

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

11 N° de publication : 3 144 163

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

21 N° d'enregistrement national : 22 14243

51 Int Cl⁸ : C 12 N 5/04 (2023.01), C 12 N 5/02, A 01 H 4/00,
A 61 K 8/97, 8/49, 8/368, A 61 Q 19/00, 19/08

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 22.12.22.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 28.06.24 Bulletin 24/26.

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

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : Sederma SAS — FR.

72 Inventeur(s) : BONDIL Céline, DE BAENE Frédéric,
MONDON Philippe, RINGENBACH Caroline et SAU-
NOIS Alex.

73 Titulaire(s) : Sederma SAS.

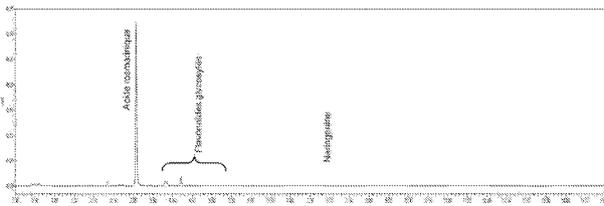
54 ~~Procédé~~ Procédé d'obtention d'un extrait d'origine végétale,
une composition contenant ledit extrait et son
utilisation cosmétique.

57 La présente invention propose un procédé d'obtention d'un extrait d'origine végétale par culture in vitro à partir d'une lignée de cellules végétales indifférenciées ou différenciées, comprenant l'ajout d'au moins un flavonoïde aglycone dans le milieu de culture. L'extrait obtenu contient un ensemble de métabolites secondaires d'intérêt. Il peut être utilisé avanta-

geusement pour un traitement cosmétique non-thérapeu-
tique de la peau et des phanères.

Figure pour l'abrégé : Figure 2.

FIGURES



FR 3 144 163 - A1



Description

Titre de l'invention : Procédé d'obtention d'un extrait d'origine végétale, une composition contenant ledit extrait et son utilisation cosmétique

- [0001] La présente invention se rapporte à un nouveau procédé d'obtention d'un extrait d'origine végétale, une composition le contenant et son utilisation cosmétique.
- [0002] Les domaines d'application de la présente invention sont notamment les ingrédients et compositions pour l'industrie des cosmétiques, cosméceutiques, de la dermo-pharmacie et des produits d'hygiène et de soins personnels, l'extrait d'origine végétal étant utilisé pour le traitement de la peau de mammifères, humains ou animaux, et de ses phanères.
- [0003] Un extrait d'origine végétale peut être obtenu de manière classique directement à partir d'une plante ou bien par culture *in vitro* de cellules végétales, de tissus ou d'organes de plante.
- [0004] La présente invention concerne plus particulièrement un procédé d'obtention par culture *in vitro*.
- [0005] L'obtention par culture *in vitro* possède en effet de nombreux avantages sur la voie agro-industrielle (culture de plantes en plein champ et extraction ultérieure en usine). Du fait de la maîtrise totale des conditions de cultures, les extraits obtenus par culture *in vitro* sont exempts de substances exogènes toxiques (herbicides, pesticides, engrais, métaux lourds et autres contaminants, comme ceux pouvant provenir de parasites des végétaux). Par ailleurs, le strict contrôle des conditions de culture *in vitro* réduit le risque de variation spontanée de la lignée et garantit un profil reproductible de métabolites secondaires qui correspondent aux molécules d'intérêt recherchées, contrairement à la culture en plein champ où se pose le problème de la variabilité phénotypique, liée en particulier aux conditions climatiques, météorologiques, pédologiques et géographiques et de leurs aléas. Par ailleurs encore, cette technologie s'affranchit d'obstacles tels que le cycle biologique naturel de la plante et la saisonnalité de production des métabolites secondaires, permettant une meilleure sécurité et rapidité d'approvisionnement. De plus, l'impact environnemental est minimal car limitant substantiellement la consommation en eau, évitant une exploitation de terres arables, et prévenant de la pollution des sols. En outre, la biodiversité est préservée puisqu'il suffit d'un plant ou même d'une graine, pour initier une nouvelle culture et production quasi illimitée *in vitro*. Enfin, cette technologie offre la possibilité de réaliser des protocoles contrôlés et relativement rapides en vue d'augmenter les rendements en certaines molécules notamment celles produites en faible quantité dans

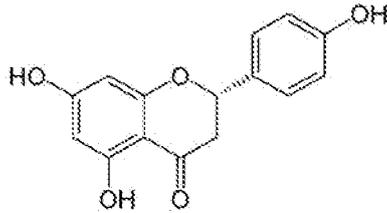
la plante (par exemple par usage de l'élicitation des cultures *in vitro*).

- [0006] Parmi les techniques existantes à ce jour dans le domaine de la culture *in vitro* des végétaux, l'invention vise plus particulièrement la culture de cellules indifférenciées ou dédifférenciées : ce procédé comprend d'abord la création et la sélection d'une lignée cellulaire fortement proliférative soit à partir de cellules méristématiques qui sont des cellules indifférenciées, soit à partir de cellules dédifférenciées qui poussent sous la forme d'amas de cicatrisation appelés cals, suite au prélèvement et à la coupure d'un fragment (également appelé explant), de plante, feuille, tige, racine ou autre. Cette lignée est ensuite cultivée, d'abord en milieu gélosé, puis en milieu liquide en bioréacteur de façon à augmenter substantiellement la biomasse. Au cours du cycle de croissance et dans des conditions de milieu à définir et optimiser, les cellules végétales de la biomasse auront synthétisé des métabolites secondaires qui vont constituer les molécules d'intérêt cosmétique. La culture de la biomasse est ensuite stoppée et soumise à une extraction au moment optimal de façon à obtenir une quantité maximale de ces molécules d'intérêt. Il est également possible d'utiliser des lignées cellulaires existantes déjà disponibles dans le commerce.
- [0007] Ainsi le procédé selon l'invention comprend schématiquement :
- [0008] - dans un premier temps, le cas échéant, une étape de création et de sélection d'une lignée cellulaire capable de produire à grande échelle une biomasse cellulaire selon des critères pré-établis (phénotype constant et production optimale et constante des métabolites choisis, capacité à proliférer) ;
- [0009] - puis dans un deuxième temps, une étape de pré-culture à partir de cette lignée sélectionnée destinée à augmenter le nombre de cellules dans une biomasse ;
- [0010] - puis dans un troisième temps, une étape de culture en bioréacteur pour faire proliférer la biomasse cellulaire, éventuellement avec une étape d'élicitation ;
- [0011] - enfin dans un quatrième temps, une étape de traitement de la biomasse cellulaire obtenue pour récupérer ledit extrait cellulaire d'origine végétale selon l'invention qui comprendra au moins les métabolites secondaires d'intérêt cosmétique attendus.
- [0012] Jusqu'à aujourd'hui, les techniques *in vitro* décrites ont permis de réaliser des extraits originaux par rapport aux extraits classiques en ce qu'ils contenaient comme métabolites secondaires des dérivés d'acide caféique à des concentrations intéressantes pour obtenir une activité cosmétique. On peut citer par exemple les demandes et brevets suivants.
- [0013] Le brevet EP1736167 décrit l'obtention d'un extrait d'origine végétale à partir de cellules végétales de *Syringa vulgaris* comprenant une quantité avantageuse en isoverbascoside qui appartient à la famille des phénylpropanoïdes glycosides.
- [0014] La demande de brevet EP2319914 décrit l'obtention *in vitro* pour une liste théorique d'espèces de plante d'un extrait comprenant des phénylpropanoïdes glycosides ou des

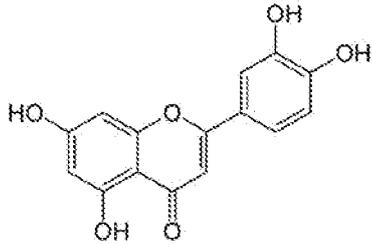
acides caféoylquiniques qui sont des dérivés de l'acide caféique.

- [0015] La demande WO2016/113659 décrit l'obtention d'un extrait d'origine végétale à partir de cellules végétales indifférenciées ou différenciées de *Leontopodium alpinum* comprenant une quantité avantageuse en phénylpropanoïdes glycosides dont les acides léontopodiques A et B.
- [0016] La demande WO2017/163174 décrit l'obtention d'un extrait d'origine végétale à partir de cellules végétales indifférenciées ou différenciées de *Marrubium vulgare* comprenant une quantité avantageuse en forsythoside B qui appartient aussi à la famille des phénylpropanoïdes glycosides.
- [0017] La demande WO2020/165365 décrit l'obtention d'un extrait d'origine végétale à partir de cellules végétales indifférenciées ou différenciées de *Buddlejadavidii* Franch. comprenant une quantité avantageuse en phénylpropanoïdes glycosides dont le verbascoside.
- [0018] Pour améliorer l'activité biologique et l'originalité des extraits, il est par ailleurs souvent proposé de stimuler la production par les cellules végétales des métabolites secondaires n'existant qu'en très faible quantité dans la biomasse par une élévation, par exemple chimique ou physique.
- [0019] La présente invention a pour but de proposer un nouveau procédé d'obtention par culture cellulaire végétale *in vitro* qui permette d'obtenir un extrait comprenant d'autres métabolites secondaires que ceux décrits dans l'état de la technique, ledit extrait présentant une activité biologique notamment cosmétique.
- [0020] A cet effet, selon un premier objet, la présente invention propose un procédé d'obtention d'un extrait d'origine végétale par culture végétale *in vitro*, comprenant à partir d'une lignée de cellules végétales indifférenciées ou différenciées les étapes suivantes successivement :
- [0021] - une étape de préculture, destinée à amplifier la biomasse desdites cellules végétales ;
- [0022] - une étape de culture en bioréacteur de ladite biomasse comprenant au moins une phase de prolifération ; et
- [0023] - une étape de traitement de la biomasse pour produire ledit extrait comprenant des métabolites secondaires d'intérêt ;
- [0024] caractérisé en ce qu'à l'étape de culture en bioréacteur au moins un flavonoïde aglycone est ajouté dans le milieu de culture.
- [0025] Avantageusement le procédé selon l'invention permet d'obtenir un nouvel extrait enrichi en métabolites secondaires d'une nouvelle classe. En effet, en fin de procédé on récupère un extrait végétal qui comprend dans ses métabolites secondaires un ensemble de flavonoïdes glycosylés. Par comparaison, un extrait végétal obtenu selon le procédé de l'art antérieur ne contient pas ce type de métabolites secondaires.

- [0026] De manière surprenante, les cellules végétales ont ainsi été capables d'intégrer le flavonoïde aglycone qui avait été ajouté dans le milieu de culture et de le métaboliser. Le flavonoïde aglycone a joué le rôle de précurseur.
- [0027] « Aglycone » signifie communément sans aucun radical osidique.
- [0028] Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'effet surprenant obtenu selon l'invention.
- [0029] Les flavonoïdes aglycones peuvent avoir révélé des voies métaboliques particulières qui étaient bien présentes mais qui n'étaient pas encore exprimées ou « ouvertes », faute de précurseurs. C'est en révélant et en stimulant ces voies métaboliques que les flavonoïdes aglycones ont été convertis en flavonoïdes glycosylés.
- [0030] Les flavonoïdes aglycones peuvent également avoir joué le rôle d'inducteurs épigénétiques capables d'envoyer des signaux à l'ADN des cellules permettant ainsi de générer et/ou mobiliser certaines enzymes particulières. Ces enzymes, responsables de la différenciation des cellules, ont ensuite induits l'ouverture de certaines voies métaboliques particulières.
- [0031] Enfin, les flavonoïdes aglycones pourraient avoir joué le rôle de sondes épigénétiques capables de déverrouiller certaines zones de lecture de l'ADN.
- [0032] Ces mécanismes peuvent avoir eu lieu seuls ou en combinaison permettant avantageusement d'offrir un effet cumulatif ou de synergie pour produire une composition en molécules d'intérêt particulièrement intéressante.
- [0033] Les flavonoïdes glycosylés ont un intérêt en cosmétique, en ce qu'ils sont capables d'améliorer ou d'embellir l'état général de la peau et des phanères. Ils sont connus pour leur propriété notamment antioxydante. La description détaillée donnée plus loin présente des exemples d'extraits obtenus selon le procédé de l'invention, ayant des propriétés cosmétiques tout à fait intéressantes à l'appui de tests *in vitro* et *in vivo*.
- [0034] De préférence selon l'invention, le flavonoïde aglycone ajouté à la biomasse est choisi parmi au moins une flavone aglycone et/ou un flavanone aglycone.
- [0035] De préférence, l'au moins une flavanone aglycone est choisie parmi la naringénine, l'ériodictyol et la butine, ou un mélange de celles-ci, et l'au moins une flavone aglycone comprend la lutéoline et l'apigénine, ou un mélange de celles-ci. De préférence encore selon l'invention, le flavonoïde aglycone ajouté à la biomasse est la naringénine et/ou la lutéoline. Ce sont ces deux flavonoïdes, chacun appartenant à une classe différente, qui sont exemplifiés dans la description détaillée.
- [0036] La naringénine est également connue sous le nom de naraginine, naringinine, naringétol ou 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphényl)chroman-4-one (C₁₅H₁₂O₅) et a pour formule développée :



[0037] La lutéoline est également connue sous le nom de lutéolol ou 5,7-dihydroxy-2-(3,4-dihydroxyphényl)-chromèn-4-one ($C_{15}H_{10}O_6$) et a pour formule développée :



[0038] Le choix du ou des flavonoïdes aglycones peut être réalisé en fonction des types des molécules glycosylées dérivées de ces flavonoïdes que l'on souhaite obtenir.

[0039] La quantité du ou des flavonoïdes aglycones à ajouter est déterminée en fonction de ce que les cellules végétales peuvent accepter et exploiter, dans un premier temps pour assurer une croissance rapide de la biomasse et dans un second temps pour permettre un rendement maximal de synthèse des métabolites secondaires, le tout sans avoir d'effet toxique pour les cellules.

[0040] L'ajout du flavonoïde aglycone est réalisé à l'étape de culture en bioréacteur, de préférence lors d'une phase exponentielle de croissance des cellules, de préférence encore lors de la phase exponentielle du dernier cycle de prolifération.

[0041] Par « cycle », on entend la période entre deux ajouts de milieu de culture frais dans le bioréacteur ou entre l'ajout de milieu de culture frais et la récupération des cellules (dernier cycle). Un cycle peut être répété plusieurs fois. Il sert à faire proliférer les cellules. Chaque cycle se déroule selon plusieurs phases déterminées par leurs vitesses de prolifération. Lors de la phase exponentielle, les cellules sont les plus actives et donc les plus aptes à métaboliser les flavonoïdes aglycones ajoutés au milieu de culture en un ensemble de dérivés glycosylés de ces flavonoïdes.

[0042] Selon une autre caractéristique de l'invention, une étape optionnelle d'élicitation peut être réalisée à l'étape de culture en bioréacteur, de préférence également lors d'une phase exponentielle de croissance des cellules, de préférence encore lors de la phase exponentielle du dernier cycle de prolifération, de préférence encore simultanément à l'ajout du flavonoïde aglycone.

[0043] La quantité d'éliciteur à ajouter est également choisie comme pour le flavonoïde aglycone, en fonction de ce que les cellules peuvent accepter et exploiter.

- [0044] D'une manière générale, l'élicitation des composés d'intérêt peut se faire par l'addition à la culture de fractions microbiennes (notamment des levures *Saccharomyces*) : l'addition à la culture de molécules d'origine biologique comme par exemple le chitosan, le jasmonate de méthyle, l'acide jasmonique et l'acide salicylique ; l'addition à la culture de molécules d'origine non biologique comme par exemple le paclobutrazol ; l'application à la culture d'une variation de température, de pH ou d'un stress osmotique induit par un sucre non métabolisable, comme par exemple le mannitol ; le recours à un appauvrissement encore plus drastique du milieu en macro-éléments et sucre ; l'addition à la culture de résines adsorbantes qui, en plus d'éliciter la production des composés d'intérêt, pourront les piéger.
- [0045] De préférence selon l'invention, l'éliciteur ajouté est le jasmonate de méthyle.
- [0046] De manière surprenante, la Demanderesse a remarqué que l'ajout de jasmonate de méthyle combiné à l'ajout de l'au moins un flavonoïde aglycone permet non seulement d'augmenter la concentration en métabolites secondaires qui n'étaient présents qu'en très faible quantité naturellement dans les cellules, comme l'acide rosmarinique, mais aussi d'augmenter encore la concentration en flavonoïdes glycosylés (voir résultats des analyses détaillés plus loin).
- [0047] Selon d'autres caractéristiques du procédé de l'invention, l'étape de traitement de la biomasse permettant de récupérer l'extrait selon l'invention après l'étape de culture comprend une étape classique de séparation pour éliminer le milieu de culture (le surnageant) et récupérer la biomasse cellulaire. Cette étape peut se faire par exemple par filtration ou centrifugation. La biomasse récupérée est constituée de cellules partiellement lysées ou entières, sous forme d'amas ou individuelles. Les métabolites secondaires d'intérêt, dont l'ensemble de flavonoïdes glycosylés se trouvent dans le contenu intracellulaire des cellules végétales de la biomasse récupérée.
- [0048] On obtient ainsi un extrait cellulaire selon l'invention qui contient les cellules entières ou partiellement lysées, plus précisément un extrait qui contient à la fois le contenu intracellulaire, comprenant les métabolites secondaires d'intérêt, et les parois et/ou débris cellulaires. Cet extrait peut être utilisé tel quel pour fabriquer une composition cosmétique, après avoir subi éventuellement un traitement supplémentaire pour casser les amas de cellules, notamment par homogénéisation sous haute pression ou toute autre technique appropriée. La composition selon l'invention peut être plus ou moins concentrée en extrait cellulaire, formant ainsi soit un ingrédient cosmétique, soit une formulation cosmétique finale destinée au consommateur pouvant être préparée à partir de cet ingrédient cosmétique.
- [0049] De façon optionnelle, l'étape de traitement peut comprendre une étape suivante de libération du contenu cellulaire hors des cellules végétales qui peut être effectuée selon les différents procédés connus qu'il est possible de combiner : à chaud, par macération,

broyage, décoction, infusion, pression, lixiviation, diffusion, distillation, séparation liquide/liquide, aux ultra-sons, aux micro-ondes, ou en lysant les cellules par tout procédé chimique ou physique approprié. Il est aussi possible d'extraire la biomasse avec un fluide supercritique ou subcritique.

- [0050] Selon l'invention, la libération du contenu intracellulaire contenant les métabolites secondaires d'intérêt est réalisée préférentiellement par diffusion osmotique ou par la lyse des cellules.
- [0051] La diffusion osmotique se fait en ajoutant à la biomasse un solvant pauvre en eau. De préférence selon l'invention, on ajoute du butylèneglycol, du propanediol, du propylèneglycol, du pentylèneglycol, du glycérol ou un mélange de ceux-ci. De préférence encore, on ajoute un glycérol.
- [0052] On obtient ainsi un extrait comprenant le contenu intracellulaire et des débris cellulaires. Cet extrait peut être utilisé tel quel pour fabriquer une composition cosmétique.
- [0053] De façon optionnelle encore, l'étape de traitement peut comprendre une étape suivante pour débarrasser l'extrait obtenu des débris cellulaires, par exemple par tout type de filtration ou centrifugation. Cette étape permet avantageusement d'obtenir un extrait purifié et limpide pouvant être utilisé à titre d'actif dans des compositions cosmétiques. L'extrait est plus transparent et présente des qualités avantageuses de formulation, comme la possibilité de préparer plus facilement des produits de type gel ou sérum.
- [0054] Selon une autre caractéristique particulière du procédé de l'invention, la lignée de cellules végétales utilisée à l'étape de pré-culture est préparée préférentiellement extemporanément.
- [0055] Une création de lignée cellulaire comprend les phases : 1) d'induction de cals (amas de cellules indifférenciées ou dédifférenciées), 2) de sélection des meilleurs cals et 3) d'optimisation sur les cals sélectionnés dans un milieu de culture.
- [0056] Le milieu de culture, liquide ou gélosé, comprend des macroéléments, des micro-éléments, des hormones, des vitamines et des sucres. Il est sélectionné pour favoriser la croissance et la production des molécules d'intérêt, à savoir des dérivés glycosylés des flavonoïdes aglycones ajoutés à l'étape de culture.
- [0057] De manière plus particulière :
- [0058] 1) L'induction de cals est réalisée en milieu de culture gélosé, et peut être effectuée avec toutes les parties de la plante, notamment feuille, fruit, racine, bourgeon, graine, tige, branche, tissu méristématiques et du cambium. De préférence, selon l'invention, la culture de cellules végétales est réalisée à partir des feuilles de la plante.
- [0059] 2) La sélection des meilleures lignées, avant un transfert en milieu de base liquide, est effectuée selon l'invention selon notamment les critères suivants : forte capacité

proliférative, texture tendre et friable, couleur homogène, bonne dispersion en milieu liquide et stabilité dans le temps de ces paramètres.

