

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

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

3 051 365

②1 N° d'enregistrement national : **16 54501**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 8/97** (2017.01), A 61 K 8/64, 36/605, 38/08, 38/05, A 61 P 17/18, A 61 Q 19/00, 19/08

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 20.05.16.

③0 Priorité :

⑦1 Demandeur(s) : *INFINITUS (CHINA) COMPANY LTD*
— CN.

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 24.11.17 Bulletin 17/47.

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

⑦2 Inventeur(s) : *WU ZHIYUN, GAN Xiaoshuang, LIU GUANGRONG* et *ENNAMANY RACHID*.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

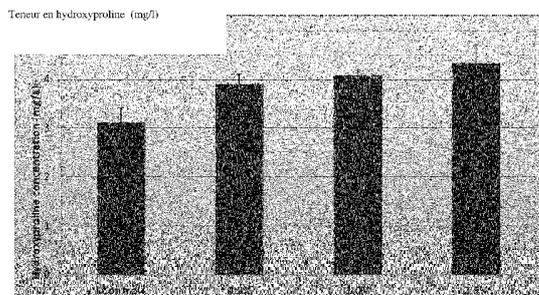
⑦3 Titulaire(s) : *INFINITUS (CHINA) COMPANY LTD*.

○ Demande(s) d'extension :

⑦4 Mandataire(s) : *CABINET NETTER*.

⑤4 **COMPOSITION COSMETIQUE A BASE DE MORUS ALBA ENRICHIE DE PEPTIDES.**

⑤7 Composition cosmétique contenant au moins (a) des cellules élicitées dédifférenciées de *Morus alba*, (b) un mélange de peptides comprenant de la carnosine, un ou des peptides de riz, l'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et oligopeptide-1, et (c) un support pour application cosmétique.



FR 3 051 365 - A1



Composition cosmétique à base de Morus alba enrichie de peptides

5

La présente invention a pour objet une composition cosmétique à base de Morus alba enrichie d'un mélange de peptides.

10 De nombreuses compositions cosmétiques à base d'extraits de plantes ont déjà été proposées pour assurer un effet anti – âge ou un effet anti – rides ou un effet régénérant l'épiderme.

Des compositions cosmétiques à base d'extrait de mûrier, en particulier de Morus
15 alba sont par exemple enseignées dans le document EP296923, ces compositions présentant une activité dépigmentante ou anti-inflammatoire lorsque l'extrait de mûrier se retrouve dans une phase lamellaire lipidique hydratée.

Par le document EP997140, on connaît une composition cosmétique et/ou
20 dermatologique renfermant en association un extrait de mûrier et au moins un dérivé d'acide salicylique, cette composition ayant un effet dépigmentant.

Par le document US7195787, on connaît une composition cosmétique à usage
25 topique protectrice de la peau contre les radicaux libres, en particulier assurant une protection contre les rayons solaires et la pollution atmosphérique. La composition comprend trois types d'agents anti-radicaux libres, dont un est un extrait de mûrier.

On connaît également par le document EP1531782 une composition cosmétique à
30 base de protéines pour éclaircir la peau, ladite composition comprenant une teneur active de protéines ou enzymes liant le cuivre, éventuellement sous la forme d'un complexe constitué d'extraits de plantes (dont le mûrier) et de sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique.

On a remarqué maintenant qu'il était possible d'obtenir une composition qui soit à la fois dépigmentante ou éclaircissante, et régénérante de l'épiderme, ladite composition ayant de plus des propriétés antioxydantes ou antiradicaux libres.

- 5 La présente invention a pour objet une composition cosmétique contenant au moins (a) des cellules élicitées dédifférenciées de *Morus alba* (non broyées ou entières et avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable), (b) un mélange de peptides comprenant de la carnosine, un ou des peptides de riz (de préférence des peptides de riz),
10 l'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et oligopeptide-1, et (c) un support pour application cosmétique, en particulier topique.
(Ala est l'abréviation de Alanine ; Asp est l'abréviation de l'acide aspartique, Leu est l'abréviation de leucine ; Lys est l'abréviation de lysine ; Pro est l'abréviation de proline, et Thr est l'abréviation de Thréonine)
- 15 Le mélange de peptides est avantageusement un mélange comprenant des peptides comprenant moins de 60 acides aminés, en particulier des peptides avec moins de 40 acides aminés, de façon préférence des peptides comprenant moins de 10 acides aminés. De préférence le mélange de peptides est constitué à plus de 50% en poids, mieux encore à plus de 70% en poids de peptides avec moins de 10
20 acides aminés.

La Carnosine est un dipeptide de la bêta-alanine et de l'histidine (numéro CAS : 305-84-0), son poids moléculaire étant de l'ordre de 226g. Elle se présente sous la forme d'une poudre blanche.

