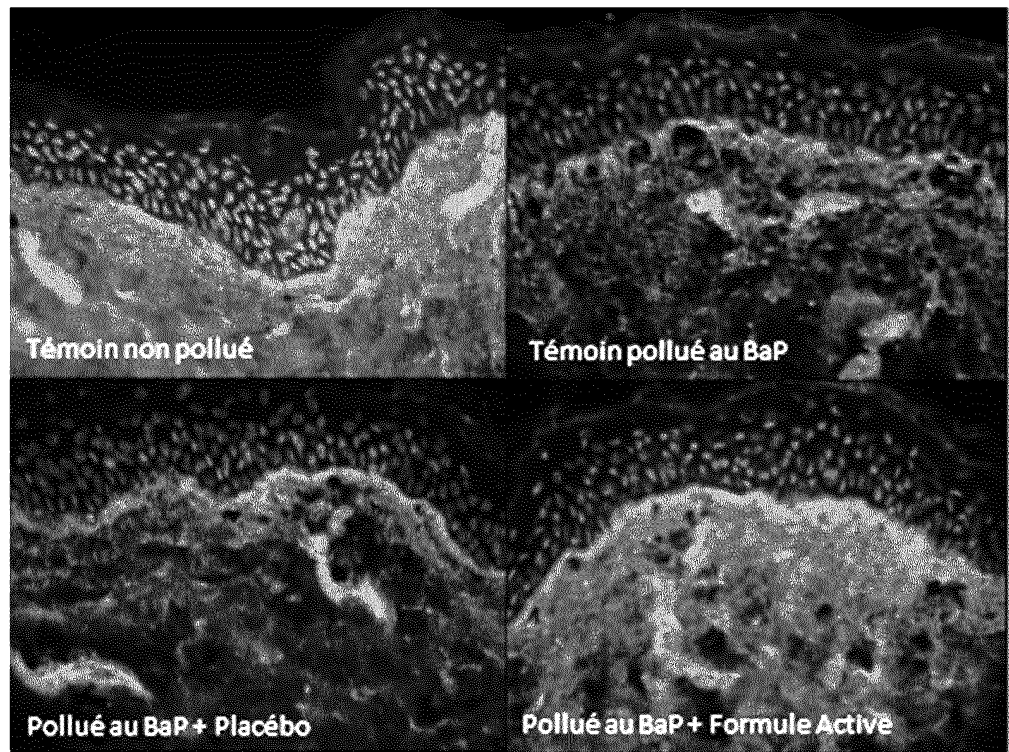
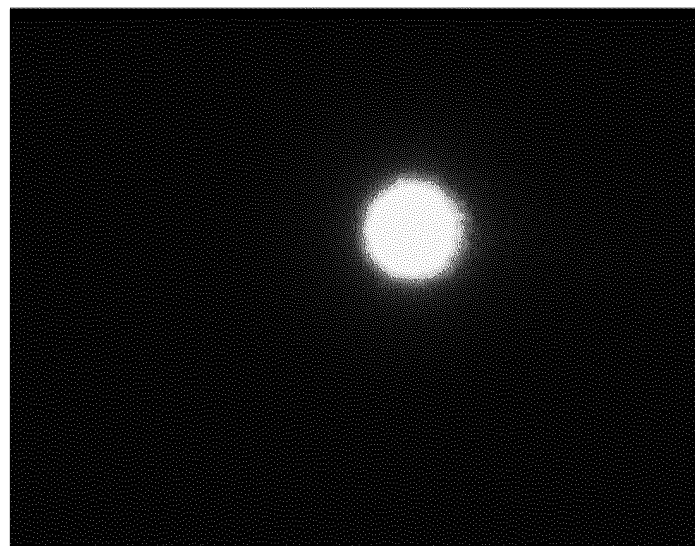