- [0060] 3) L'optimisation des caractéristiques de la croissance et de production des métabolites secondaires en milieu liquide pour les lignées sélectionnées passe par le choix des milieux les plus adaptés, dans un premier temps pour assurer une croissance rapide de la biomasse et dans un second temps pour permettre un rendement maximal de synthèse des métabolites primaires et secondaires par les cellules en fin de phase exponentielle (arrêt de la multiplication) afin de faciliter son passage en bioréacteur.
- [0061] Une lignée cellulaire ainsi préparée peut être utilisée directement ou bien conservée pour une utilisation ultérieure.
- [0062] Selon le procédé de l'invention, le milieu de culture, liquide ou gélosé, utilisé dans les différentes étapes comprend classiquement des macroéléments, des microéléments, des hormones, des vitamines et des sucres. Il est sélectionné pour favoriser la croissance et la production des molécules d'intérêt, à savoir selon l'invention des flavonoïdes glycosylés. Le milieu de culture peut aussi être sélectionné pour permettre la croissance d'autres métabolites secondaires par les cellules végétales, notamment ceux présents naturellement dans la lignée de cellules mais en très faible quantité, comme par exemple des acides caféiques classiques, notamment l'acide rosmarinique comme le montrent les exemples donnés plus loin. L'extrait obtenu comprendra de manière avantageuse tout un ensemble de métabolites secondaires pouvant agir de manière synergique et lui conférer des propriétés originales et nouvelles en cosmétique.
- [0063] Le procédé de l'invention peut être mis en œuvre en partant d'une lignée de n'importe quelle plante.
- [0064] La plante peut être choisie parmi les familles de plantes connues pour produire des extraits d'intérêt en cosmétique, notamment de la famille des *Lamiaceae*, des *Boraginaceae*, des *Nyctaginaceae*, des *Asteraceae* ou des *Apiaceae*, de préférence la famille des *Lamiaceae* et/ou des *Nyctaginaceae*.
- [0065] De préférence encore, la plante peut être choisie parmi les genres suivants : *Abronia*, *Acinos*, *Acleisanthes*, *Ajuga*, *Allionia*, *Andradea*, *Anulocaulis*, *Ballota*, *Belemia*, *Boerhavia*, *Bougainvillea*, *Calamintha*, *Caribea*, *Clinopodium*, *Colignonia*, *Commicarpus*, *Cyphomeris*, *Galeopsis*, *Glechoma*, *Guapira*, *Hyssopus*, *Lamium*, *Lavandula*, *Leucaster*, *Marrubium*, *Melissa*, *Melittis*, *Mentha*, *Mirabilis*, *Monarda*, *Neea*, *Nepeta*, *Nyctaginia*, *Ocimum*, *Okenia*, *Origanum*, *Orthosiphon*, *Perilla*, *Phaeoptilum*, *Pisonia*, *Pisoniella*, *Phlomis*, *Plectranthus*, *Prunella*, *Ramisia*, *Reichenbachia*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja*, *Stachys*, *Teucrium*, *Thymus*, *Tripterocalyx* et *Salpianthus*.
- [0066] De préférence encore selon l'invention, la plante est sélectionnée parmi les genres suivants : *Abronia*, *Allionia*, *Anulocaulis*, *Bougainvillea*, *Lavandula*, *Marrubium*,

Melissa, Mentha, Mirabilis, Monarda, Ocimum, Origanum, Orthosiphon, Perilla, Pisonia, Pisoniella, Prunella, Rosmarinus, Salvia, Satureja, et Thymus.

[0067] De préférence encore, la plante choisie appartient au genre *Monarda* et/ou *Lavandula*

[0068] Le genre *Monarda* appartient à la famille des *Lamiaceae* et comprend plusieurs espèces, dont celles connues :

[0069] *Monarda austroappalachiana, Monarda bartlettii, Monarda bradburiana, Monarda brevis, Monarda citriodora, Monarda clinopodia, Monarda clinopodioides, Monarda didyma, Monarda eplingiana, Monarda fistulosa, Monarda fruticulosa, Monarda humilis, Monarda lindheimeri, Monarda luteola, Monarda maritima, Monarda media, Monarda pectinata, Monarda pringlei, Monarda punctata, Monarda russeliana, Monarda stanfieldii, Monarda viridissima.*

[0070] La Demanderesse s'est plus particulièrement intéressée à l'espèce *Monarda didyma*.

[0071] *Monarda didyma* est une plante mellifère, nectarifère, aromatique et comestible originaire de l'est de l'Amérique du Nord. La monarde, originalement décrite par Nicolas Monardes, est aussi connue sous le nom de thé d'Oswego, mais aussi Mélisse d'Or ou Bee Balm. Les Amérindiens employaient des macérations de feuilles dans l'huile pour les soins des cheveux ou pour leur pouvoir antiseptique sur les boutons, ou pour combattre le rhume.

[0072] Le genre *Lavandula* appartient également à la famille des *Lamiaceae* et comprend plusieurs espèces, dont celles connues : *Lavandula x alportelensis, Lavandula angustifolia, Lavandula antineae, Lavandula aristibracteata, Lavandula atriplicifolia, Lavandula austroapennina, Lavandula bipinnata, Lavandula bramwellii, Lavandula buchii, Lavandula x cadevallii, Lavandula canariensis, Lavandula x cavanillesii, Lavandula citriodora, Lavandula coronopifolia, Lavandula dentata, Lavandula dhofarensis, Lavandula erythraeae, Lavandula galgalloensis, Lavandula gibsonii, Lavandula x ginginsii, Lavandula hasikensis, Lavandula x heterophylla, Lavandula x intermedia, Lavandula lanata, Lavandula latifolia, Lavandula x limae, Lavandula x losae, Lavandula macra, Lavandula mairei, Lavandula maroccana, Lavandula minutolii, Lavandula multifida, Lavandula nimmoi Benth, Lavandula nooruddinii, Lavandula pedunculata, Lavandula pinnata, Lavandula pubescens, Lavandula qishnensis, Lavandula rejdalii, Lavandula rotundifolia, Lavandula saharica, Lavandula samhanensis, Lavandula setifera, Lavandula somaliensis, Lavandula stoechas, Lavandula sublepidota, Lavandula subnuda, Lavandula tenuisecta, Lavandula viridis.*

[0073] La Demanderesse s'est plus particulièrement intéressée aussi à l'espèce *Lavandula angustifolia*.

[0074] *Lavandula angustifolia* est une plante appréciée pour son odeur. Elle est également connue sous le nom de Lavande officinale, Lavande vraie ou Lavande à feuilles

étroites. La fleur est généralement utilisée pour obtenir de l'huile essentielle aux multiples vertues telles qu'anti-inflammatoire, antiseptique, cicatrisant et antibactérien.

- [0075] Selon d'autres caractéristiques plus particulières encore du procédé.
- [0076] Concernant l'étape de pré-culture, la lignée cellulaire sélectionnée est multipliée pour obtenir une quantité suffisante de biomasse de cellules indifférenciées ou dédifférenciées afin d'effectuer l'étape de production à grande échelle, c'est-à-dire l'étape de culture en bioréacteur.
- [0077] Les sous-étapes suivantes sont mises en œuvre :
- [0078] a) Inoculation de la lignée sélectionnée dans un milieu de culture liquide et culture pendant un temps suffisant pour obtenir une quantité de biomasse multipliée par 2 voire 3 fois par rapport à la biomasse d'origine. Cette première étape est réalisée en fiole d'une contenance comprise entre 0,5L et 2L ;
- [0079] b) De façon optionnelle, transfert de tout ou partie de la suspension obtenue en a) dans un milieu de culture liquide frais et à nouveau culture pendant un temps suffisant pour obtenir une quantité biomasse multipliée par 2 voire 3 fois par rapport à la quantité de biomasse en début de cycle.
- [0080] Cette étape b) constitue un cycle, qui peut être répété plusieurs fois.
- [0081] c) De façon optionnelle, répétition de l'étape b).
- [0082] Concernant l'étape de culture en bioréacteur, les meilleures lignées cellulaires stabilisées à l'étape de pré-culture sont transférées dans le bioréacteur contenant un milieu de culture liquide pour prolifération des cellules. Les étapes b) et c) réalisées pour la pré-culture sont réitérées dans un contenant ayant un volume adapté à la biomasse.
- [0083] C'est lors de la phase exponentielle de prolifération du dernier cycle, soit environ entre 7 et 12 jours après la dernière initiation de la culture en bioréacteur, que l'ajout du ou des flavonoïdes aglycones est préférentiellement réalisé.
- [0084] La culture est arrêtée quand le niveau voulu de métabolites secondaires est atteint, soit de préférence environ entre 2 à 7 jours après l'ajout des flavonoïdes aglycones. Pour atteindre ce niveau, on utilise, le cas échéant, comme on l'a vu plus haut, un milieu de culture.
- [0085] Selon le procédé de l'invention, ce milieu de culture, liquide ou gélosé, utilisé dans les étapes de pré-culture ou de culture comprend classiquement des macroéléments, des microéléments, des hormones, des vitamines et des sucres. Il est sélectionné pour favoriser la croissance et la production des molécules d'intérêt, à savoir selon l'invention au moins des flavonoïdes glycosylés. Le milieu de culture peut aussi être sélectionné, comme vu ci-dessus, pour permettre la croissance d'autres métabolites secondaires par les cellules végétales, notamment ceux présents naturellement dans la lignée de cellules mais en très faible quantité, comme par exemple des acides caféiques classiques, notamment l'acide rosmarinique comme le montrent les exemples donnés

plus loin. L'extrait obtenu comprendra de manière avantageuse tout un ensemble de métabolites secondaires pouvant agir de manière synergique et lui conférer des propriétés originales et nouvelles en cosmétique.

- [0086] Concernant l'étape de traitement de la biomasse, la récupération de la biomasse fabriquée dans le bioréacteur est réalisée après un temps de culture de 7 à 21 jours, de préférence de 10 à 14 jours, de sorte de permettre avantageusement de produire la plus forte quantité de biomasse et avec une grande viabilité.
- [0087] Une étape supplémentaire de séchage, notamment une lyophilisation, de la biomasse cellulaire récupérée et débarrassée du surnageant, peut-être réalisée, l'avantage étant de pouvoir ainsi conserver la biomasse sous une forme plus stable à long terme. La biomasse séchée peut être réhydratée ou rediluée pour son utilisation ultérieure, extemporanément.
- [0088] Une dernière étape de purification poussée de l'extrait cellulaire pour le débarrasser de ses débris est possible par toutes les méthodes disponibles industriellement, par partage liquide-liquide ou chromatographie, notamment à l'aide d'une résine adsorbante, afin de concentrer les molécules d'intérêt tel que l'ensemble des dérivés des flavonoïdes glycosylés fabriqué par les cellules.
- [0089] Selon un deuxième objet, la présente invention propose un extrait végétal susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention et tel que décrit ci-dessus.
- [0090] L'extrait selon l'invention est caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir d'une plante de la famille des *Lamiaceae* et en ce qu'il comprend des flavonoïdes glycosylés en tant que métabolites secondaires.
- [0091] L'extrait obtenu à partir de *Monarda didyma* comprend notamment en tant que métabolites secondaires, un ensemble de flavonoïdes glycosylés dérivés des flavonoïdes aglycones ajoutés. De préférence, les flavonoïdes aglycones ajoutés font partie de la famille des flavanones aglycones, de préférence encore la naringénine.
- [0092] L'extrait obtenu à partir de *Lavandula angustifolia* comprend en tant que métabolites secondaires, un ensemble de flavonoïdes glycosylés dérivés des flavonoïdes aglycones ajoutés. De préférence, les flavonoïdes aglycones ajoutés font partie de la famille des aglycones flavoniques, de préférence encore la lutéoline.
- [0093] Ainsi, les cellules végétales indifférenciées ou différenciées obtenues et/ou l'extrait ainsi obtenus peuvent être utilisés pour la fabrication d'un ingrédient actif pour une composition cosmétique ou dermatologique destinée à améliorer l'état général de la peau et des phanères.
- [0094] Selon un troisième objet, la présente invention propose une composition notamment cosmétique comprenant un extrait selon le deuxième objet en tant qu'actif et un milieu physiologiquement acceptable.
- [0095] Par « milieu physiologiquement acceptable » on entend selon la présente invention,

sans être limitatif, une solution aqueuse ou hydroalcoolique, une émulsion eau dans huile, une émulsion huile dans eau, une microémulsion, un gel aqueux, un gel anhydre, un sérum, une dispersion de vésicules, une poudre.

- [0096] « Physiologiquement acceptable » signifie que les compositions conviennent à une utilisation topique en contact avec les muqueuses, les ongles, le cuir chevelu, les cheveux, les poils et la peau de mammifère et plus particulièrement humaine, sans risque de toxicité, d'incompatibilité, d'instabilité, de réponse allergique, et autres.
- [0097] Ce « milieu physiologiquement acceptable » forme ce que l'on appelle classiquement l'excipient de la composition.
- [0098] De préférence selon l'invention, le milieu physiologiquement acceptable peut être un milieu aqueux, hydroglycolique ou hydroalcoolique, ou formé par une émulsion eau dans huile, une émulsion huile dans eau, ou une microémulsion. De préférence encore, il est hydroglycolique. De préférence encore, le milieu physiologiquement acceptable est un mélange d'eau et de glycérine.
- [0099] Ainsi, la présente invention permet l'embellissement ou l'amélioration de l'apparence et de l'état général de la peau et/ou des phanères et d'en traiter les imperfections, grâce à l'application topique sur la peau d'une quantité efficace d'au moins un extrait selon l'invention et/ou d'une composition en comprenant, dans un excipient physiologiquement acceptable, chez un sujet qui en a besoin.
- [0100] Selon un quatrième objet, la présente invention propose l'utilisation de l'extrait selon le deuxième objet et/ou d'une composition selon le troisième objet pour un traitement cosmétique non thérapeutique de la peau et de ses annexes. De manière préférentielle selon l'invention, le traitement est topique.
- [0101] Plusieurs phénomènes influent sur la qualité de la peau et plusieurs paramètres la font apparaître moins homogène, par exemple les rides et ridules, la sécheresse, la perte d'élasticité et les hétérogénéités de pigmentation. Des traitements esthétiques permettent de faire disparaître ou de masquer certaines de ces imperfections cutanées, permettant d'embellir la peau en la rendant plus homogène.
- [0102] Des résultats de tests *in vitro* et *in vivo* sont donnés plus loin dans la description démontrant des activités cosmétiques bénéfiques pour la peau et ses annexes pour deux exemples d'extraits réalisés selon le procédé de l'invention à partir de lignées de *Monarda didyma* et de *Lavandula angustifolia*.
- [0103] Ces effets cosmétiques peuvent être envisagés selon l'invention séparément ou de manière combinée, permettant de façon avantageuse notamment de proposer une utilisation associant des effets embellissant et sensoriels.
- [0104] Selon l'invention, par « traitement topique » ou « utilisation topique » on entend une application qui est destinée à agir à l'endroit où elle est appliquée : peau, muqueuse et/ou phanères.

- [0105] La présente invention propose de façon préférentielle une utilisation d'un extrait selon l'invention issu de cellules végétales du genre *Monarda*, et plus particulièrement *Monarda didyma*, pour au moins un traitement choisi parmi :
- [0106] - un traitement anti-vieillesse ; et/ou
- [0107] - un traitement anti-séborrhéique ; et/ou
- [0108] - un traitement hydratant ; et/ou
- [0109] - un traitement renforcement de la barrière cutanée ; et/ou
- [0110] - un traitement amincissant ; et/ou
- [0111] - un traitement apaisant.
- [0112] Plus particulièrement, le traitement anti-vieillesse proposé est adapté à agir sur les défauts de pigmentation de la peau et plus particulièrement selon l'invention, le traitement anti-vieillesse est adapté avantageusement à traiter les taches de vieillesse blanches et/ou brunes de la peau.
- [0113] Au cours du vieillissement de la peau, deux phénomènes opposés provoquent des taches brunes et des taches blanches souvent jugées inesthétiques. Les taches brunes sont dues à une hyperpigmentation alors que les taches blanches sont dues à une hypopigmentation.
- [0114] Par « hyperpigmentation », on entend selon la présente invention, une tache riche en pigment(s) qui est la conséquence de la production de mélanine en quantité excessive au niveau de certaines zones cutanées.
- [0115] *A contrario*, par « hypopigmentation », on entend selon la présente invention, une tache dépourvue de pigment.
- [0116] Ces taches ont pour conséquence un aspect inesthétique non homogène de la couleur de la peau.
- [0117] La pigmentation de la peau trouve son origine dans une cellule bien particulière appelée mélanocyte. Cette cellule est responsable de la production des pigments cutanés, la mélanine.
- [0118] Avec le vieillissement et/ou une surexposition au soleil, les mélanocytes eux aussi, vieillissent, et ne sont plus aussi performants. Ils sont moins nombreux, de moins bonne qualité et se répartissent de façon inhomogène. C'est cette répartition inhomogène qui est responsable des taches brunes et blanches, signe d'une peau vieillissante.
- [0119] Des résultats de tests *in vitro* sont donnés plus loin dans la description sur cette activité particulière permettant d'améliorer l'homogénéité de la couleur de la peau, notamment pour :
- [0120] - prévenir et/ou traiter la perte de pigmentation de la peau, notamment en vue de prévenir et/ou traiter les zones où il y a des taches blanches cutanées ; et/ou
- [0121] - prévenir et/ou traiter l'hyperpigmentation de la peau, notamment en vue de prévenir

et/ou traiter les zones où il y a des taches brunes cutanées.

[0122] Les tests *in vitro* montrent que l'extrait de *Monarda didyma* selon l'invention est adapté à agir sur plusieurs axes :

[0123] - conserver l'homéostasie et le capital jeunesse des mélanocytes en inhibant les effets oxydants et radicalaires connus pour accélérer le vieillissement des cellules ;

[0124] - maintenir en bon état l'environnement proche des mélanocytes en diminuant la production des protéases responsables de la destruction des protéines matricielles telles que les collagènes et l'élastine, et en augmentant la synthèse des éléments essentiels au maintien de l'homéostasie des kératinocytes et mélanocytes tels que les collagènes -I, -IV, -VII et -XVII mais aussi l'élastine, les laminines et l'acide hyaluronique. En effet, la physiologie des mélanocytes est étroitement liée aux signaux venant des cellules voisines épidermiques telles que les kératinocytes et les fibroblastes. De même, la matrice extracellulaire périphérique de ces mélanocytes forme un micro-environnement qui influence nettement les productions de celles-ci ;

[0125] - maintenir le bon fonctionnement des mélanocytes et inhiber leur entrée en sénescence en augmentant la longueur des dendrites des mélanocytes qui distribuent la mélanine aux kératinocytes et la quantité de mélanocytes en forme de fuseau qui est un critère de jeunesse des cellules observées, et en inhibant la sénescence des mélanocytes en diminuant la présence de l'enzyme SA β -GAL (« senescence-associated beta-galactosidase ») fortement présente dans les cellules sénescents, la quantité de DDK1 identifiée comme pro-sénescence du mélanocyte, et la production d'IL-6 et d'IL-8 qui font partie des molécules dont la sécrétion est augmentée par les cellules sénescents par rapport à des cellules jeunes.

[0126] Une étude *in vivo* donnée plus loin vient aussi confirmer cette activité particulièrement intéressante et originale sur l'ensemble des taches de sénescence.

[0127] La présente invention propose également de façon préférentielle une utilisation d'un extrait selon l'invention du genre *Lavandula* ou d'une composition selon l'invention le contenant, pour au moins un traitement choisi parmi :

[0128] - un traitement anti-vieillessement ; et/ou

[0129] - un traitement hydratant ; et/ou

[0130] - un traitement apaisant.