25

- Le/les peptides de riz se présente avantageusement sous une forme de solution (aqueuse) comprenant moins de 1% en poids d'extrait de riz et comprenant moins de 1% en poids d'agents de conservation (par exemple anti bactérien et anti fongique). Cette solution aqueuse de peptides de riz est par exemple du type
30 commercialisé par Vincienc sous le nom Thymophytane ®.

L'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr est un agent actif utilisé dans les crèmes cosmétiques. Ce composé est décrit dans le document "Determination of Hexapeptide ALA-ASP-LEU-LYS-PRO-THR by MALDI MS", par Anna Olejnik et al, Int. J. Pept Res Ther (2013) 19:217-224 (article qui peut être consulté librement sur Springerlink.com).

L'oligopeptide-1 est un peptide comprenant moins de 60 acides aminés. Il est également considéré comme étant une petite protéine ou comme un facteur de croissance pour l'épiderme. L'oligopeptide-1 est par exemple commercialisé sous le nom Dermatein® EGF par BioOrganic Concepts, Santa Fe Springs, CA 90670, USA. Ce produit se présente sous la forme d'une solution aqueuse comprenant 25% en poids de sulfate d'ammonium et moins de 0,01% en poids d'oligopeptide-1.

Selon des particularités avantageuses de la composition selon l'invention, la composition présente une ou plusieurs des caractéristiques suivantes, avantageusement une pluralités des caractéristiques suivantes :

- la composition contient de 0,0005 % en poids sec à 20% en poids sec, avantageusement de 0,001 à 10% en poids sec, en particulier de 0,001% à 1% en poids de cellules différenciées et élicitées de *Morus Alba* (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable, en particulier dans du glycérol), et de 0,0001 à 10% en poids sec, avantageusement de 0,0001% à 5% en poids sec, de préférence de 0,0002% à 1% en poids d'un mélange de peptides comprenant de la carnosine, un ou des peptides de riz, l'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et oligopeptide-1. Avantageusement les cellules (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable) et le mélange de peptides sont présents dans une même phase, en particulier une même phase lipidique. Et/ou
- le mélange de peptides constitués de la carnosine, un ou des peptides de riz, l'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et oligopeptide-1 comprend (par rapport au poids sec de la carnosine, de peptides de riz, d'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-

- Pro-Thr et d'oligopeptide-1) de 1 à 95% en poids (par exemple de 5 à 90% en poids, de préférence de 50 à 85% en poids) de carnosine, de 1 à 50% en poids (par exemple de 3 à 40% en poids, de préférence de 4 à 20% en poids) d'un ou de peptides de riz, de 1 à 50% en poids (par exemple de 3 à 40% en poids, de préférence de 4 à 20% en poids) d'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et de 1 à 50% en poids (par exemple de 3 à 40% en poids, de préférence de 4 à 20% en poids) d'oligopeptide-1. Et/ou
- 5 - la composition contient au moins des cellules dédifférenciées et élicitées de *Morus alba*, l'élicitation étant opérée dans une atmosphère d'air enrichi en CO₂, en alternant des périodes d'éclairage pendant 30minutes à 6 heures et des zones d'obscurité pendant 15 minutes à 2 heures. Et/ou
 - 10 - la composition contient des cellules dédifférenciées et élicitées de *Morus Alba* mélangées ou dispersées dans un véhicule acceptable pour utilisation cosmétique, en particulier dans du glycérol.. Et/ou
 - 15 - la composition comprend au moins de la glycérine ou glycérol. Et/ou
 - la composition comprend une ou des protéines hydrolysées de riz *Oryza sativa*, en particulier un mélange de protéines hydrolysées de riz *Oryza sativa*. Et/ou.
 - la composition contient une quantité efficace de cellules élicitées dédifférenciées de *Morus alba* (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable), et d'un mélange de peptides comprenant de la carnosine, un ou des peptides de riz, l'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et oligopeptide-1, pour son utilisation dans la régénération de l'épiderme. Et/ou
 - 20 - la composition contient des cellules dédifférenciées et élicitées de *Morus Alba* dispersées ou mélangées dans un véhicule cosmétiquement acceptable et présentant une taille moyenne en poids de moins de 200µm, de préférence de moins de 100µm. et/ou
 - 25 - composition adaptée pour son utilisation de soin du visage, des joues, des pommettes, des pattes d'oie, du creux orbital, des vallées des larmes, en particulier des contours des yeux. Et/ou
 - 30 - la composition se présente sous la forme de crèmes, de pâtes, de gels, de suspensions, de compositions fluides ou liquides, compositions solides ou semi-

solides, stick, bâtons, crayon, gel solide ou semi-solide à libération contrôlée.