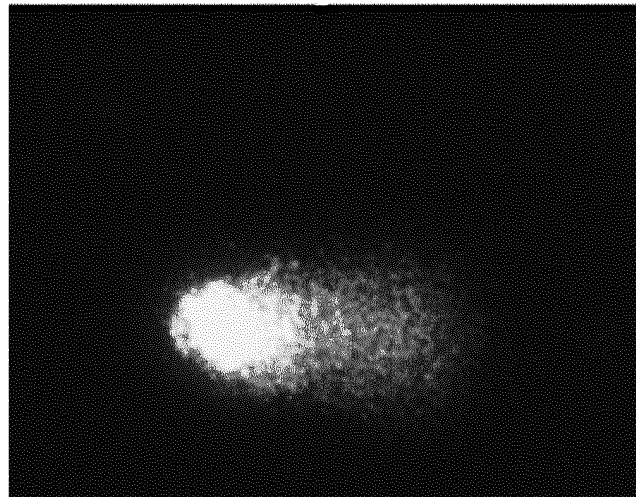
Fig. 7



Contrôle négatif

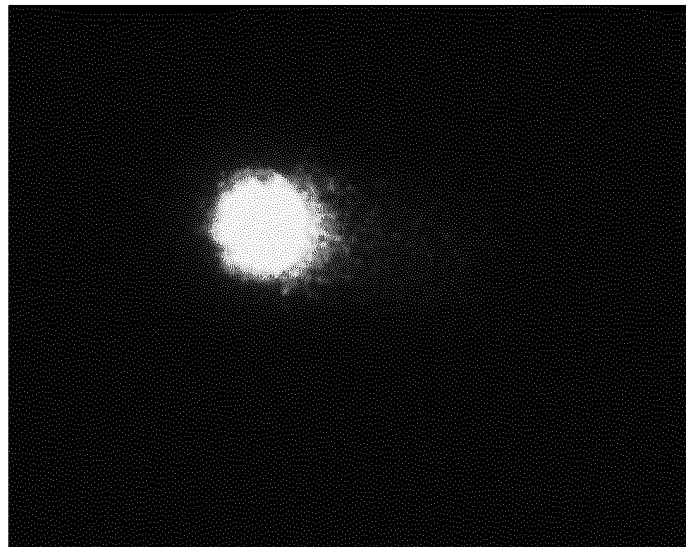
Fig. 8A

5/5



Contrôle UV

Fig. 8B



P. de Maracuja à 0,001%

Fig. 8C

RAPPORT DE RECHERCHE

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

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

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

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

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

☐ Le demandeur a maintenu les revendications.

☒ Le demandeur a modifié les revendications.

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

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

☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

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

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

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

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

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

NATTAYA LOURITH ET AL: "Antioxidant Activities and Phenolics of Passiflora edulis Seed Recovered from Juice Production Residue", JOURNAL OF OLEO SCIENCE, vol. 62, no. 4, 1 janvier 2013 (2013-01-01), pages 235-240, XP055286455, JP ISSN: 1345-8957, DOI: 10.5650/jos.62.235

Yuko Matsui ET AL: "Seeking a New Anti-Skin-Aging Material: Piceatannol and Its Derivatives from Passion Fruit (Passiflora edulis) Seed" In: "ACS Symposium Series", 1 janvier 2013 (2013-01-01), American Chemical Society/Oxford University Press, US, XP055286424, ISSN: 0097-6156 vol. 1129, pages 189-202, DOI: 10.1021/bk-2013-1129.ch012,

HIROKO MARUKI-UCHIDA ET AL: "The Protective Effects of Piceatannol from Passion Fruit (Passiflora edulis) Seeds in UVB-Irradiated Keratinocytes", BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN (OF JAPAN), vol. 36, no. 5, 1 janvier 2013 (2013-01-01), pages 845-849, XP055286427, JP ISSN: 0918-6158, DOI: 10.1248/bpb.b12-00708

YUKO MATSUI ET AL: "Extract of Passion Fruit (Passiflora edulis) Seed Containing High Amounts of Piceatannol Inhibits Melanogenesis and Promotes Collagen Synthesis", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 58, no. 20, 27 octobre 2010 (2010-10-27), pages 11112-11118, XP055030680, ISSN: 0021-8561, DOI: 10.1021/jf102650d

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

FR 3 010 906 A1 (EXPANSCIENCE LAB [FR]) 27 mars 2015 (2015-03-27)

KR 2015 0064314 A (KOLMAR KOREA [KR]) 11 juin 2015 (2015-06-11)

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

NEANT