[0131] Des résultats de tests *in vitro* et *in vivo* sont donnés plus loin dans la description démontrant les activités cosmétiques bénéfiques pour la peau et ses annexes.

[0132] L'extrait selon l'invention peut être associé à un ou plusieurs autres ingrédients actifs à des concentrations efficaces pouvant agir de façon synergique ou en renfort pour atteindre les effets souhaités décrits pour l'invention, tels que les agents suivants : filtrant les radiations, notamment UVA,UVB, IR, issues de la lumière bleue, hydratant, calmant, myorelaxant, amincissant, restructurant, raffermissant, repulpant, tenseur,

agissant sur la microcirculation, agissant sur l'inflammation, sur les radicaux libres, vitamines, anti-rides, etc.

- [0133] De manière plus particulière, pour améliorer ou embellir l'état général de la peau, l'extrait selon l'invention peut être combiné, sans que cette liste ne soit exhaustive, avec un ou plusieurs actifs :
- [0134] - Hydratant et nourrissant, par exemple le Vegesome Moist 24™ (Sederma) : ingrédient actif contenant une poudre composée de particules creuses de *Lycopodium clavatum* chargées avec un extrait d'*Imperata cylindrica*, qui hydrate progressivement l'épiderme ; et/ou
- [0135] - Pigmentant, par exemple Silverfree™ (Sederma) ingrédient actif contenant le peptide Pal-PP qui stimule plusieurs étapes du processus de pigmentation, et/ou le peptide Pal-PA et/ou de manière générale les peptides ayant une activité pro-pigmentante décrits dans la demande de brevet de la Demanderesse WO2014/080376, et/ou TYR-OL™ et TYR-EXCEL™ proposées par Sederma et décrits respectivement dans les brevets FR2702766 et WO03/017966, à base d'oleyl tyrosine, et/ou un ou plusieurs des dérivés de noreugénine glycoside décrits par UNIVERSITY HAMBURG et MERCK dans la demande de brevet WO2017/121445, et/ou la dihydroxyacétone, et/ou un ou plusieurs dérivés de la famille des chromen-4-one décrits par MERCK dans la demande de brevet WO2007/087956 ; et/ou les composés à base de pyrazolin-4,5-diones décrits par l'OREAL dans la demande de brevet WO97/35842 ; et/ou
- [0136] - Prévenant les signes du photovieillement, par exemple le Venuceane™ (Sederma) : ingrédient actif contenant un extrait biotechnologique de *Thermus thermophilus*, qui prévient des signes visibles du photovieillement (taches, rides, sécheresse...), protège les structures cellulaires des dommages engendrés par les UV et renforce l'intégrité de la peau ; et/ou
- [0137] - Tenseur de la peau, par exemple Feminage™ (Sederma) : ingrédient actif contenant un extrait d'*Engelhardia chrysolepsis* qui offre des propriétés élastiques et raffermissantes à la peau ; et/ou
- [0138] - Anti-pollution, par exemple Citystem™ (Sederma) : ingrédient actif contenant un extrait biotechnologique de *Marrubium vulgare*, qui rend la peau douce et lisse, affine le grain de la peau, atténue la visibilité des comédons tout en laissant la peau radieuse et purifiée.
- [0139] Des exemples détaillés sont donnés dans la partie formulation ci-dessous.
- [0140] Une composition selon l'invention peut être appliquée sur le visage, le corps, le décolleté, le cuir chevelu, les cheveux, les cils, les poils, sous n'importe quelle forme ou véhicules connus de l'homme de l'art, notamment sous forme de solution, de dispersion, d'émulsion, de pâte ou de poudre, individuellement ou en pré-mélange ou être véhiculée individuellement ou en pré-mélange par des vecteurs comme les macro-

capsules, les microcapsules ou les nanocapsules, les macrosphères, les microsphères, ou les nanosphères, les liposomes, les oléosomes ou les chylomicrons, les macro-particules, les microparticules ou les nanoparticules, macroéponges, les microéponges ou les nanoéponges, les microémulsions ou les nanoémulsions, les séquestrants ou adsorbé sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites, spores ou exines et autres supports minéraux ou organiques.

- [0141] En cosmétique notamment, des applications peuvent être proposées notamment dans les gammes de soins de la peau du visage, du corps, des cheveux et des poils et des gammes de maquillages-soins.
- [0142] La composition peut être incorporée sur un matériau non tissé ou tissé, en fibres naturelles ou synthétiques, laine, ou sur tout matériau destiné à entrer en contact avec la peau et qui peut être employé dans l'habillement, notamment collants et chaussettes, shorty, sous-vêtements de jour ou de nuit, les mouchoirs, ou les tissus, afin d'exercer son effet cosmétique par l'intermédiaire de ce contact peau/textile et permettre une délivrance topique continue (cosmétotextiles).
- [0143] Selon l'invention, il est ainsi aussi proposé un matériau tissé ou non-tissé comprenant l'extrait selon l'invention pour une utilisation dans un traitement cosmétique non-thérapeutique topique.
- [0144] Les formules cosmétiques peuvent entrer dans des gammes de produits personnels de soin et/ou de produits de beauté notamment des gammes de soins de la peau, de nettoyage, maquillage, démaquillage, anti-solaire, bronzage artificiel, pré-rasage, rasage, ou après-rasage, hydratant, humectant, émollient, conditionnant, exfoliant, astringent, dépilatoire, anti-transpirant ou antiperspirant, déodorant, désodorisant, etc.
- [0145] Le Personal Care Products Council (« International cosmetic ingredient dictionary & handbook » publié par « the Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Inc. », Washington, D.C.) décrit une grande variété, sans limitation, d'ingrédients cosmétiques et pharmaceutiques habituellement utilisés dans l'industrie du soin de la peau, qui conviennent pour être utilisés comme ingrédients additionnels dans les compositions selon la présente invention, tant qu'ils sont physiquement et chimiquement compatibles avec les autres ingrédients de la composition et spécialement avec les actifs de la présente invention. Par ailleurs la nature de ces ingrédients additionnels ne doit pas altérer les bénéfices des actifs de l'invention. Ces ingrédients additionnels peuvent être synthétiques ou naturels comme par exemple les extraits de plantes ou venir d'un procédé de biofermentation.
- [0146] D'autres actifs de soin de la peau qui sont particulièrement utiles en combinaison avec la composition selon l'invention peuvent être trouvés dans la documentation commerciale de Sederma et sur le site www.sederma.fr, dans la documentation commerciale de Crodarom et d'Alban Muller International, et sur le site www.croda.fr.

- [0147] On peut aussi citer à titre d'exemples les actifs commerciaux suivants : la bêtaïne, le glycérol, l'Actimoist Bio 2™ (Active organics), AquaCacteen™ (Mibelle AG Cosmetics), Aquaphyline™ (Silab), AquaregulK™ (Solabia), Carciline™ (Greentech), Codiavelane™ (Biotech Marine), Dermaflux™ (Arch Chemicals, Inc), Hydra'Flow™ (Sochibo), Hydrom moist L™ (Symrise), RenovHyal™ (Soliance), Seamoss™ (Biotech Marine), Argireline™ (nom commercial de l'acétyl hexapeptide-3 de Lipotec), le spilanthol ou un extrait d'Acmella oleracea connu sous le nom Gatuline Expression™, un extrait de Boswellia serrata connu sous le nom Boswellin™, Deepaline PVB™ (Seppic), Syn-AKE™ (Pentapharm), Ameliox™, Bioxilift™ (Silab), PhytoCellTec™ Argan (Mibelle), Papilactyl D™ (Silab), Preventhelia™ (Lipotec), ou l'un ou plusieurs des ingrédients actifs suivants vendus par Sederma : Subliskin™, Venuceane™, Moist 24™, Vegesome Moist 24™, Essenskin™, Juvinity™, Revidrat™, Resistem™, Chronodyn™, Kombuchka™, Chromocare™, Calmosensine™, Glycokin factor S™, Biobustyl™, Idealift™, Ceramide 2™, Ceramide A2™, Ceramide HO3™, Legance™, Intenslim™, Prodizia™, Beautifeye™, Pacifeel™, Zingerslim™, Meiritage™, Sebulesse™, Apiscalp™, Rubistem™, Citystem™, Neonyca™, NG Insaponifiables de Beurre de Karité™, Majestem™, Hydronesis™, Poretect™, Amberstem™, Synchronolife™, Feminage™, Sylverfree™, Ameyezing™, Revitalide™ ou des mélanges de ceux-ci.
- [0148] Parmi les extraits de plante (sous la forme d'extraits classiques ou préparés par une méthode *in vitro*) pouvant être utilisés comme actifs additionnels, on peut mentionner, en outre et en particulier, les extraits de lierre, par exemple de lierre grimpant (*Hedera helix*), de *Bupleurum chinensis*, de *Bupleurum falcatum*, d'arnica (*Arnica montana* L.), de romarin (*Rosmarinus officinalis* N.), de souci (*Calendula officinalis*), de sauge (*Salvia officinalis* L.), de ginseng (*Panax ginseng*), de *ginko biloba*, de millepertuis (*Hypericum perforatum*), de fragon (*Ruscus aculeatus* L.), d'ulmaire (*Filipendula ulmaria* L.), d'orthosiphon (*Orthosiphon stamincus* Benth.), d'artichaut (*Cynara scolymus*), d'algues (*Fucus vesiculosus*), de bouleau (*Betula alba*), de thé vert, de noix de cola (*Cola nipida*), de marronniers d'Inde, de bambou, *Centella asiatica*, de bruyère, fucus, saule, piloselle, les extraits d'escine, les extraits de cangzhu, les extraits de *Crysanthellum indicum*, de plantes du genre *Armeniacea*, *Atractylodis platicodon*, *Sinnomenum*, *pharbitidis*, *Flemingia*, de *Coleus* comme *C. forskohlii*, *C. blumei*, *C. esquirolii*, *C. scutellaroides*, *C. xanthantus* et *C. barbatus*, comme un extrait de racines de *Coleus barbatus*, des extraits de Ballote, Guioa, *Davallia*, *Terminalia*, *Barringtonia*, *Trema*, *Antirobia*, *Cecropia*, *Argania*, *Dioscoreae* comme *Dioscorea opposita* ou mexicain, des extraits de *Ammi visnaga*, de *Siegesbeckia*, en particulier *Siegesbeckia orientalis*, des extraits végétaux de la familles des *Ericaceae*, en particulier des extraits de myrtilles (*Vaccinium angustifolium*) de *Arctostaphylos uva ursi*, *Aloe vera*, de

plantes contenant des stérols (notamment des phytostérols), de *Manjistha* (extrait de plantes du genre *Rubia*, en particulier *Rubia cordifolia*), de Guggal (extrait de plantes du genre *Commiphora*, en particulier *Commiphora mukul*), un extrait de kola, camomille, trèfle violet, de *Piper methysticum* (Kava Kava de Sederma), de *Bacopa monieri* (Bacocalmine™, Sederma) et de fouet de mer, de *Glycyrrhiza glabra*, de mûrier, de melaleuca (arbre à thé), de *Larrea divaricata*, de *Rabdosia rubescens*, de *Euglena gracilis*, de *Fibraurea recisa hirudinea*, de *Chaparral sorghum*, de fleur de tournesol, d'*Enantia chlorantha*, de Mitracarpe du genre *Spermacoceae*, de *Buchu barosma*, de *Lawsonia inermis* L., d'*Adiantum capillus-veneris* L., de *Chelidonium majus*, de *Luffa cylindrica*, de « Japanese Mandarin » (*Citrus reticulata* blanco var. unshiu), de *Camelia sinensis*, de *Imperata cylindrical*, de *Glaucium flavum*, de *Cupressus sempervirens*, de *Polygonatum multiflorum*, de *Lovely hemsleya*, de *Sambucus nigra*, de *Phaseolus lunatus*, de *Centaurium*, de *Macrocystis pyrifera*, de *Turnera diffusa*, de *Anemarrhena asphodeloides*, de *Portulaca pilosa*, d'*Humulus lupulus*, de café Arabica, d'*Ilex paraguariensis*, de *Globularia cordifolia*, d'*Oxydendron arboreum*, d'*Albizzia julibrissin*, de *Zingiber zerumbet* smith, d'*Astragalus membranaceus*, d'*Atractylodes macrocephalae*, de *Plantago lanceolata*, de *Leontopodium alpinum* (ou eldelweiss), de *Mirabilis jalapa*, d'*Apium graveolens*, de *Marrubium vulgare*, *Buddleja davidii* Franch., *Syringa vulgaris*, *Engelhardia chrysolepsis* ou d'orchidées.

- [0149] Les compositions selon la présente invention peuvent comprendre des peptides, incluant, sans se limiter, les, di-, tri-, tetra-, penta- et hexapeptides et leurs répétitions et dérivés. Selon un mode de réalisation particulier, la concentration du peptide additionnel, dans la composition, varie entre $1 \times 10^{-7}\%$ et 20%, de préférence entre $1 \times 10^{-6}\%$ et 10%, préférentiellement entre $1 \times 10^{-5}\%$ et 5%, en poids.
- [0150] Dans le cadre de la présente invention, le terme « peptide » désigne ici les peptides contenant 20 acides aminés ou moins, leurs dérivés, isomères et complexes avec d'autres espèces telles qu'un ion métal (par exemple : cuivre, zinc, manganèse, magnésium, et autres). Le terme « peptides » se réfère à la fois à des peptides naturels et à des peptides de (bio)synthèse. Il se réfère également à des compositions qui contiennent des peptides et qui se rencontrent dans la nature et/ou qui sont commercialement disponibles.
- [0151] Des exemples non limitatifs de dipeptides utilisables dans le cadre de la présente invention, comprennent la Carnosine (β -AH), YR, VW, NF, DF, KT, KC, CK, KP, KK, TT, PA, PM ou PP.
- [0152] Des exemples non limitatifs de tripeptides comprennent RKR, HGG, GHK, GKH, GGH, GHG, KFK, KAvaK, K β AK, KAbuK, KAcaK, KPK, KMOK, KMO2K, PPL, PPR, SPR, QPA, LPA ou SPA. On peut également citer des exemples non limitatifs de

tripeptides contenant :

- [0153] - une proline greffée sur la lysine comme K(P)HG ou K(P)GH ; ou
- [0154] - un acide proglutamique greffée à une lysine comme K(Pyr)HG ou K(Pyr)GH ; ou
- [0155] - une lysine acétylée comme le K(Ac)HG ou K(Ac)GH.
- [0156] Des exemples non limitatifs de tétrapeptides sont KTFK (SEQ ID NO : 1), GQPR (SEQ ID NO : 2), RSRK (SEQ ID NO : 3), KTAK (SEQ ID NO : 4), KAYK (SEQ ID NO : 5), KFYK (SEQ ID NO : 6), ou TKPR (SEQ ID NO : 7).
- [0157] Un exemple non limitatif de pentapeptide est le KTTKS (SEQ ID NO : 8) et KTSKS (SEQ ID NO : 9) et des exemples d'hexapeptides sont le GKTTKS (SEQ ID NO : 10) et VGVAPG (SEQ ID NO : 11).
- [0158] D'autres peptides utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être choisis parmi, sans que cette liste soit limitative : les dérivés lipophiles de peptides, de préférence les dérivés oléoyl, palmitoyl et myristoyl, et les complexes avec les ions métal mentionnés plus haut (par exemple : complexe cuivre du tripeptide HGG).
- [0159] Les dipeptides préférés comprennent par exemple le N-Palmitoyl-β-Ala-His, N-Acetyl-Tyr-Arg-hexadecylester (Calmosensine™, Idealift™, Sederma), le Pal-KT, le Pal-RT, le Pal-PP et le Pal-PA (Sederma).
- [0160] Les tripeptides préférés comprennent notamment le dérivé cuivre de HGG (Lamin™, Sigma), le Pal-GHK et Pal-GKH (Sederma), la lipospondin (N-Elaidoyl-KFK) et ses analogues de substitution conservative, N-Acetyl-RKR-NH₂(Peptide CK+), le Pal-KavaK, le Pal-KβAlaK, le Pal-KAbuK, le Pal-KAcaK, le Pal-KMO₂K (Matrixyl®synthe'6®, Sederma), le Pal-KVK (Syn-Coll™, DSM), le N-Biot-GHK (Sederma) et leurs dérivés.
- [0161] On peut également citer ici les tripeptides anti-âges de formule générale X-Pro*-Pro*-Xaa-Y décrits dans la demande WO2015/181688 avec Xaa choisi parmi Leu, Arg, Lys, Ala, Ser, et Asp, en extrémité N terminale, X choisi parmi H, -CO-R¹ et -SO₂-R¹ et en extrémité C terminale, Y choisi parmi OH, OR¹, NH₂, NHR¹ ou NR¹R², R¹ et R² étant, indépendamment l'un de l'autre, choisis parmi un groupement alkyle, aryle, aralkyle, alkylaryle, alkoxy et aryloxy, pouvant être linéaire, ramifié, cyclique, polycyclique, insaturé, hydroxylé, carbonylé, phosphorylé et/ou soufré, ledit groupement pouvant posséder dans son squelette un hétéroatome notamment O, S et/ou N, et Pro* correspondant à la Proline, un analogue ou un dérivé de celle-ci ; comprenant par exemple le Myr-PPL-OH et le Myr-PPR-OH. On peut également citer encore ici les dipeptides et tripeptides pro-pigmentants et/ou pro-collagène de formule générale X-(Xaa₁)_n-Pro*-Xaa₂-Y décrits dans la demande WO2014/080376, avec n=0, 1 ou 2, Xaa₁ un aminoacide hydrophobe choisi parmi Ala, Val, Met, Leu, Iso, Phe, Pro, et les analogues ou dérivés de ceux-ci ; ou un aminoacide polaire choisi parmi Ser, Thr, Tyr, Asp, Glu et les dérivés et analogues de ceux-ci ; et lorsque n=2 les

deux aminoacides Xaa₁ pouvant être identiques ou différents ; Xaa₂ un aminoacide hydrophobe choisi parmi Ala, Val, Met, Leu, Iso, Phe, et les analogues ou dérivés de ceux-ci ; un aminoacide basique choisi parmi Arg, Lys, His, et les dérivés et analogues de ceux-ci ; en extrémité N terminale du peptide, X est choisi parmi H, -CO-R¹ et -SO₂-R¹ ; en extrémité C terminale du peptide, Y est choisi parmi OH, OR¹, NH₂, NHR¹ ou NR¹R², R¹ et R² étant, indépendamment l'un de l'autre, choisis parmi un groupement alkyle, aryle, aralkyle, alkylaryle, alkoxy et aryloxy, pouvant être linéaire, ramifié, cyclique, polycyclique, insaturé, hydroxylé, carbonylé, phosphorylé et/ou soufré, ledit groupement pouvant posséder dans son squelette un hétéroatome notamment O, S et/ou N ; Pro* correspondant à la Proline, un analogue ou un dérivé de celle-ci ; comprenant par exemple les peptides Pal-SPR-OH, Pal-PPR-OH, Pal-QPA-OH, Pal-LPA-OH, Myr-SPA-OH, Pal-PM-OH, Pal-PA-OH et Pal-PP-OH.

- [0162] Des dérivés térapeptides pouvant être utilisés dans le cadre de la présente invention comprennent, sans y être limités, le Ela-KTAK (SEQ ID NO : 12), le Ela-KAYK (SEQ ID NO : 13), le Ela-KFYK (SEQ ID NO : 14), le Pal-GQPR (SEQ ID NO : 15) ou le Pal-KTFK (SEQ ID NO : 16).
- [0163] Des dérivés pentapeptides utilisables sont, sans y être limités, le Pal-KTTKS (SEQ ID NO : 17) (MATRIXYL™, Sederma), le Pal-KTSKS (SEQ IS NO : 18), le Pal-YGGFXaa (SEQ ID NO : 19) avec Xaa étant Leu ou Pro, ou leur mélange.
- [0164] Des dérivés hexapeptides utilisables comprennent, sans y être limité, le Pal-HLDIIXaa (SEQ ID NO : 20) avec Xaa étant Trp, Phe, Tyr, Tic, 7-hydroxy-Tic ou Tpi, le Pal-GKTTKS (SEQ ID NO : 21), le Pal-VGVAPG (SEQ ID NO : 22) (DERMAXYL™, commercialisé par Sederma).
- [0165] Les compositions préférées disponibles dans le commerce et proposées par Sederma sont notamment :
- [0166] - des tripeptides ou dérivés comprennent : Biopeptide-CL™, Maxi-Lip™, ou Procapil™ comprenant du GHK ;
- [0167] - des térapeptides ou dérivés comprennent : RIGIN™, Eyeliss™, qui contiennent du Pal-GQPR (SEQ ID NO : 15) et un excipient ; Crystalide™, qui contient le Pal-KTFK (SEQ ID NO : 16) véhiculé (solvaté en microémulsion)
- [0168] - des pentapeptides ou dérivé comme le Matrixyl™ source de Pal-KTTKS (SEQ ID NO : 17).
- [0169] On peut citer aussi :
- [0170] - le mélange Pal-GHK et Pal-GQPR (SEQ ID NO : 15) (Matrixyl™ 3000), et
- [0171] - le mélange Pal-GHK et Pal-VGVAPG (SEQ ID NO : 22) (Biobustyl™).
- [0172] Les peptides commerciaux suivants peuvent également être mentionnés comme ingrédients actifs additionnels :
- [0173] - le Vialox™, le Syn-ake™ (β-Ala-Pro-Dab-NH-Bzl) ou le Syn-Coll™

- (Pal-Lys-Val-Lys-OH) vendus par la société Pentapharm,
- [0174] - l'Argireline™ (Ac-Glu-Glu-Met-Gln-Arg-Arg-NH₂(SEQ ID NO : 23) (Nom INCI = Acetyl hexapeptide-3), le Leuphasyl™ (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu (SEQ ID NO : 24)), l'Aldenine™ (Gly-His-Lys), le Trylagen™ (Nom INCI = Pseudoalteromonas Ferment Extract, Hydrolyzed Wheat Protein, Hydrolyzed Soy Protein, Tripeptide-10 Citrulline (produit de la réaction de citrulline et du Tripeptide-10 (peptide synthétique constitué d'acide aspartique, d'isoleucine et de lysine)), Tripeptide-1), l'Eyeseryl™ (Ac-β-Ala-His-Ser-His (SEQ ID NO : 25)), le Serilesine™ (Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val (SEQ ID NO : 26)) ou le Decorinyl™ (Nom INCI : Tripeptide-10 Citrulline = produit de la réaction de Citrulline et du Tripeptide-10 (peptide synthétique constitué d'acide aspartique, d'isoleucine et de lysine) vendus par la société Lipotec,
- [0175] - le Collaxyl™ (Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Gln (SEQ ID NO : 27)) ou la Quintescine™ (Cys-Gly) vendus par la société Vincience,
- [0176] - le Cytokinol™LS (hydrolysats de caséine) vendu par les Laboratoires Serobiologiques/Cognis,
- [0177] - le Kollaren™ (Gly-His-Lys), l'IP2000™ (Pal-Val-Tyr-Val) ou le Meliprene™ vendus par l'Institut Européen de Biologie Cellulaire,
- [0178] - le Neutrazen™ (Pal-His-D-Phe-Arg-NH₂) vendu par la société Innovations; ou
- [0179] - le BONT-L-Peptide™, le Timp Peptide™ ou l'ECM Moduline™ (Nom INCI = Palmitoyl Tripeptide-28 : produit de la réaction de l'acide palmitique et de Tripeptide-28 (peptide synthétique constitué d'arginine, lysine et de phénylalanine) vendus par la société Infinitec Activos.
- [0180] Il est également envisageable de combiner l'invention avec un ou plusieurs peptides cycliques notamment ceux extraits de l'huile de graines de lin décrits dans la demande de brevet de la Demanderesse WO2019/149450.
- [0181] L'extrait selon l'invention ou la composition en contenant peut être combinée préférentiellement avec au moins l'un des composés choisis parmi les composés de la vitamine B3, les composés comme la niacinamide ou le tocophérol, les composés rétinoides comme le rétinol, l'hexamidine, l'acide α-lipoïque, le resvératrol ou la DHEA, l'acide hyaluronique, les peptides, notamment le N-acétyl-Tyr-Arg-O-hexadécyl, le Pal-VGVAPG (SEQ ID NO : 22), le Pal-KTTKS (SEQ ID NO : 17), le Pal-KTSKS (SEQ IS NO : 18), le Pal-GHK, le Pal-KMO₂K, le Pal-GQPR (SEQ ID NO : 15) et le Pal-K(P)HG (MATRIXYL Morphomics™, commercialisé par Sederma) qui sont des actifs classiques utilisés dans les compositions topiques cosmétiques ou dermatopharmaceutiques.
- [0182] L'extrait selon l'invention ou la composition en contenant peut être appliquée localement sur les zones ciblées.
- [0183] La quantité efficace de l'extrait selon l'invention, c'est-à-dire son dosage, dépend de

la destination de la composition. Elle dépend de divers facteurs, comme l'âge, l'état du patient, la gravité du désordre. Une quantité efficace signifie une quantité non toxique suffisante pour obtenir l'effet désiré.

- [0184] Dans une composition cosmétique selon l'invention, l'extrait selon l'invention, pour être présente en quantité efficace, se trouve en général dans des proportions comprises entre 0,000001% (soit 0,01 ppm) et 15% (soit 150 000 ppm) par rapport au poids total de la composition, de préférence encore entre 0,00001% (soit 0,1 ppm) et 5% (soit 50 000 ppm), de préférence encore entre 0,0001% (soit 1 ppm) et 1% (soit 10 000 ppm), en fonction de la concentration en métabolites secondaires d'intérêt dans l'extrait selon l'invention, de la destination de la composition et de l'effet recherché plus ou moins prononcé.
- [0185] Tous les pourcentages et ratios utilisés dans la présente demande sont par poids de la composition totale et toutes les mesures sont faites à 25°C, à moins que cela ne soit précisé autrement.
- [0186] À titre d'exemple, pour un traitement cosmétique du visage, la Directive Européenne sur les Cosmétiques a fixé une quantité standard d'application d'une crème de 2,72 mg/cm²/jour/personne et pour une lotion pour le corps de 0,5 mg/cm²/jour/personne.
- [0187] Selon d'autres particularités, le procédé de traitement cosmétique selon l'invention peut être associé avec un ou plusieurs autres procédés de traitement visant la peau, comme par exemple les traitements par lumineothérapie, par la chaleur ou par aromathérapie.
- [0188] Il est possible de proposer des dispositifs à plusieurs compartiments ou kits destinés à la mise en œuvre du procédé décrit ci-dessus, et qui pourrait comprendre, à titre d'exemple, et sans que ce soit limitatif, dans un premier compartiment une composition comprenant un ingrédient actif selon l'invention à base de l'extrait selon l'invention et dans un second compartiment un excipient et/ou actif additionnel, les compositions contenues dans lesdits premier et second compartiments étant ici considérées comme composition de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps notamment dans l'un des traitements définis ci-dessus.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE

- [0189] La présente invention sera mieux comprise à la lumière de la description détaillée d'exemples de réalisation, des études et des figures décrits ci-dessous.
- [0190] 1. Description des figures
- [0191] [Fig.1] : elle représente un chromatogramme de suivi des métabolites secondaires produits par une biomasse cellulaire de *Monarda didyma* juste avant ajout de naringénine.
- [0192] [Fig.2] : elle représente un chromatogramme du suivi de la biomasse comme à la

- [Fig.1] mais sept jours après l'ajout de la naringénine, cette figure illustrant la bio-conversion de la naringénine en un ensemble de dérivés glycosylés de celle-ci.
- [0193] [Fig.3] : elle représente un chromatogramme de suivi comme à la [Fig.1] pour une biomasse cellulaire de *Lavandula angustifolia* quelques minutes après ajout de lutéoline.
- [0194] [Fig.4] : elle représente un chromatogramme de suivi de la biomasse comme à la [Fig.3] mais huit jours après l'ajout de la lutéoline, cette figure illustrant la bio-conversion de la lutéoline en un ensemble de dérivés glycosylés de celle-ci.
- [0195] [Fig.5] : elle représente un graphe illustrant la cinétique de production des flavonoïdes glycosylés et de l'acide rosmarinique lors d'une culture cellulaire de *Monarda didyma* selon le procédé de l'invention.
- [0196] [Fig.6] : elle représente un graphe de déformation de la peau sous l'effet d'une déformation mécanique en fonction du temps.
- [0197] 2. Exemples de préparation d'extraits selon l'invention
- [0198] 2.1. A partir de la plante *Monarda didyma*
- [0199] 2.1.1. Création d'une lignée cellulaire
- [0200] Des feuilles sélectionnées de *Monarda didyma* sont prélevées, lavées et coupées en petits morceaux de quelques millimètres, de façon à réaliser de nombreux explants. Après une série de traitements de décontamination, les prélèvements de feuilles sont placés sur un panel de milieux de culture gélosés, afin d'induire la callogenèse (formation d'un cal).
- [0201] Après une période de temps appropriée, un amas de cellules dédifférenciées appelé cal se forme, lequel est transféré sur un plus grand volume de milieu de culture neuf afin de pouvoir se multiplier. Un certain nombre de sous-cultures (transferts sur un milieu de culture frais) sont réalisées pour stabiliser la lignée cellulaire, c'est-à-dire jusqu'à ce que celle-ci présente une vitesse de prolifération satisfaisante et constante, une conservation du phénotype, une teneur constante en composés bioactifs d'intérêt (métabolites primaires et secondaires).
- [0202] La lignée cellulaire est ensuite soumise à une étape de sélection qui consiste à cultiver les cellules pendant une durée appropriée, à prélever les amas de cellules formés et à les inoculer dans un milieu de culture liquide pour une durée permettant d'obtenir la multiplication des cellules en petit amas et/ou individualisées. Le milieu de culture utilisé est du type Murashige et Skoog.
- [0203] La meilleure lignée cellulaire est celle permettant d'obtenir le plus rapidement possible et de manière reproductible une biomasse satisfaisante ayant une teneur optimale en métabolites choisis, la meilleure activité biologique et un phénotype homogène. L'acide rosmarinique fait partie des métabolites secondaires d'intérêt choisis.

- [0204] 2.1.2. Obtention d'une biomasse de cellules dédifférenciées de *Monarda didyma* comprenant les métabolites secondaires recherchés
- [0205] On part de la lignée cellulaire préparée comme décrit ci-dessus ou d'une lignée pré-existante et conservée.
- [0206] Dans un premier temps, la lignée de *Monarda didyma* est multipliée pour obtenir une biomasse ayant une quantité suffisante de cellules dédifférenciées afin d'effectuer l'étape de production à grande échelle.
- [0207] Les étapes suivantes sont mises en œuvre :
- [0208] a) Inoculation de la lignée sélectionnée dans un milieu liquide et culture pendant un temps suffisant pour obtenir une quantité de biomasse multipliée par 2 voire 3 fois par rapport à la biomasse d'origine ;
- [0209] b) De façon optionnelle, transfert de la suspension obtenue en a) dans un milieu liquide frais et à nouveau culture pendant un temps suffisant pour une quantité de biomasse multipliée par 2 voire 3 fois par rapport à la biomasse d'origine ;
- [0210] c) De façon optionnelle, répétition de l'étape b) ;
- [0211] Les étapes a) à c) constituent l'étape dite de pré-culture. Le milieu de culture utilisé est du type Murashige et Skoog.
- [0212] Le transfert des suspensions cellulaires obtenues aux stades a) à c) est réalisé dans un bioréacteur avec un milieu de production spécifique carencé en hormones, dans lequel la biomasse va proliférer notamment avec une phase exponentielle. Une fois le taux de biomasse souhaité suffisant, en milieu de phase exponentielle, entre 20 et 90 mg/L de naringénine est ajoutée, entre 0,1 et 15 mg/L de jasmonate de méthyle en tant qu'élévateur. Le milieu de culture utilisé à cette étape est du type B5 de Gamborg. Ce type de milieu permet d'augmenter fortement la quantité d'acide rosmarinique produite par les cellules végétales.
- [0213] d) La culture dans ces conditions est laissée pendant un temps suffisant pour obtenir une biomasse cellulaire contenant les métabolites secondaires d'intérêt c'est-à-dire les dérivés glycosylés de la naringénine objet de l'invention et l'acide rosmarinique en quantités suffisantes.
- [0214] Cette étape d) constitue l'étape dite de culture en bioréacteur.
- [0215] Le bioréacteur :
- [0216] Volume : de 5 à 100 fois plus grand que le volume de biomasse utilisée comme *inoculum* ; surface interne du bioréacteur lisse et uniforme.
- [0217] Conditions de culture :
- [0218] Milieu de culture : milieu comprenant des sels minéraux (solution de macroéléments et de microéléments), des vitamines, des hormones végétales ainsi que du sucre. De l'agar végétal est ajouté dans les milieux solides pour l'étape de création de la lignée.
- [0219] Température : entre 15°C et 35°C, de préférence entre 20°C et 30°C et de façon

encore plus préférée à 25°C.

- [0220] Durée : entre 7 et 21 jours sous agitation de la biomasse pour qu'elle soit aérée de façon optimale, de préférence entre 10 et 14 jours.
- [0221] Agitation de la biomasse : la biomasse est aérée de façon optimale, et dans le même temps, elle est agitée soit par un moyen interne, soit par un moyen externe. Une agitation faible et efficace est maintenue dans les étapes finales quand la biomasse est en quantité importante. Pour les besoins de la présente invention, des moyens appropriés d'agitation par voie interne sont des hélices tournant entre 0,10 et 0,75 m/s, de préférence à 0,21 m/s, ou par voie externe des moyens d'agitation orbitale tournant de préférence entre 40 et 200 tours/min et de préférence à environ 110 tours/min.
- [0222] Oxygénation : normalement réalisée en utilisant de l'air stérile ou des mélanges de gaz contenant de 10% à 100% en volume d'oxygène.
- [0223] 2.1.3. Récupération de la biomasse de cellules différenciées
- [0224] La biomasse est constituée de cellules en suspension, partiellement lysées ou entières, sous forme d'amas ou individuelles.
- [0225] Une filtration est réalisée pour éliminer le milieu de culture restant (surnageant) et récupérer la biomasse cellulaire.
- [0226] Optionnellement, avant l'étape de filtration, on ajoute à la biomasse un antioxydant pour protéger les métabolites secondaires de l'oxydation.
- [0227] La biomasse cellulaire récupérée peut être caractérisée par HPLC/UV. Pour cela, les cellules sont extraites dans un mélange éthanol/eau (70/30 en volume) pour l'analyse.
- [0228] L'analyse HPLC/UV de cet extrait montre que la biomasse cellulaire comprend entre 200 et 500 ppm desdits dérivés de flavonoïdes glycosylés entre 1000 et 2000 ppm d'acide rosmarinique en poids par rapport au poids total dudit extrait.
- [0229] 2.1.4. Traitement de la biomasse de cellules différenciées pour obtenir un extrait selon l'invention
- [0230] Le contenu des cellules est extrait par diffusion osmotique par ajout de glycérine et séparation des phases liquide et solide par centrifugation ou filtration ou équivalent, afin d'obtenir un extrait cellulaire débarrassé de ses débris cellulaires.
- [0231] Optionnellement, l'extraction du contenu des cellules peut aussi se faire par broyage, lyse mécanique ou chimique des cellules.
- [0232] L'extrait de *Monarda didyma* selon l'invention comprend alors le contenu intracellulaire des cellules végétales différenciées, débarrassé de ses débris cellulaires.
- [0233] Les composés actifs contenus dans l'extrait obtenu sont caractérisés analytiquement par chromatographie. Les résultats analytiques sont donnés plus loin dans la description au point 5.
- [0234] Les étapes suivantes sont optionnelles :
- [0235] 1. Séchage de l'extrait notamment par lyophilisation, zéodratation ou atomisation

pour permettre une plus grande stabilité des composés d'intérêt, améliorer le stockage à long terme sans avoir à ajouter de conservateurs.

- [0236] 2. Homogénéisation sous haute pression de la biomasse cellulaire : permet une réduction de la taille des agrégats cellulaires.
- [0237] 3. Purification de l'extrait cellulaire pour augmenter la teneur en flavonoïdes glycosylés et acide rosmarinique, par exemple par une extraction supplémentaire éthanol /eau (70/30 en volume).
- [0238] 2.2. A partir de la plante *Lavandula angustifolia*
- [0239] Les mêmes étapes de procédé que celles décrites pour *Monarda didyma* ci-dessus sont mises en œuvre, excepté que le flavonoïde aglycone précurseur utilisé ici est la lutéoline. La quantité de lutéoline ajoutée est comprise entre 200 mg/L et 1000 mg/L.
- [0240] De la même manière que pour *Monarda didyma*, on obtient en fin de procédé un extrait d'origine végétale caractérisé par la présence de dérivés glycosylés de la lutéoline dans le contenu intracellulaire des cellules végétales récoltées.
- [0241] Les composés actifs contenus dans l'extrait obtenu sont caractérisés analytiquement par chromatographie. Les résultats analytiques sont donnés plus loin dans la description au point 5.
- [0242] 3. Exemple de préparation d'un ingrédient actif à usage cosmétique
- [0243] Selon sa concentration en métabolites secondaires, l'extrait selon l'invention, tel que préparé selon les exemples ci-dessus, peut constituer tel quel un ingrédient actif, le glycérol ayant servi à la diffusion osmotique constituant avantageusement le milieu physiologiquement acceptable.
- [0244] Pour former l'ingrédient actif, l'extrait peut aussi être dilué pour diminuer sa concentration en métabolites secondaires dans un milieu physiologiquement acceptable. Celui-ci peut être identique au milieu utilisé pour la diffusion osmotique, c'est-à-dire ici du glycérol, ou non identique, par exemple du butylène glycol seul ou en mélange avec du glycérol.
- [0245] L'ingrédient ainsi formé peut comprendre par exemple 20% en poids d'extrait de biomasse fraîche de cellules différenciées, dans du glycérol (environ 20 à 80%), ledit ingrédient contenant entre 0,002% et 4% desdits dérivés de flavonoïdes glycosylés et 0,002% et 4% d'acide rosmarinique en poids par rapport à ledit ingrédient.
- [0246] Cet ingrédient est ensuite utilisable pour préparer des formulations cosmétiques comme celles par exemple exposées ci-dessous. Une quantité efficace de cet ingrédient représente entre 0,3% et 15%, de préférence entre 1% et 5%, de préférence encore entre 2% et 4% et généralement 3% en poids de ladite formulation.
- [0247] 4. Exemples de formulations cosmétiques
- [0248] Différentes formulations cosmétiques sont décrites ci-après mettant en œuvre un ingrédient selon l'invention tel que décrit ci-dessus. Des ingrédients actifs additionnels,

venant le cas échéant en soutien et/ou en complément de l'activité de l'ingrédient actif selon l'invention peuvent être ajoutés dans la phase appropriée selon leur nature hydrophobe ou hydrophile. Ces ingrédients peuvent être de toute catégorie selon leur(s) fonction(s), le lieu d'application (corps, visage, cou, buste, mains, cheveux etc.), l'effet final recherché et le consommateur ciblé, par exemple spécifiques anti-rides, hydratant, anti-cernes, raffermissant, anti-glycation, volumateur, apaisant, myorelaxant, anti-rougeurs, détoxifiant, etc.

Forme crème

[0249] [Tableaux1]

Matières premières	%	Nom INCI
Phase A		
H ₂ O	qsp	Water
Carbomer	0,40	Carbomer
Phase B		
Crodamol™ OSU	7,00	Diethylhexyl Succinate
Crodafos™ CES	4,00	Cetearyl Alcohol (and) Dicaprylyl Phosphate (and) Ceteareth-10 Phosphate
Crodacol™ CS90	1,50	Cetearyl Alcohol
Crodamol™ AB	1,50	C12-15 Alkyl Benzoate
Brij™ S10	1,20	Steareth-10
Brij™ S2	0,40	Steareth-2
Phase C		
Glycérine	2,50	Glycerin
Caprylyl glycol	0,50	Caprylyl glycol
Phase D		
Phenoxyéthanol	qs	Phenoxyethanol
Phase E		
Sorbate de potassium	qs	Potassium sorbate
Phase F		
H ₂ O	4,50	Water
Hydroxide de sodium à 30%	0,45	Sodium hydroxide
Phase G		
ingrédient selon l'invention	3,00	/

[0250] Mode opératoire :

[0251] Faire gonfler le carbomer dans l'eau (phase A) puis chauffer. Peser et chauffer B.

Faire fondre C, et laisser refroidir. Ajouter D à C, puis C+D à A, homogénéiser. Dans C+D+A, ajouter B, puis E, puis F, puis G, homogénéiser.

Forme sérum

[0252] [Tableaux2]

Matières premières	%	Nom INCI
Phase A		
H ₂ O	qsp	Water
Pentylène glycol	5,00	Pentylene glycol
Propanediol	3,00	Propanediol
Amigum	0,40	Sclerotium Gum
Sorbate de potassium	qs	Potassium Sorbate
Phase B		
Glycérine	7,00	Glycerin
Gomme de xanthane	0,60	Xanthan gum
Phase C		
NatraGem™ S140 NP	1,00	Polyglyceryl-4 Laurate/Sebacate (and) Polyglyceryl-6 Caprylate/Caprate (and) Aqua
Crodamol™ SSA	3,00	Decyl isostearate (and) Isostearyl Isostearate
Phase D		
H ₂ O	0,25	Water
Acide lactique	0,025	Lactic acid
Phase E		
Ingrédient selon l'invention	3,00	/

[0253] Mode opératoire :

[0254] Peser et mélanger A. Peser et mélanger B. Ajouter B à A sous agitation, homogénéiser. Peser et mélanger C. Ajouter C à B+A sous agitation, homogénéiser. Peser et mélanger D. Ajouter D à B+A+C, puis E, puis F, homogénéiser.

[0255] Faire fondre C, et laisser refroidir. Ajouter D à C, puis C+D à A, homogénéiser. Dans C+D+A, ajouter B, puis E, homogénéiser.

[0256] Exemples d'ingrédients pouvant être ajoutés à ces formulations (commercialisés par SEDERMA) :

[0257] VENUCEANE™ : ingrédient actif contenant un extrait biotechnologique de *Thermus thermophilus*, qui prévient des signes visibles du photovieillissement (taches, rides, sécheresse...), protège les structures cellulaires des dommages engendrés par les UV et renforce l'intégrité de la peau ; AQUALANCE™ : ingrédient actif hydratant osmo-protecteur ; CALMOSENSINE™ : ingrédient actif calmant ; CRYSTALIDE™ : in-

grédient actif apaisant plus spécifiquement l'épiderme.

[0258] 5. Tests analytiques

[0259] L'extrait utilisé pour les tests analytiques est celui décrit au point 2.1.3. ci-dessus. L'extraction des cellules est réalisée par mélange dans une solution éthanol/eau (70/30 en volume), qui est ensuite filtrée puis diluée avant d'être injecté en HPLC/UV.

[0260] Le dosage est réalisé sur une colonne Waters HSS C18, avec un gradient d'élution de 15 minutes, composé avec une phase aqueuse formate d'ammonium 50mM pH natif, d'eau et d'acétonitrile.

[0261] C'est bien le contenu intracellulaire, c'est-à-dire ce qui a été produit par les cellules végétales, qui est caractérisé.

[0262] 5.1. Comparatif au cours du procédé, avant ajout du précurseur et après métabolisation de celui-ci

[0263] L'objectif est de montrer qu'il s'est produit une biotransformation par les cellules végétales. Pour cela, pour les deux exemples de plantes donnés plus haut, *Monarda didyma* et *Lavandula angustifolia*, un chromatogramme est effectué sur un extrait réalisé sur un prélèvement de biomasse effectué dans le bioréacteur juste avant ou juste après l'ajout du précurseur, et un chromatogramme est effectué sur un extrait réalisé sur un prélèvement de la biomasse à 7 jours. Pour chaque plante, les deux chromatogrammes sont comparés.

Résultats

[0264] 5.1.1. *Monarda didyma*

[0265] [Fig.1] : représente un chromatogramme de suivi des métabolites secondaires produits par une biomasse cellulaire de *Monarda didyma* juste avant ajout de naringénine.

[0266] [Fig.2] : représente un chromatogramme du suivi de la biomasse comme à la [Fig.1] mais sept jours après l'ajout de la naringénine, cette figure illustrant la bioconversion de la naringénine en un ensemble de dérivés glycosylés de celle-ci.

[0267] Sur le chromatogramme de la [Fig.1], on observe le pic de l'acide rosmarinique présent à 3,2 minutes. Ceci est conforme aux attentes d'une culture cellulaire de *Monarda didyma*, l'acide rosmarinique étant connu comme métabolite secondaire dans la plante.

[0268] Sur le chromatogramme de la [Fig.2], on observe toujours le pic correspondant à l'acide rosmarinique (3,2 minutes) et l'apparition de plusieurs pics entre 3,5 et 5,5 minutes qui n'étaient pas présents dans le chromatogramme de la [Fig.1]. On a pu déterminer qu'ils correspondaient à un ensemble de dérivés glycosylés de la naringénine.

[0269] De plus, le temps de rétention de la naringénine est de 8 minutes. On voit qu'elle n'apparaît ni sur la [Fig.1], ni sur la [Fig.2].

[0270] Cela montre bien que les cellules végétales différenciées de *Monarda didyma* ont

intégré puis métabolisé la naringénine ajoutée au milieu de culture en un ensemble de dérivés glycosylés de la naringénine.

[0271] 5.1.2. *Lavandula angustifolia*

[0272] [Fig.3] : représente un chromatogramme de suivi comme à la [Fig.1] pour une biomasse cellulaire de *Lavandula angustifolia* quelques minutes après ajout de lutéoline.

[0273] [Fig.4] : représente un chromatogramme de suivi de la biomasse comme à la [Fig.3] mais huit jours après l'ajout de la lutéoline, cette figure illustrant la bioconversion de la lutéoline en un ensemble de dérivés glycosylés de celle-ci.

[0274] Sur le chromatogramme de la [Fig.4], on observe un pic à 3,10 minutes correspondant à l'acide rosmarinique, plusieurs pics entre 3,30 et 6,00 minutes correspondant à un pool de dérivés glycosylés de la lutéoline et un dernier pic à 6,50 minutes correspondant à la lutéoline.

[0275] Sur le chromatogramme de la [Fig.3], seuls les pics de l'acide rosmarinique et de la lutéoline sont présents. Le pic correspondant à la lutéoline est de 0,0125 unités arbitraires à la [Fig.3] et de 0,005 unités arbitraires à la [Fig.4].

[0276] Les cellules végétales dédifférenciées de l'extrait de *Lavandula angustifolia* selon l'invention ont intégré et métabolisé une grande partie de la lutéoline ajoutée à la biomasse en un ensemble de dérivés glycosylés de la lutéoline.

[0277] On voit également dans ce cas que les cellules de *Lavandula angustifolia* ont été capables de métaboliser une très grande quantité de lutéoline, ce qui permet d'obtenir avantageusement un extrait très concentré en métabolites secondaires.

[0278] 5.2. Effet de l'ajout de flavonoïde aglycone et/ou d'un éliciteur sur l'extrait obtenu après métabolisation

[0279] Les essais ont été réalisés sur un extrait de *Monarda didyma* obtenu par culture cellulaire *in vitro* dans différentes conditions. Un seul type de milieu de culture est utilisé ici, du type Murashige et Skoog.

[0280] Les mesures ont été faites sur le produit issu du procédé. L'objectif est de comparer les teneurs en dérivés glycosylés de la naringénine et en acide rosmarinique obtenus.

[0281] - Ext 1 : Un extrait selon l'invention obtenu avec ajout de naringénine ;

[0282] - Ext 2 : Un extrait selon l'invention obtenu avec ajout de naringénine et de jasmonate de méthyle (éliciteur) ;

[0283] - Ext 3 : Un extrait avec ajout de jasmonate de méthyle, mais pas de flavonoïde aglycone ;

[0284] - Ext 4 : Un extrait avec ajout ni de flavonoïde aglycone, ni d'éliciteur.

Résultats

[0285] Teneur en acide rosmarinique et dérivés glycosylés de naringénine dans les différents extraits de *Monarda didyma* :

[0286] [Tableaux3]

	Acide rosmarinique	Dérivés glycosylés de naringénine
Ext 1 selon l'invention (+ naringénine)	20ppm	54ppm
Ext 2 selon l'invention (+ naringénine et + jasmonate de méthyle)	280ppm	334ppm
Ext 3 (+ jasmonate de méthyle)	302ppm	< LOD
Ext 4 (ni naringénine ni jasmonate de méthyle)	91ppm	< LOD

[0287] *LOD : limite de détection*

[0288] Les résultats montrent que les extraits obtenus sans ajout de naringénine (Ext 3 et 4) ne présentent pas de flavonoïdes glycosylés contrairement aux extraits selon l'invention obtenus avec ajout de naringénine (Ext 1 et 2). On voit également l'effet de l'élicitation par le jasmonate de méthyle (Ext 3) avec un taux d'acide rosmarinique augmenté fortement (91ppm à 302ppm), ainsi que cet effet sur l'extrait obtenu avec ajout de naringénine (Ext 2) par rapport aux extraits obtenus sans ajout (Ext 1 et 4).

[0289] On remarque aussi une forte augmentation du taux d'acide rosmarinique (20 à 280 ppm) et une très forte augmentation des flavonoïdes glycosylés (54 à 334 ppm) dans l'extrait selon l'invention obtenu avec ajout de naringénine et de jasmonate de méthyle (Ext 2) par rapport à l'extrait selon l'invention obtenu avec ajout uniquement de la naringénine (Ext 1). Ceci montre l'avantage d'ajouter également une élicitation au procédé selon l'invention, non seulement sur le taux d'acide rosmarinique mais également sur le taux de flavonoïdes glycosylés.

[0290] L'ajout de naringénine à la biomasse permet donc de produire des flavonoïdes glycosylés non présents dans les cellules végétales de la biomasse d'origine. L'ajout de jasmonate de méthyle permet, quant à lui, d'augmenter la quantité d'acide rosmarinique et la quantité de dérivés glycosylés du flavonoïde précurseur.

[0291] 5.3. Cinétique de production des molécules d'intérêt au cours d'une même culture cellulaire

[0292] L'objectif est de comparer les quantités de flavonoïdes aglycones et des dérivés glycosylés de ceux-ci dans le temps lors de la préparation d'un extrait de *Monarda didyma* obtenu par culture cellulaire *in vitro* selon l'invention, avant et après ajout de flavonoïde aglycone.

Résultats

[0293] Le graphe en bâtons de la [Fig.5] illustre la cinétique de production de l'acide ros-

marinique et des dérivés glycosylés de la naringénine au cours de la culture cellulaire, avec en ordonnée les teneurs dans la biomasse sèche et en abscisse différents temps de culture en jours. Tous les pourcentages sont donnés en poids par rapport au poids total de l'extrait sec.

- [0294] Le graphe montre qu'à un temps T=7 jours de culture après ajout de jasmonate de méthyle et de naringénine, l'extrait obtenu contient uniquement de l'acide rosmarinique qui a été augmenté en passant de 1,7% avant ajout à 2,3% après l'ajout.
- [0295] Quelques heures après l'ajout de naringénine (T=7 jours de culture + 5-6 heures après ajout), des dérivés glycosylés de la naringénine apparaissent (environ 1,1%). Puis cette quantité augmente (1,35% à T=8 jours de culture), atteint un palier (1,32% à T=9 jours de culture) avant de décroître (1,2% à T=10 jours de culture et 0,9% à T=14 jours de culture).
- [0296] Concernant l'acide rosmarinique, il augmente dans le temps après l'ajout de jasmonate de méthyle (de 1,7% à T=7 jours de culture avant ajout à 3,3% à T=14 jours de culture).
- [0297] Ce suivi de cinétique permet également de montrer que l'ajout de flavonoïde aglycone au milieu de culture amène les cellules végétales à produire des dérivés glycosylés de ceux-ci qui n'étaient pas présents dans la biomasse initiale.
- [0298] On voit également ici, que l'ajout d'un éliciteur quant à lui permet d'augmenter la quantité d'acide rosmarinique, molécule déjà présente dans la biomasse initiale, c'est-à-dire avant ajout de flavonoïde aglycone et d'éliciteur.
- [0299] 6. Tests d'efficacité *in vitro*
- [0300] Un certain nombre de tests d'activités biologiques ont été pratiqués sur les extraits selon l'invention fabriqués comme décrits au point 2. ci-dessus. Ils démontrent de nombreuses activités cosmétiques potentielles.
- [0301] Une étude des variances et un test t de Student pour séries appariées sont effectués pour chaque test afin de juger de la significativité des résultats.
- [0302] 6.1. Sur l'extrait de *Monarda didyma*
- [0303] 6.1.1. Activité anti-âge de la peau
- [0304] 6.1.1.1. Protection contre le stress oxydatif
- [0305] Le stress oxydatif joue un rôle central dans la réponse cutanée aux différents stress. Les radicaux libres (H_2O_2 , $OH\bullet$, O_2^- , O_2 , 1O_2 ...) produits entraînent des dommages aux protéines, aux lipides et à l'ADN, conduisant à un vieillissement prématuré de la peau et de ses annexes.

Protocole

- [0306] Des fibroblastes humains normaux (FHN) sont cultivés jusqu'à confluence dans leur milieu de culture. Les cellules sont ensuite mises au contact de l'extrait selon l'invention pendant 24 heures puis reçoivent une sonde fluorescente destinée à marquer

la production intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (EROs). Après incorporation durant 30min et rinçage, les cellules reçoivent de nouveau de l'extrait selon l'invention. Ensuite, les cellules reçoivent ou non un agent destiné à créer des EROs (stress oxydant). Une lecture de la fluorescence (ex : 490 nm / em : 520 nm) permet d'estimer la quantité d'EROs intracellulaires. Le nombre de cellules est estimé à l'aide de la méthode Hoechst 33258 (coloration de l'ADN) pour pondérer les données obtenues.

[0307] Pour les mélanocytes, un protocole équivalent a été utilisé.

Résultats

[0308] Variation de la production d'EROs sur des fibroblastes (n=3) et des mélanocytes (n=5) avec ou sans stress oxydant. Effet de 0,32% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0309] [Tableaux4]

	Fibroblastes		Mélanocytes	
	Variation (%) ; significativité		Variation (%) ; significativité	
	Non stressés	Stressés	Non stressés	Stressés
Contrôle	<i>Référence 1</i>	<i>Référence 2</i>	<i>Référence 1</i>	<i>Référence 2</i>
0,32% de l'extrait selon l'invention	- 68% ; $p < 0,01$	- 94% ; $p < 0,01$	- 60% ; $p < 0,01$	- 89% ; $p < 0,01$

[0310] Les résultats montrent que l'extrait selon l'invention, permet de diminuer significativement le contenu intracellulaire en espèces réactives de l'oxygène, que ce soit dans les fibroblastes ou les mélanocytes, ayant reçu un stress oxydatif ou non.

[0311] L'extrait de *Monarda didyma* selon l'invention a donc une forte capacité anti-oxydante, permettant de lutter efficacement contre le vieillissement prématuré de la peau.

[0312] 6.1.1.2. Protection de la jonction dermo-épidermique (JDE)

[0313] La JDE assure la cohésion entre l'épiderme et le derme. Lors du vieillissement, on observe une diminution de la synthèse de ses composants (notamment certains collagènes et les laminines). Le vieillissement de la JDE et sa désorganisation ont des répercussions sur la résilience de la peau et la perte de son dynamisme.

[0314] 6.1.1.2.1. Stimulation de la synthèse de collagène-VII des laminines

Protocole

[0315] Des kératinocytes humains sont cultivés à sub-confluence puis sont mis au contact de l'extrait selon l'invention. A l'issue de ce contact, les surnageants de culture et les tapis

cellulaires sont dosés respectivement pour leur contenu en laminines et collagène-VII, respectivement à l'aide de kits type ELISA.

[0316] Une estimation de la quantité de cellules par méthode Hoechst a permis de normaliser les résultats.

Résultats

[0317] Variation de la production de collagène-VII (n=4) et des laminines (n=4) dans les kératinocytes. Effet de 0,66% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0318] [Tableaux5]

	Collagène-VII (ng/10 ⁶ cell)	Variation (%) ; significativité	Laminines (ng/10 ⁶ cell)	Variation (%) ; significativité
Contrôle	372 ± 45	<i>Référence</i>	88,8 ± 7,2	<i>Référence</i>
0,66% de l'extrait selon l'invention	2503 ± 195	+ 572% ; <i>p</i> <0, <i>01</i>	128,8 ± 10,8	+ 45% ; <i>p</i> <0, <i>01</i>

[0319] Ces résultats montrent que l'extrait selon l'invention stimule la production de collagène-VII et de laminines, des éléments essentiels de la JDE.

[0320] 6.1.1.2.2. Stimulation de la synthèse des collagènes -IV et -XVII

Protocole

[0321] Un gel comprenant l'extrait selon l'invention a été appliqué quotidiennement pendant 7 jours à la surface d'explants de peau. Les peaux ont ensuite été sectionnées et les synthèses des collagène-I, collagène-IV et collagène-XVII ont été révélées par immunohistochimie (marquage des sections par un premier anticorps spécifique de la protéine à doser et révélation de ce marquage par un anticorps secondaire fluorescent spécifique du premier anticorps). L'intensité du marquage a ensuite été quantifiée par analyse d'image des photos réalisées.

Résultats

[0322] Variation de la quantité du collagène-IV et collagène-XVII dans des explants de peau après 7 jours (n=3). Effet de 0,66% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0323] [Tableaux6]

	Collagène-I V (UAF*)	Variation (%) ; significativité	Collagène-XV II (UAF*)	Variation (%) ; si- gnificativité
Contrôle	66,0 ± 2,6	Référence	9,7 ± 1,9	Référence
0,66% de l'extrait selon l'invention	80,6 ± 11,2	+ 22% ; p<0, 01	12,6 ± 1,4	+ 30% ; p<0,01

[0324] * UAF : Unités arbitraires de fluorescence.

[0325] Les résultats montrent que l'extrait selon l'invention stimule nettement et significativement la production de collagènes -IV et -XVII qui sont aussi des éléments essentiels de la JDE.

[0326] L'ensemble de ces résultats montrent que l'extrait de *Monarda didyma* selon l'invention a une action directe de renfort de la JDE en stimulant les collagènes et laminines la constituant. L'extrait selon l'invention peut donc agir sur le vieillissement de la peau lié à une désorganisation de la JDE, en contrecarrant la perte de souplesse et d'élasticité qu'elle occasionne. En outre, les collagènes -IV et -XVII sont connus pour être impliqués dans le bon ancrage du mélanocyte. La stimulation de leur synthèse par l'extrait selon l'invention permet d'éviter le vieillissement prématuré du mélanocyte entraînant l'apparition de défauts de pigmentation et une perte d'uniformité du teint.

[0327] 6.1.1.3. Protection de la matrice extracellulaire dermique

[0328] L'élastase et les MMPs (« Matrix Metallo Proteases » : protéases de la matrice dermique) sont des protéases qui détruisent les protéines de la matrice extracellulaire comme l'élastine ou les différents collagènes. Leurs productions augmentent avec l'âge et les stress aigus ou chroniques amplifient ce phénomène. La production trop importante de MMPs conduit à la réduction de la tenue du derme par la perte de sa densité et son affinement. La production trop importante d'élastase conduit à une perte d'élasticité de la peau.

Protocole

[0329] Des fibroblastes sont cultivés jusqu'à atteindre leur confluence. La culture est exposée une fois par jour pendant 4 jours à une irradiation solaire. A l'issue de l'exposition, les cellules irradiées ou non, sont mises au contact de l'extrait selon l'invention. Les ARN totaux sont alors extraits pour analyser l'élastase, les MMP-2 et les MMP-3 par RT-qPCR.

Résultats

[0330] Variation de la quantité d'élastase (n=4), de MMP2 (n=4) et de MMP3 (n=3) dans les fibroblastes irradiés. Effet de 0,16% de l'extrait selon l'invention par rapport au

contrôle :

[0331] [Tableaux7]

	Elastase	MMP2	MMP3
Variation (%) ; signifi- cativité	- 33% ; $p < 0,05$	- 27% ; $p < 0,05$	- 30% ; $p < 0,05$

[0332] Les résultats montrent que les quantités d'élastase, de MMP2 et de MMP3 sont significativement diminuées par l'extrait selon l'invention. En limitant la production des protéases, l'extrait réduit leur activité globale néfaste sur les protéines de la MEC, comme les collagènes et l'élastine, contribuant ainsi à une bonne tenue du derme et la protection du microenvironnement des cellules présentes.

[0333] 6.1.1.4. Stimulation de la synthèse des molécules de la matrice extracellulaire dermique

[0334] 6.1.1.4.1. Stimulation de la synthèse d'élastine

[0335] L'élastine est une protéine de la matrice extracellulaire dermique. L'élasticité de la peau est modifiée au cours du vieillissement du fait de la baisse de la quantité d'élastine produite conduisant à un assemblage inapproprié des fibres d'élastine.

Protocole

[0336] Des fibroblastes humains de derme sont cultivés jusqu'à ce que les cellules soient confluentes. La culture est baignée dans un tampon et exposée aux UV une fois par jour pendant 8 jours consécutifs à $30\text{mJ}/\text{cm}^2$ * à l'aide de la lampe solaire modèle (UV Technology ; Honle; $60\text{mJ}/\text{cm}^2$ *). Après chaque irradiation les cellules reçoivent leur milieu de culture contenant l'extrait selon l'invention. A l'issue de ce contact, les tapis cellulaires sont rincés, fixés et marqués avec un anticorps anti-élastine. La révélation du marquage est réalisée à l'aide d'un anticorps secondaire fluorescent et des photos capturées sous microscope. Une analyse d'image sur ces photos permet de quantifier la production de l'élastine. Un contre marquage des noyaux est réalisé à l'aide du colorant fluorescent Hoechst 33258, marquant l'ADN, pour évaluer la population cellulaire et ainsi pondérer les données de fluorescence obtenues.

Résultats

[0337] Variation de la production d'élastine dans des fibroblastes exposés ou non à la lumière solaire (n=3). Effet de 0,16% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0338] [Tableaux8]

	Fibroblastes non irradiés	Fibroblastes irradiés
Contrôle	<i>Référence non exposée</i>	<i>Référence exposée aux UV</i>
Variation (%) ; significativité	+ 196% ; $p < 0,01$	+ 524% ; $p < 0,01$

[0339] Les résultats montrent que l'extrait selon l'invention permet d'augmenter significativement la production d'élastine dans les fibroblastes, que ce soit en condition de stress ou non. Dans les deux cas, ces augmentations sont importantes et significatives. Cette stimulation est très intéressante car avec l'âge, la production d'élastine diminue et ce phénomène est accentué lors des expositions au soleil.

[0340] 6.1.1.4.2. Stimulation de la synthèse du collagène-I

[0341] Le collagène-I constitue la protéine la plus abondante du derme. Avec l'âge, les fibroblastes dermiques produisent moins de protéines de soutien, notamment moins de collagène-I. Il est donc essentiel notamment pour avoir une belle peau et qui soit ferme.

Protocole

[0342] Le protocole utilisé est identique à celui décrit au point 6.1.1.2.2 ci-dessus.

Résultats

[0343] Variation de la quantité de collagène-I dans des explants de peau après 7 jours (n=4). Effet de 0,66% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0344] [Tableaux9]

	Collagène-I (UAF)	Variation (%) ; significativité
Contrôle	20,8 ± 3,3	<i>Référence</i>
0,66% de l'extrait selon l'invention	35,5 ± 7,1	+ 71% ; $p < 0,01$

[0345] Les résultats montrent que l'extrait selon l'invention stimule nettement et significativement la production du collagène-I.

[0346] La production d'élastine et de collagène-I permettent d'assurer les bonnes propriétés mécaniques de la peau, fermeté, résilience et élasticité, et ainsi par exemple de prévenir et/ou traiter les affaissements cutanés, les rides et les ridules.

[0347] 6.1.1.5. Protection contre la glycation

[0348] La glycation des protéines par les sucres réducteurs de la peau est également responsable du vieillissement prématuré de la peau.

[0349] En effet, les propriétés fonctionnelles, enzymatiques et/ou structurelles des protéines

une fois glyquées sont altérées, ce qui perturbe le bon fonctionnement des cellules ou des organismes impliqués.

[0350] Cela affecte les propriétés mécaniques et élastiques du derme, qui devient moins souple, plus rigide, mais aussi plus flasque et moins réactif. Cela se traduit aussi par un teint terne.

Protocole

[0351] L'étude de la glycation non enzymatique se fait entre une protéine modèle, l'albumine sérique, qui sert de cible et un sucre réducteur comestible issu de fruits. La protéine est progressivement glyquée (liée au sucre) de façon irréversible, en présence ou non de l'extrait selon l'invention. Cette modification est suivie par fluorescence.

Résultats

[0352] Variation de la glycation (n=2). Effet de 0,66% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle.

[0353] [Tableaux10]

	Variation (%) ; significativité
Contrôle	<i>Référence</i>
0,66% de l'extrait selon l'invention	- 91,9% ; $p < 0,05$

[0354] Ce résultat montre que l'extrait selon l'invention possède un fort pouvoir anti-glycant qui permet également de lutter contre le vieillissement de la peau et la perte d'éclat du teint.

[0355] 6.1.1.6. Activité anti-taches

[0356] Le mélanocyte est la cellule pigmentaire de la peau. Le maintien en vie et en bonne santé du mélanocyte, permet de garantir une pigmentation de qualité et ainsi de limiter la formation des taches noires et blanches qui sont courantes lors du vieillissement de la peau.

[0357] 6.1.1.6.1. Protection des dendrites des mélanocytes

[0358] Le mélanocyte produit la mélanine de façon abondante et la distribue aux kératinocytes voisins grâce à des ramifications appelées dendrites. Les kératinocytes absorbent la mélanine, permettant de protéger la cellule et son ADN des effets du soleil. Au cours du vieillissement, les dendrites sont plus petites et les mélanocytes sont plus grands. Ces dernières accumulent de la mélanine sans pouvoir la distribuer ce qui les intoxique.

Protocole

[0359] Des mélanocytes humains en culture et à faible densité, sont mis au contact de l'extrait selon l'invention et sont stressés par H₂O₂ qui est une molécule fortement

produite sous stress UV. La longueur des dendrites des mélanocytes est quantifiée par analyse d'image des photos réalisées.

Résultats

[0360] Variation de la longueur des dendrites des mélanocytes stressés par H₂O₂ (n=4). Effet de 0,50% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0361] [Tableaux11]

	Longueurs des dendrites à T0 (µm)	Longueurs des dendrites 2 heures après avoir été stressées (µm)	Variation (%) ; significativité
Contrôle	70,5 ± 7,6	54,8 ± 6,8	- 22,0% ; <i>p</i> <0,05
0,50% de l'extrait selon l'invention	67,2 ± 1,1	62,0 ± 2,4	- 8,0% ; <i>p</i> <0,01

[0362] Les résultats montrent que l'extrait selon l'invention protège fortement les mélanocytes du stress induit par H₂O₂ par rapport au cas contrôle (placébo) puisque la rétractation des dendrites est beaucoup moins importante.

[0363] 6.1.1.6.2. Augmentation du nombre de mélanocytes jeunes

[0364] La présence de mélanocytes en forme de fuseau est un bon critère de l'état de jeunesse de la population de cellules observée. Lorsque la population est plus vieillissante, les mélanocytes sont plus larges.

Protocole

[0365] Des mélanocytes humains sont poussés à entrer en sénescence prématurée. Ils sont ensuite mis en culture en présence de l'extrait selon l'invention pendant 19 jours consécutifs, montrant par là son innocuité pour ces cellules pourtant réputées très fragiles. Les milieux sont changés tous les 2 ou 3 jours. Les cellules sont photographiées puis un décompte des cellules en forme de fuseau par rapport aux cellules totales est réalisé à partir de ces photos.

Résultats

[0366] Variation du nombre de cellules en fuseau dans des culture de mélanocytes (n=3). Effet de 0,16% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0367] [Tableaux12]

	Cellules en fuseau (% vs cellules totales)	Variation (%) ; signifi- cativité
Contrôle	35 ± 12	<i>Référence</i>
0,16% de l'extrait selon l'invention	67 ± 13	+ 91% ; $p < 0,01$

[0368] Les résultats montrent que l'extrait selon l'invention augmente significativement le nombre de cellules en fuseau dans la population de mélanocytes totale, ce qui signifie que la population de mélanocytes est moins sénescence donc plus jeune.

[0369] 6.1.1.6.3. Augmentation de la synthèse d'acide hyaluronique par les mélanocytes

[0370] L'acide hyaluronique est fabriqué par les fibroblastes, les kératinocytes mais également par les mélanocytes. L'acide hyaluronique est en interaction, *via* des récepteurs, avec les kératinocytes et les mélanocytes dans l'épiderme.

Protocole

[0371] Des mélanocytes humains en culture et jointifs, reçoivent l'extrait selon l'invention pendant 24 heures puis, après rinçage, sont exposés à des UVB dans un tampon avant d'être remis dans le milieu de culture avec l'extrait selon l'invention. Les cellules sont alors décollées et débarrassées du milieu. Les hyaluronidases sont désactivées par chauffage et le contenu en acide hyaluronique péri-cellulaire est estimé par une méthode ELISA. Une estimation de la quantité de cellules par méthode Hoechst permet de normaliser les résultats.

Résultats

[0372] Variation de la quantité d'acide hyaluronique autour du mélanocyte suite à une exposition aux UVB (n=4). Effet de 0,32% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0373] [Tableaux13]

	Acide hyaluronique (ng/10 ⁶ cell)	Variation (%) ; signifi- cativité
Contrôle, stress aux UVB	594 ± 125	<i>Référence</i>
0,32% de l'extrait selon l'invention	763 ± 102	+ 28% ; $p = 0,08$

[0374] Les résultats montrent que l'extrait selon l'invention permet d'augmenter significativement la production d'acide hyaluronique autour des mélanocytes lorsque les cellules sont irradiées. Ceci présente un fort intérêt pour éviter l'émergence de la sénescence des mélanocytes.

[0375] 6.1.1.6.4. Baisse de l'activité enzymatique sénescence

[0376] L'enzyme SA β -galactosidase (*senescence-associated β -galactosidase*) est très active dans les cellules sénescences alors qu'elle n'est pas ou peu active dans les cellules jeunes.

Protocole

[0377] Des mélanocytes humains sont poussés à entrer en sénescence prématurée. Ils sont ensuite mis en culture en présence de l'extrait selon l'invention pendant 5 jours consécutifs. Un milieu frais est donné au 3^{ème} jour pour permettre la survie des cellules. A ce stade, les cellules sont marquées avec un dérivé indolique du galactose qui permet de quantifier l'activité de l'enzyme SA β -galactosidase dont l'accumulation dans les lysosomes des cellules sénescences est visualisée en bleu. Les cellules des champs analysés et celles en bleu sont comptées.

Résultats

[0378] Variation de l'activité de l'enzyme SA β -galactosidase dans des culture de mélanocytes (n=5). Effet de 0,16% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0379] [Tableaux14]

	Activité SA β -galactosidase (% cellules marquées vs cellules totales)	Variation (%) ; signifi- cativité
Contrôle	60 \pm 13	<i>Référence</i>
0,16% de l'extrait selon l'invention	38 \pm 13	- 37% ; <i>p</i> <0,01

[0380] Les résultats montrent que l'extrait selon l'invention diminue significativement l'activité de l'enzyme SA β -galactosidase qui s'accumule dans les cellules sénescences. L'extrait selon l'invention permet donc de diminuer le nombre de cellules sénescences.

[0381] 6.1.1.6.5. Baisse de la production du DKK1

[0382] La production en excès de la protéine DKK1 dans le derme conduit à la sénescence du mélanocyte et donc à l'arrêt total de la production de mélanine.

Protocole

[0383] Des fibroblastes sont mis en culture jusqu'à confluence. Ils sont ensuite mis au contact de l'extrait selon l'invention. A l'issue de ce contact, ces fibroblastes sont exposés à un stress aux UVB, puis sont de nouveau mis en contact avec l'extrait selon l'invention. Les surnageants de culture sont dosés pour leur contenu en DKK1, une molécule identifiée comme pro-sénescence pour les mélanocytes. Une estimation de la quantité de cellules par méthode Hoechst permet de normaliser les résultats.

Résultats

[0384] Variation de la quantité de DKK1 dans les fibroblastes stressés aux UVB (n=3). Effet de 0,66% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0385] [Tableaux15]

	DKK1 (ng/10 ⁵ cell.)	Variation (%) ; significativité
Contrôle stressé aux UVB	16457 ± 1980	<i>Référence</i>
0,66% de l'extrait selon l'invention	7030 ± 591	- 57% ; <i>p<0,01</i>

[0386] Les résultats montrent que l'extrait selon l'invention diminue significativement la production de DKK1 dans les fibroblastes. Ceci renforce l'intérêt de l'extrait selon l'invention pour réduire la progression ou la formation du phénotype sénescence dans les mélanocytes.

[0387] 6.1.1.6.6. Baisse de la production de marqueurs d'inflammation

[0388] Les IL-6 (interleukine-6) et IL-8 (interleukine-8) font parties des sécrétions augmentées par les cellules sénescence. De plus, l'IL-6 est connu pour ses aspects pro-inflammatoires et comme acteur des cassures de l'ADN et l'IL-8 est une molécule appelant et excitant les macrophages qui viennent ainsi déverser d'autres cytokines et des protéases à matrice.

Protocole

[0389] Des mélanocytes sont irradiés avec des UVB une fois par jour pendant deux jours de façon à induire leur sénescence. Ils sont mis au contact de l'extrait selon l'invention entre chaque séquence soit pendant 48h au total. Un dosage de la production d'IL-6 et d'IL8 par ces cellules est réalisé dans leur milieu de culture. Le nombre de cellules survivantes est estimées à l'aide la méthode à l'Hoeschst qui permet d'homogénéiser les résultats.

Résultats

[0390] Variation de la quantité d'IL-6 (n=6) et d'IL-8 (n=6) dans les mélanocytes, suite à une irradiation UVB. Effet de 0,32% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0391] [Tableaux16]

	IL-6 (pg/10 ⁶ cell)	Variation (%) ; signifi- cativité	IL-8 (ng/10 ⁶ cell)	Variation (%) ; significativité
Contrôle irradié aux UVB	253,8 ± 14,0	<i>Référence</i>	793,5 ± 38,4	<i>Référence</i>
0,32% de l'extrait selon l'invention	137,0 ± 12,3	- 46% ; <i>p</i> <0,01	215,9 ± 13,4	- 73% ; <i>p</i> <0,01

[0392] Les résultats montrent que l'extrait selon l'invention diminue significativement la quantité d'IL-6 et d'IL-8 dans les mélanocytes.

[0393] 6.1.1.6.7. Conclusion

[0394] L'ensemble de ces résultats aux points 6.1.1.6.1 à 6.1.1.6.6 ci-dessus montrent que l'extrait selon l'invention permet de ralentir la sénescence des mélanocytes, et par conséquent de ralentir l'apparition de désordres pigmentaires comme les taches de sénescences blanches et/ou noires.

[0395] 6.1.2. Activité hydratante et protection de l'épiderme contre les agressions extérieures

[0396] 6.1.2.1. Stimulation de la synthèse d'acide hyaluronique

[0397] L'acide hyaluronique est un constituant majeur de l'épiderme participant à la fonction de barrière protectrice ainsi qu'au maintien d'une hydratation satisfaisante de la peau. Il est capable de capter 1000 fois son poids en eau. Il se présente sous la forme d'un gel aqueux et nourrissant qui remplit les espaces entre les kératinocytes. Il prévient de cette façon une sécheresse cutanée, dont on sait qu'elle altère la texture de la peau, en lui conférant un toucher rêche et rugueux.

Protocole

[0398] Des kératinocytes humains sont cultivés à sub-confluence puis sont mis au contact de l'extrait selon l'invention. A l'issue de ce contact, la synthèse d'acide hyaluronique est évaluée à l'aide d'un dosage type ELISA. Une estimation de la quantité de cellules par méthode Hoechst permet d'homogénéiser les résultats.

Résultats

[0399] Variation de la production de l'acide hyaluronique (n=4) dans les kératinocytes. Effet de 0,32% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0400] [Tableaux17]

	Acide hyaluronique (ng/10 ⁶ cell)	Variation (%) ; signifi- cativité
Contrôle	2255 ± 151	<i>Référence</i>
0,32% de l'extrait selon l'invention	7631 ± 469	+ 238% ; <i>p<0,01</i>

[0401] Les résultats montrent que la quantité d'acide hyaluronique dans les kératinocytes est augmentée de façon significative grâce à l'extrait selon l'invention.

[0402] 6.1.2.2. Renforcement de la barrière cutanée

[0403] Les kératinocytes migrent de la couche basale, la plus profonde de l'épiderme, jusqu'à la couche cornée, la plus superficielle, en se différenciant en cornéocytes.

[0404] La couche cornée est une couche protectrice semi-perméable qui prévient la perte d'eau et maintient l'hydratation de la peau. Une meilleure différenciation des kératinocytes conduit à un renforcement de la barrière cutanée et par conséquent participe à une meilleure protection de l'épiderme vis-à-vis des agressions extérieures et à conserver une meilleure hydratation.

Protocole

[0405] Des kératinocytes humains sont cultivés à sub-confluence puis mis au contact ou non avec l'extrait selon l'invention. La différenciation est suivie de façon visuelle par observation du phénotype des kératinocytes sur 4 jours.

Résultats

[0406] [Tableaux18]

Condition	Effet pro-différenciateur observé après 4 jours
Cas Contrôle	0
0,66% de l'extrait selon l'invention	++

[0407] L'évaluation se fait visuellement. Dans le cas contrôle, les cellules non traitées montrent un tapis de kératinocytes jointifs avec des contours cellulaires bien marqués. En revanche, en présence de l'extrait selon l'invention les cellules se rétractent et les contacts entre les cellules diminuent jusqu'à présenter des espaces vides entre les cellules, ce qui représente un aspect caractéristique d'une différenciation avancée des kératinocytes.

[0408] Ces résultats montrent que l'extrait de *Monarda didyma* participe à une meilleure protection de l'épiderme et une meilleure hydratation de la peau.

[0409] 6.1.3. Activité anti-séborrhéique

[0410] La peau grasse est associée à une production de sébum trop abondante par les sébocytes. Trop de sébum entraîne des modifications de propriétés de la peau et du cuir chevelu, par exemple en augmentant la formation de boutons, points noirs et en obstruant les pores qui vont alors se dilater, devenir plus visibles et rendre le grain de la peau irrégulier et/ou entraîner une croissance excessive des bactéries responsables des pellicules telles que les champignons du genre *Malassezia* au niveau du cuir chevelu.

[0411] Une activité cosmétique anti-séborrhéique va s'opposer à cette évolution en réduisant la production de sébum, ce qui aura pour effet de resserrer les pores de la peau, de la lisser et de diminuer l'aspect gras/brillant avec un grain irrégulier, caractéristique notamment des peaux grasses et/ou de rendre le cuir chevelu plus sain, avec moins de pellicules et de démangeaisons liées à celles-ci.

Protocole

[0412] Des sébocytes sont ensemencés dans leur milieu de croissance. À confluence, les cellules sont mises au contact ou non (cas contrôle) de l'extrait selon l'invention pendant 48 heures. Après élimination des milieux, les tapis cellulaires sont incubés avec du rouge neutre, marqueur des lipides neutres intracellulaires, ce qui permet d'estimer la quantité de lipides présents dans les cellules par mesure de la fluorescence émise. L'estimation de la viabilité est réalisée en parallèle sur les mêmes tapis à l'aide d'un colorant fluorescent.

Résultats

[0413] Variation de la synthèse lipidique par les sébocytes. Effet de 0,66% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle (n=3) :

[0414] [Tableaux19]

	Variation (%) ; significativité
Contrôle	<i>Référence</i>
0,66% de l'extrait selon l'invention	- 61% ; $p < 0,01$

[0415] Les résultats montrent que l'exposition des sébocytes à l'extrait selon l'invention permet de réduire la quantité de lipides dans les cellules productrices de sébum.

[0416] L'extrait selon l'invention peut donc être utilisé pour traiter les désordres cutanés liés aux peaux à tendance grasses.

[0417] 6.1.4. Activité amincissante

[0418] 6.1.4.1. Effet lipolytique

[0419] Le glycérol est un produit de l'hydrolyse des triglycérides. La stimulation de sa production en présence d'un actif traduit donc une augmentation de la lipolyse. Le fait d'augmenter la lipolyse va donc permettre de réduire la taille des adipocytes et donc le

tissu adipeux.

Protocole

[0420] Des pré-adipocytes humains sont ensemencés et induits à se différencier à l'aide d'un cocktail spécifique d'inducteurs. À l'obtention d'adipocytes matures bien chargés en triglycérides, les cellules sont mises en contact avec l'extrait selon l'invention dans un milieu de culture.

[0421] Les surnageants sont ensuite récupérés. La quantité de glycérol relargué, issu de l'hydrolyse des triglycérides intracellulaires, est mesurée tous les jours pendant 4 jours, à l'aide d'un kit commercial de chez Sigma.

[0422] En parallèle, un dosage de la survie est réalisé par coloration Hoechst, pour quantifier le nombre de cellules.

[0423] Un contrôle visuel est effectué avant chaque récupération afin de vérifier l'absence de toxicité.

Résultats

[0424] Variation de la concentration en glycérol relargué par les adipocytes après 4 jours de contact avec l'extrait selon l'invention. Effet de 0,66% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle (n=3) :

[0425] [Tableaux20]

	Variation (%) ; significativité
Contrôle	<i>Référence</i>
0,66% de l'extrait selon l'invention	+ 152% ; $p < 0,01$

[0426] Ces résultats montrent que l'extrait selon l'invention augmente la lipolyse des adipocytes.

[0427] 6.1.4.2. Effet anti-lipogénèse

[0428] La Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (G3PDH) est une enzyme de stockage des graisses dont l'expression augmente fortement lors de la différenciation des fibroblastes pré-adipocytaires en adipocytes. Le fait d'inhiber cette enzyme va donc permettre de réduire la quantité d'adipocytes et donc le tissu adipeux.

Protocole

[0429] Des adipocytes humains matures sont formés à partir d'un état immature à l'aide d'un cocktail hormonal. Une série reçoit l'extrait selon l'invention pendant cette phase. Le grossissement des réserves adipeuses est comparé aux cas contrôles à la fois visuellement et en dosant l'activité de l'enzyme de stockage des graisses (G3PDH). Un test de viabilité est effectué en parallèle.

Résultats

[0430] Variation de l'activité de la G3PDH sur des adipocytes en voie de différenciation.

Effet de 0,66% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle (n=3) :

[0431] [Tableaux21]

	Variation (%) ; significativité
Contrôle	<i>Référence</i>
0,66% de l'extrait selon l'invention	- 80% ; $p < 0,01$

[0432] Ce résultat montre que l'extrait selon l'invention freine la différenciation des adipocytes de façon significative.

[0433] En conclusion, de manière avantageuse, l'extrait selon l'invention est doublement efficace, d'une part pour augmenter la lipolyse et, d'autre part, freiner la lipogénèse. L'extrait a donc un fort pouvoir amincissant.

[0434] 6.1.5. Activité apaisante de la peau

[0435] Les médiateurs de l'inflammation, comme les IL-6 et les PGE₂, sont très présents dans les phénomènes microinflammatoires. La diminution de la présence de ces médiateurs a pour conséquence de diminuer les sensations d'inconfort des peaux sensibles et réactives.

Protocole

[0436] Des fibroblastes dermiques humains normaux sont cultivés jusqu'à l'obtention d'un tapis confluent. A ce stade, ils sont mis au contact des produits à tester pendant 24 heures, puis les tapis sont irradiés aux UVB et remis à nouveau en contact des produits à tester pendant 24 heures. Les quantités de PGE₂ et d'IL-6 synthétisées sont mesurées dans les surnageants de culture par dosage ELISA. Le nombre de cellules est évalué afin de pouvoir normaliser les données.

Résultats

[0437] Variation de la production d'IL-6 et de PGE₂ dans les fibroblastes irradiés par UVB. Effet de 0,66% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle (n=3) :

[0438] [Tableaux22]

	IL-6 (pg/10 ⁶ cell)	PGE ₂ (pg/10 ⁶ cell)
Variation (%) par rapport au cas contrôle ; significativité	- 82% ; $p < 0,01$	- 81% ; $p < 0,01$

[0439] Ainsi, avantageusement l'extrait selon l'invention réduit fortement et de façon significative les 2 messagers pro-inflammatoires testés.

[0440] L'extrait selon l'invention peut donc être utilisé pour apaiser les inconforts cutanés des peaux sensibles tels que les rougeurs, les tiraillements, etc.

[0441] 6.1.6. Conclusion

- [0442] L'ensemble des résultats *in vitro* présentés ci-dessus montrent que l'extrait de *Monarda didyma* préparé selon le procédé de l'invention possède avantageusement un panel très large d'activités biologiques ayant un grand intérêt notamment en cosmétique.
- [0443] L'extrait de *Monarda didyma* selon l'invention limite la réduction du capital jeunesse des cellules en limitant l'impact des stress oxydatifs induits par l'extérieur. Le microenvironnement des cellules est également protégé, en limitant la production des protéases (élastases et MMP) mais aussi en promouvant la fabrication des éléments de la JDE qui sont les collagènes -IV, -VII, -XVII, l'acide hyaluronique, et les laminines. Par ailleurs, l'extrait de *Monarda didyma* selon l'invention agit en stimulant la production d'élastine et de collagène-I, des éléments de la matrice dermique qui sont connus pour être fortement impactés par le vieillissement naturel. Ceci permet de maintenir et renforcer le microenvironnement des cellules proches de la JDE et évite les dérégulations consécutives à l'affaiblissement de cette dernière.
- [0444] Enfin, l'extrait de *Monarda didyma* selon l'invention est favorable au maintien en vie et en bonne santé du mélanocyte, permettant de garantir une pigmentation de qualité et ainsi de limiter la formation des taches noires et blanches qui sont courantes lors du vieillissement de la peau.
- [0445] 6.2. Sur l'extrait de *Lavandula angustifolia*
- [0446] Les protocoles de test sont identiques à ceux décrits pour *Monarda didyma* au point 6.1 ci-dessus.
- [0447] 6.2.1. Activité anti-âge de la peau
- [0448] 6.2.1.1. Protection contre le stress oxydatif

Résultats

- [0449] Variation de la production d'EROs sur des fibroblastes (n=3) avec ou sans stress oxydant. Effet de 0,05% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :
- [0450] [Tableaux23]

	Fibroblastes non stressés	Fibroblastes stressés
Contrôle	Référence 1	Référence 2
Variation (%) ; significativité	- 45% ; $p < 0,01$	- 53% ; $p < 0,01$

- [0451] Les résultats montrent que l'extrait selon l'invention, permet de diminuer significativement le contenu intracellulaire en espèces réactives de l'oxygène dans les fibroblastes ayant reçu un stress oxydatif ou non.
- [0452] L'extrait de *Lavandula angustifolia* selon l'invention a donc une forte capacité anti-oxydante, permettant de lutter efficacement contre le vieillissement prématuré de la

peau.

[0453] 6.2.1.2. Protection contre la glycation

Résultats

[0454] Variation de la glycation (n=2). Effet de 0,05% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0455] [Tableaux24]

	Variation (%) ; significativité
Contrôle	<i>Référence</i>
0,05% de l'extrait selon l'invention	- 96% ; $p < 0,01$

[0456] Ce résultat montre que l'extrait selon l'invention possède un pouvoir anti-glycant qui permet également de lutter contre le vieillissement de la peau et la perte d'éclat du teint.

[0457] 6.2.2. Activité hydratante

[0458] 6.2.2.1. Acide hyaluronique

Résultats

[0459] Variation de la production de l'acide hyaluronique (n=5) dans les kératinocytes. Effet de 0,01% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0460] [Tableaux25]

	Variation (%) ; significativité
Contrôle	<i>Référence</i>
0,01% de l'extrait selon l'invention	+ 185% ; $p < 0,01$

[0461] Les résultats montrent que la quantité d'acide hyaluronique dans les kératinocytes est augmentée de façon significative grâce à l'extrait selon l'invention.

[0462] 6.2.3. Activité apaisante de la peau

[0463] 6.2.3.1. Messagers pro-inflammatoires

Résultats

[0464] Variation de la production PGE₂, d'IL-6 et d'IL-8 dans les fibroblastes irradiés par UVB. Effet de 0,0125% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0465] [Tableaux26]

	IL-6 (pg/10 ⁶ cell)	IL-8 (pg/10 ⁶ cell)	PGE ₂ (pg/10 ⁶ cell)
Contrôle	<i>Référence</i>	<i>Référence</i>	<i>Référence</i>
Variation (%) ; signifi- cativité	- 96% ; p<0,01	- 59% ; p<0,01	- 97% ; p<0,01

[0466] Ainsi, avantageusement l'extrait selon l'invention réduit de façon significative les 3 messagers pro-inflammatoires testés.

[0467] 6.2.3.2. Inhibition du récepteur cannabinoïde 2 (CB2)

[0468] Le récepteur cannabinoïde 2 (CB2) est exprimé au niveau de la peau et son activation est associé à des effets anti-inflammatoires, anti-antioxydant, séborégulateur et immunomodulateurs, mais sans effet psychoactif.

Protocole

[0469] Un agoniste présentant une affinité spécifique pour le CB2 est radiomarqué. L'extrait selon l'invention est placé avec cet agoniste radiomarqué en présence d'une membrane contenant le récepteur CB2. La fixation dudit extrait sur le récepteur CB2 est évaluée en comparant la radioactivité (fixation de l'agoniste) d'un cas contrôle par rapport à la condition contenant ledit extrait.

Résultats

[0470] Variation de l'inhibition de liaison au récepteur CB2. Effet de 0,05% de l'extrait selon l'invention par rapport au contrôle :

[0471] [Tableaux27]

	% Inhibition de liaison
	CB2
Contrôle	<i>Référence</i>
Variation (%)	49,4%

[0472] Les résultats montrent que l'extrait selon l'invention se lie au récepteur CB2 à la place du contrôle spécifique.

[0473] L'extrait selon l'invention peut donc être utilisé pour apaiser les inconforts cutanés des peaux sensibles tels que les rougeurs, les tiraillements, etc.

[0474] 7. Tests d'efficacité *in vivo*

[0475] Les tests réalisés portent à titre d'exemple sur l'activité cosmétique originale de l'extrait de *Monarda didyma* préparé selon le procédé de l'invention par culture cellulaire *in vitro* pour traiter les tâches de sénescence.

[0476] 7.1. Principe et protocole des tests *in vivo*

[0477] Les taches cutanées, tantôt brunes tantôt blanches, constituent un des premiers signes visibles du vieillissement de la peau. L'origine de ces taches, comme expliqué plus haut, réside dans la cellule pigmentaire de la peau : le mélanocyte.

[0478] Les taches brunes sont dues une surproduction de mélanine.

[0479] A l'inverse, les taches blanches sont dues à une absence de mélanine. De plus, ces taches présentent des matrices dégradées au niveau du derme et de la JDE et leur surface est plate, ce qui rend la peau moins souple et plus rigide.

Produit testé

[0480] La crème décrite au point 4. ci-dessus.

Protocole

[0481] L'évaluation de l'efficacité de la crème a été menée pendant 56 jours sur un total de 52 volontaires lors de deux études menées contre placebo. Ces études ont permis d'évaluer l'effet de la crème sur les divers types de taches brunes et blanches présentes sur la peau des volontaires.

[0482] Critères d'inclusion particuliers

[0483] La première étude a été menée sur un premier panel de 27 femmes (moyenne d'âge 58 ans [49-67]) comprenant un test à l'aide d'une caméra multispectrale et un test à l'aide d'un banc photographique.

[0484] La seconde étude a été menée sur un second panel de 25 femmes (moyenne d'âge 59 ans [47-69]) comprenant un test à l'aide d'un Cutometer®.

[0485] Les critères suivants devaient également être respectés pour les deux panels recrutés : être ménopausée ou proche de la ménopause, de phototype II à IV et possédant une peau imparfaite, à savoir présentant des taches brunes visibles sur le visage et les bras et des taches blanches visibles sur les bras.

[0486] Type d'étude, durée, applications

[0487] Pendant 2 mois, les volontaires ont appliqué sur le visage et les avant-bras, 2 fois par jour, une crème selon l'invention et une crème placebo en contra-latéral.

[0488] Statistiques

[0489] Pour la quantification des taches, les études statistiques sont effectuées à l'aide d'un test *t* de Student ou si besoin avec un test non paramétrique de Wilcoxon en unilatéral sur séries appariées.

[0490] Dans le cas des évaluations par des experts, un test de Khi2 a été utilisé pour comparer les fréquences des réponses.

[0491] 7.2. Evaluation des taches brunes et des taches blanches par caméra multispectrale

Protocole

[0492] Une caméra multispectrale ANTERA 3D® a été utilisée, permettant d'obtenir des images en trois dimensions sous différentes longueurs d'ondes, toutes dans la lumière

visible. Les photographies du visage ont été réalisées en mode polarisé croisé afin de retirer la brillance naturelle et d'augmenter la netteté des taches.

[0493] Ce système permet plusieurs analyses en parallèle et fournis donc plusieurs paramètres :

[0494] - des paramètres de couleurs L^* , a^* , et b^* (espace chromatique CIELAB) ;

[0495] - des quantités relatives de chromophores tels l'hémoglobine et la mélanine ;

[0496] - différents paramètres topographiques comme les rides, la texture ou les volumes en creux ou en élévation.

[0497] Pour les taches brunes, la pigmentation maximale a été étudiée et l'hétérogénéité de la pigmentation qui quantifie les variations de pigmentation à l'intérieur d'une tache a été suivie.

[0498] Pour les taches blanches, le volume et la profondeur maximale de celles-ci a été étudié. En effet, les taches blanches forment un léger creux dont la surface est lisse, dépourvue du réseau microdépressionnaire. Ces caractéristiques sont liées à la dégradation de la peau sous-jacente.

[0499] Parmi les panélistes du premier panel ci-dessus, seules 23 femmes avaient des taches blanches présentant ces caractéristiques, c'est-à-dire une dépression cutanée et un aplatissement suffisamment net.

Résultats

[0500] Variation de la pigmentation maximale et de l'hétérogénéité des taches brunes cutanées. Effet de la crème selon l'invention :

[0501] [Tableaux28]

	Pigmentation maximale		Hétérogénéité	
	Crème selon l'invention	Crème placebo	Crème selon l'invention	Crème placebo
% variation T56 jours vs. T0 ; significativité vs. T0	- 2,1% ; $p < 0,01$	- 0,9% ; $p < 0,01$	- 4,2% ; $p < 0,01$	- 1,1% ; $p < 0,05$
% d'amélioration de la crème selon l'invention vs. la crème placebo ; significativité vs. placebo	- 1,2% ; $p < 0,01$		- 3,3% ; $p < 0,05$	

[0502] Variation de la profondeur maximale et du volume des taches blanches cutanées. Effet de la crème selon l'invention :

[0503] [Tableaux29]

	Profondeur maximale		Volume	
	Crème selon l'invention	Crème placebo	Crème selon l'invention	Crème placebo
% variation T56 jours vs. T0 ; significativité vs. T0	- 23,2% ; <i>p</i> <0,01	- 9,5% ; <i>p</i> <0,01	- 49,6% ; <i>p</i> <0,01	-18,1% ; <i>p</i> <0,05
% d'amélioration de la crème selon l'invention vs. la crème placebo ; significativité vs. placebo	- 13,7% ; <i>p</i> <0,05		- 31,5% ; <i>p</i> <0,05	

[0504] Les résultats de ces deux tableaux montrent que la crème selon l'invention diminue significativement la pigmentation et l'hétérogénéité des taches brunes, ainsi que la dépression créée par les taches blanches, rendant ces deux types de taches moins visibles et permettant d'avoir un teint plus uniforme.

[0505] 7.3. Evaluation des taches brunes par banc photographique

Protocole

[0506] Un banc photographique Headscan V05™ (Orion Concept, France) est utilisé pour acquérir des photographies du visage en mode polarisé croisé afin de retirer la brillance naturelle. Un panel de 6 juges experts a évalué ces photos sur le critère : la peau est plus homogène et moins tachée.

Résultats

[0507] Les réponses traduisent 64% d'avis favorables en faveur de la crème contenant l'extrait selon l'invention, ce qui est significativement plus important que les 35% d'avis favorables pour le placebo.

[0508] 7.4. Evaluation des paramètres viscoélastiques des taches blanches

Protocole

[0509] Le Cutometer® (Courage & Khazaka) est utilisé pour mesurer les paramètres viscoélastiques de la peau. Cet appareil mesure la déformation d'une zone cutanée, soumise à des contraintes mécaniques répétées de succion, ainsi que son pouvoir de récupération. L'appareil fournit des graphes de déformation de la peau en fonction du temps tel que montré à la [Fig.6]. Sur cette [Fig.6], les paramètres U_f , U_e et U_a sont indiqués, représentant respectivement l'élongation totale, l'élongation immédiate et l'élongation récupérée après contrainte.

[0510] Les mesures ont été réalisées sur les zones avec les taches blanches. Trois acquisitions indépendantes ont été réalisées à T0 et T = 56jours.

Résultats

[0511] Variation de l'élongation totale (Uf), l'élongation immédiate (Ue) et l'élongation récupérée (Ua) des taches blanches cutanées (N=25). Effet de la crème selon l'invention :

[0512] [Tableaux30]

	Uf (élongation totale)		Ue (élongation immédiate)		Ua (élongation récupérée)	
	Crème selon l'invention	Crème placebo	Crème selon l'invention	Crème placebo	Crème placebo	Crème placebo
% variation T56 jours vs. T0 ; significativité vs. T0	10,5% ; $p < 0,01$	4,8% ; $p < 0,05$	12,4% ; $p < 0,01$	7,0% ; $p < 0,05$	13,3% ; $p < 0,01$	4,1% ; <i>dns</i>
% d'amélioration de la crème selon l'invention vs. la crème placebo ; significativité vs. placebo	5,7% ; $p < 0,05$		5,4% ; $p < 0,01$		9,2% ; $p < 0,05$	

[0513] **dns : données non significatives*

[0514] Les résultats montrent que les trois paramètres sont meilleurs après 56 jours d'application de la crème contenant l'extrait selon l'invention.

[0515] Avec la crème contenant l'extrait selon l'invention, l'augmentation de Uf associée à celle d'Ue montre une plus grande élongation de la peau ce qui la conduit à une peau moins dure, plus déformable, plus souple au niveau des taches blanches.

[0516] L'augmentation concomitante de Ua, montre que si la peau est plus déformée, elle revient également mieux à son état d'origine, ce qui prouve une bonne élasticité.

[0517] Les résultats montrent donc un assouplissement des zones hypopigmentées ainsi qu'un meilleur retour après 56 jours d'application de la crème contenant l'extrait selon l'invention.

[0518] La crème selon l'invention permet d'améliorer la qualité de la peau au niveau des

taches blanches qui seront de ce fait moins visibles.

[0519] 7.5. Conclusion

[0520] L'ensemble des résultats *in vivo* présentés ci-dessus montrent que l'ingrédient actif de *Monarda didyma* selon l'invention permet avantageusement de traiter les taches de sénescence. En effet, l'ingrédient actif selon l'invention agit sur les deux types de taches, qui sont moins visibles et permet d'avoir un teint plus homogène.

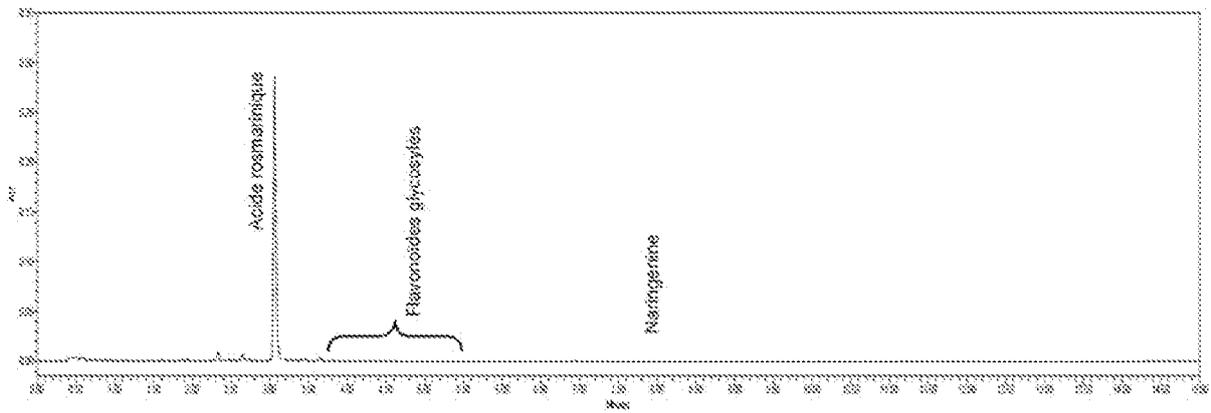
Revendications

- [Revendication 1] Procédé d'obtention d'un extrait d'origine végétale par culture végétale *in vitro*, comprenant à partir d'une lignée de cellules végétales indifférenciées ou différenciées les étapes suivantes successivement :
- une étape de pré-culture, destinée à amplifier la biomasse desdites cellules végétales ;
 - une étape de culture en bioréacteur de la biomasse comprenant au moins une phase de prolifération, et
 - une étape de traitement de la biomasse récoltée pour produire ledit extrait comprenant des métabolites secondaires d'intérêt,
- caractérisé en ce qu'à l'étape de culture en bioréacteur au moins un flavonoïde aglycone est ajouté dans le milieu de culture.
- [Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit au moins un flavonoïde aglycone est choisi parmi les flavanones aglycones et/ou les flavones aglycones.
- [Revendication 3] Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les flavanones aglycones sont choisies parmi la naringénine, l'ériodictyol et la butine, ou un mélange de ceux-ci.
- [Revendication 4] Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les flavones aglycones sont choisies parmi la lutéoline et l'apigénine, ou un mélange de ceux-ci.
- [Revendication 5] Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'ajout dudit au moins un flavonoïde aglycone est réalisé pendant la phase exponentielle de prolifération de la biomasse.
- [Revendication 6] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on initie une élicitation à l'étape de culture en bioréacteur.
- [Revendication 7] Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'élicitation est chimique, à l'aide d'un éliciteur d'origine biologique choisi parmi le chitosan, le jasmonate de méthyle, l'acide jasmonique et l'acide salicylique.
- [Revendication 8] Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'étape de traitement comprend l'élimination du milieu de culture.
- [Revendication 9] Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape de traitement de la biomasse comprend une étape de li-

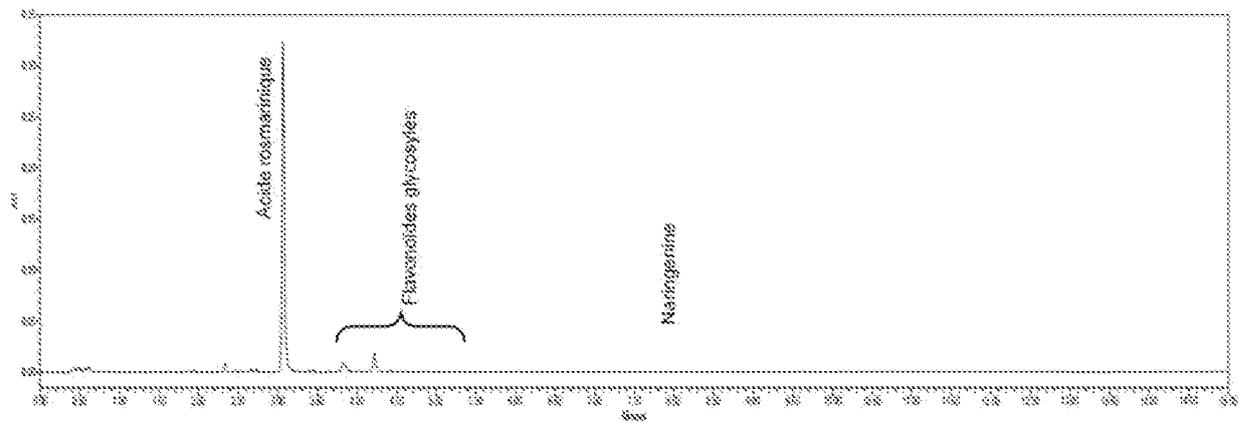
- bération du contenu intracellulaire hors des cellules végétales.
- [Revendication 10] Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la libération du contenu intracellulaire contenant les métabolites secondaires d'intérêt est réalisée par diffusion osmotique ou par la lyse des cellules.
- [Revendication 11] Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que l'étape de traitement comprend l'élimination des débris cellulaires après la libération du contenu intracellulaire.
- [Revendication 12] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la lignée cellulaire de cellules végétales est préparée extemporanément.
- [Revendication 13] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est appliqué aux plantes de la famille des Lamiacées.
- [Revendication 14] Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la plante est choisie parmi le genre *Monarda* et/ou *Lavandula*.
- [Revendication 15] Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la plante est *Monarda didyma* et/ou *Lavandula angustifolia*.
- [Revendication 16] Extrait d'origine végétale obtenu par le procédé selon l'une des quelconque revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir d'une plante de la famille des Lamiacées et en ce qu'il comprend des flavonoïdes glycosylés et de l'acide rosmarinique en tant que métabolites secondaires.
- [Revendication 17] Extrait selon la revendication 16 obtenu à partir de *Monarda didyma*, comprenant des dérivés glycosylés de naringinine en tant que métabolites secondaires.
- [Revendication 18] Extrait selon la revendication 16 obtenu à partir de *Lavandula angustifolia* comprenant des dérivés glycosylés de lutéoline en tant que métabolites secondaires.
- [Revendication 19] Extrait de *Monarda* et/ou *Lavandula* selon l'une des revendications 17 ou 18 pour un traitement dermatologique.
- [Revendication 20] Extrait de *Monarda* selon la revendication 19, caractérisé en ce que le traitement est choisi parmi :
- un traitement apaisant ; et/ou
 - un traitement anti-séborrhéique.
- [Revendication 21] Extrait de *Lavandula* selon la revendication 19, caractérisé en ce que le traitement est un traitement apaisant
- [Revendication 22] Composition cosmétique comprenant un extrait selon l'une des revendications 16 à 18 en tant qu'actif et un milieu physiologiquement ac-

- ceptable.
- [Revendication 23] Utilisation de l'extrait selon l'une des revendications 16 à 18 ou de la composition selon la revendication 22, pour un traitement cosmétique non thérapeutique.
- [Revendication 24] Utilisation selon la revendication 23, caractérisée en ce que le traitement cosmétique non thérapeutique est topique.
- [Revendication 25] Utilisation selon la revendication 23 ou 24, caractérisée en ce que l'extrait est un extrait de *Monarda* et ledit traitement est choisi parmi :
- un traitement anti-vieillesse ; et/ou
 - un traitement pour diminuer l'aspect gras/brillant de la peau ; et/ou
 - un traitement hydratant ; et/ou
 - un traitement de renforcement de la barrière cutanée ; et/ou
 - un traitement amincissant.
- [Revendication 26] Utilisation selon la revendication 25, caractérisée en ce que le traitement anti-vieillesse est adapté à traiter les tâches de vieillesse blanches et/ou brunes de la peau.
- [Revendication 27] Utilisation selon la revendication 23 ou 24, caractérisé en ce que l'extrait est un extrait de *Lavandula* et le traitement est choisi parmi :
- un traitement anti-vieillesse ; et/ou
 - un traitement hydratant.

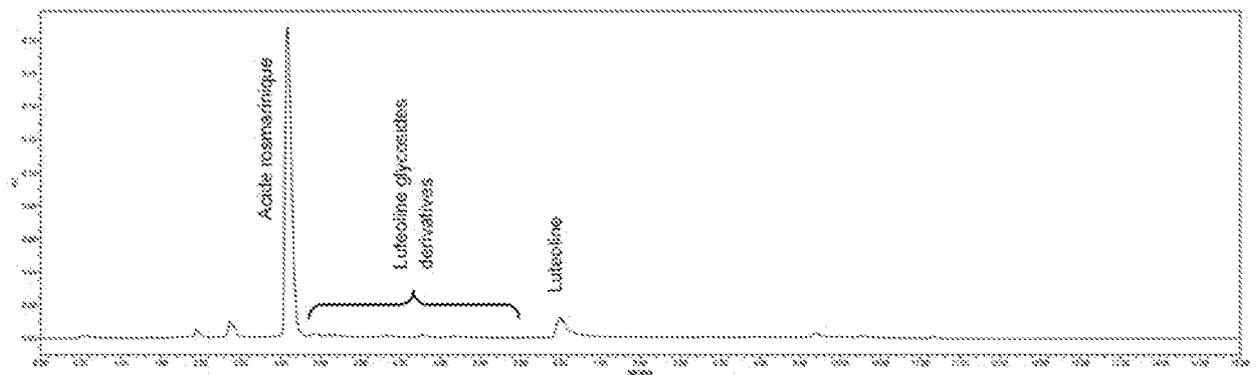
[Fig. 1]



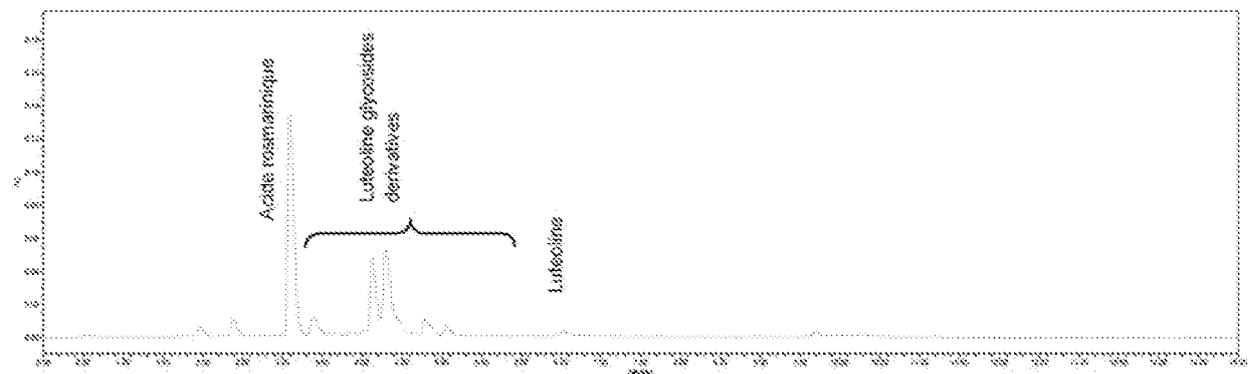
[Fig. 2]



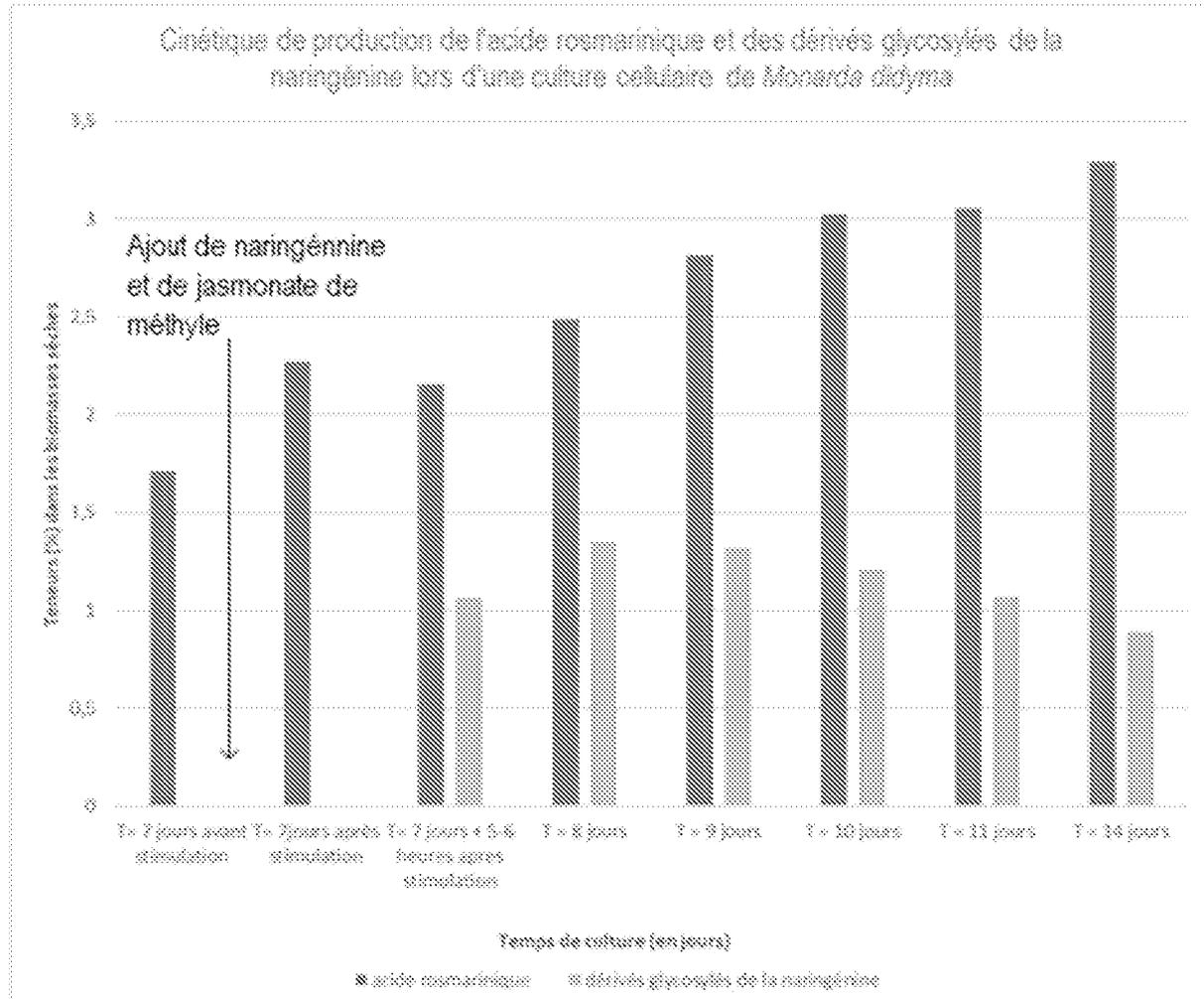
[Fig. 3]



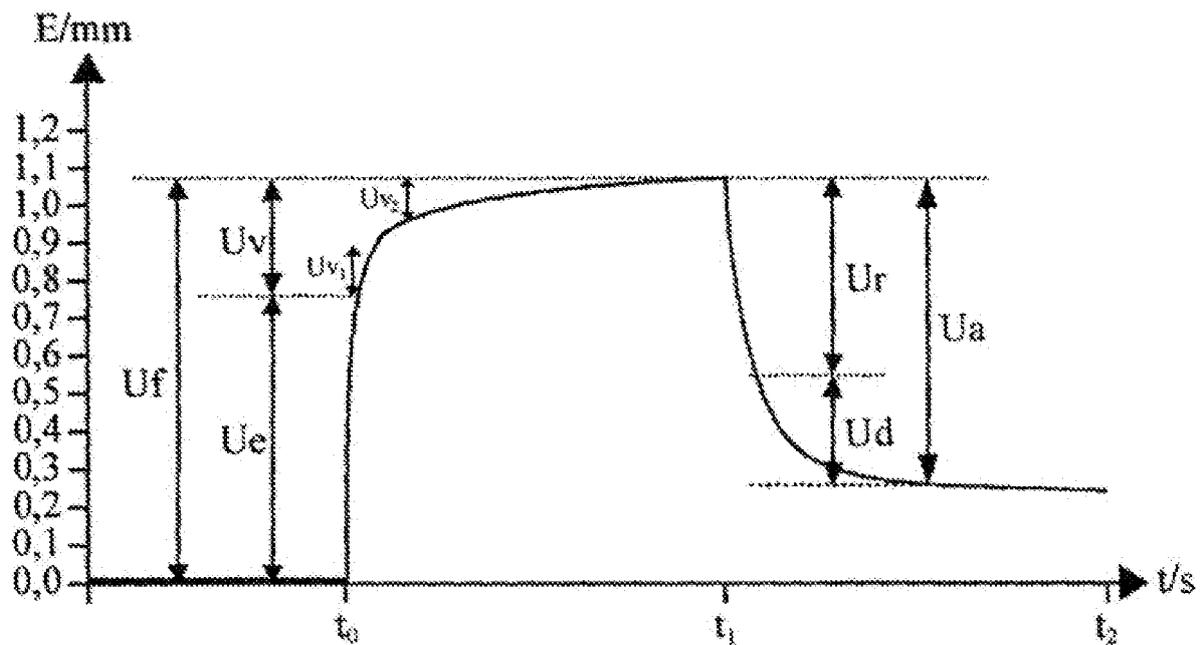
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 917841
FR 2214243

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	<p>ATANAS I PAVLOV ET AL: "Optimization of Rosmarinic Acid Production by Lavandula vera MM Plant Cell Suspension in a Laboratory Bioreactor", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, HOBOKEN, USA, vol. 21, no. 2, 5 septembre 2008 (2008-09-05), pages 394-396, XP072297072, ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1021/BP049678Z * le document en entier *</p> <p>-----</p>	1-27	<p>A01H 4/00 A61K 8/368 A61K 8/49 A61K 8/97 A61Q 19/00 A61Q 19/08 C12N 5/04 C12N 5/02</p>
X	<p>KHATEEB WESAM AL ET AL: "In vitro propagation, genetic stability, and secondary metabolite analysis of wild lavender (Lavandula coronopifoliaPoir.)", HORTICULTURE, ENVIRONMENT AND BIOTECHNOLOGY, KOREAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE, KOREA, vol. 58, no. 4, 21 septembre 2017 (2017-09-21), pages 393-405, XP036325195, ISSN: 2211-3452, DOI: 10.1007/S13580-017-0342-7 [extrait le 2017-09-21] * le document en entier *</p> <p>-----</p>	1-16,18, 19, 21-24,27	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</p> <p>A61K A61Q</p>
X	<p>SHANAIDA MARIIA ET AL: "Polyphenols and Pharmacological Screening of a Monarda fistulosa L. dry Extract Based on a Hydrodistilled Residue By-Product", FRONTIERS IN PHARMACOLOGY, vol. 12, 29 avril 2021 (2021-04-29), XP093102393, CH ISSN: 1663-9812, DOI: 10.3389/fphar.2021.563436 * page 2, colonne de gauche, alinéa 2 *</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	16,17, 19,20, 22-26	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
27 novembre 2023		Greif, Gabriela	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 917841
FR 2214243

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	<p>KOYCHEVA IVANKA K. ET AL: "Biotechnologically Produced Lavandula angustifolia Mill. Extract Rich in Rosmarinic Acid Resolves Psoriasis-Related Inflammation Through Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling", FRONTIERS IN PHARMACOLOGY, vol. 12, 27 avril 2021 (2021-04-27), XP093103403, DOI: 10.3389/fphar.2021.680168 * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>16, 18-24, 27</p>	
X	<p>MURTHY HOSAKATTE NIRANJANA ET AL: "Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation", PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE (PCTOC), vol. 118, no. 1, 16 mars 2014 (2014-03-16) , pages 1-16, XP093103314, Dordrecht ISSN: 0167-6857, DOI: 10.1007/s11240-014-0467-7 Extrait de l'Internet: URL:http://link.springer.com/article/10.10 07/s11240-014-0467-7/fulltext.html> * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-27</p>	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
27 novembre 2023		Greif, Gabriela	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>			

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 917841
FR 2214243

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	GONTAR LUKASZ ET AL: "Monarda essential oils as natural cosmetic preservative systems", DEPARTMENT OF VEGETABLE AND MEDICINAL PLANTS, INSTITUTE OF HORTICULTURE SCIENCES, WARSAW UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES - SGGW, vol. 8, no. 1, 31 mars 2021 (2021-03-31), pages 29-38, XP093102413, ISSN: 2148-9637, DOI: 10.37929/nveo.772848 * le document en entier * -----	1,13,14, 17,19,22	
X	FR 3 102 365 A1 (OREAL [FR]) 30 avril 2021 (2021-04-30) * le document en entier * -----	16,18, 21-24,27	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		27 novembre 2023	Greif, Gabriela
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2214243 FA 917841**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **27-11-2023**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 3102365	A1	30-04-2021	AUCUN