Et/ou

- la composition contient une quantité efficace de cellules élicitées dédifférenciées de *Morus alba* (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable), et d'un mélange de peptides comprenant de la carnosine, un ou des peptides de riz, l'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et oligopeptide-1,

pour son utilisation antioxydante et/ou anti radicaux libres, et/ou

pour son utilisation de protection contre les rayons UV (UV-A et/ou UV-B), en particulier UV-B, et/ou

pour son utilisation pour induire un effet anti-âge, en particulier pour limiter le creusement de parties du visage et/ou ralentir le creusement de parties du visage, et/ou

pour son utilisation pour induire un effet hydratant de la peau, et/ou

pour son utilisation pour induire un effet antioxydant au niveau de la peau, et/ou

pour son utilisation pour assurer un effet d'homéostasie, et/ou

pour son utilisation pour assurer une cohésion cellulaire des kératinocytes, et/ou

pour son utilisation pour assurer un effet de renouvellement cellulaire par prolifération des cellules cutanées, en particulier pour accélérer ledit renouvellement cellulaire, et/ou

pour son utilisation pour assurer une diminution de la différenciation de l'épiderme, et/ou

pour son utilisation pour induire et/ou accélérer une néosynthèse du collagène.

Le procédé de fabrication de cellules dédifférenciées et élicitées de *Morus alba* (mûrier) est avantageusement un procédé du type décrit dans WO03/077881.

Dans le présent mémoire, par cellules végétales dédifférenciées, on entend toute cellule végétale ne présentant aucun des caractères d'une spécialisation particulière et capable de vivre par elle-même et non en dépendance avec d'autres cellules.

5

Les cellules végétales dédifférenciées de *Morus Alba* peuvent être obtenues à partir de matériel végétal issu de plante entière ou de partie de plante comme les feuilles, les tiges, les fleurs, les pétales, les racines, les fruits, leur peau, l'enveloppe les protégeant, les graines, les anthères, la sève, les épines, les
10 bourgeons, l'écorce, les baies, et des mélanges de ceux-ci.

Préférentiellement, les cellules végétales dédifférenciées de *Morus alba* sont obtenues à partir d'écorce, de feuilles, de bourgeons et de la peau des fruits.

Les cellules végétales dédifférenciées de *Morus alba* peuvent être obtenues à
15 partir de végétaux obtenus par culture *in vivo* ou issu de culture *in vitro*.

Par culture *in vivo* on entend toute culture de type classique c'est à dire en sol à l'air libre ou en serre ou encore hors sol ou en milieu hydroponique.

20 Par culture *in vitro*, on entend l'ensemble des techniques connues de l'homme du métier qui permet de manière artificielle l'obtention d'un végétal ou d'une partie d'un végétal. La pression de sélection imposée par les conditions physico-chimiques lors de la croissance des cellules végétales *Morus alba* *in vitro* permet d'obtenir un matériel végétal standardisé, exempt de contaminations et disponible
25 tout au long de l'année contrairement aux plantes cultivées *in vivo*.

Préférentiellement selon l'invention on utilise des cellules végétales dédifférenciées issues de culture *in vitro*. L'élicitation des cellules de *Morus alba* est de préférence opérée avec les cellules dans un milieu de culture.

Les cellules végétales dédifférenciées de *Morus alba* peuvent être obtenues par
30 toute méthode connue de l'art antérieur. A cet égard on peut citer les méthodes

décrites par E.F. George et P.D. Sherrington dans Plant Propagation by tissue culture, handbook and directory of commercial laboratories (Exegetics Ltd 1984). Les milieux de culture utilisables selon l'invention sont ceux généralement connus de l'homme du métier. On peut citer à titre d'exemples les milieux de Gamborg, Murashige et Skoog, Heller, White etc.... On trouvera dans "Plant Culture Média : formulations and uses" de E.F. George, DJM Puttock et H.J George (Exegetics Ltd 1987, tome 1 & 2) des descriptions complètes de ces milieux.

Préférentiellement selon l'invention on prépare les cellules végétales dédifférenciées de *Morus alba* cultivées sur milieu de Murashige et Skoog.

Des particularités et détails de compositions suivant l'invention ressortiront de la description suivante d'exemples de réalisation donnés à titre d'exemple uniquement.

Des tests démontrant l'efficacité des compositions cosmétiques selon l'invention seront décrits ci-après.

Dans ces tests, on a utilisé les produits suivants provenant de cellules végétales :

1. Cellules entières de *Morus alba* (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable)

Ces cellules de *Morus alba* (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable) ont été préparées de la manière suivante :

Etape 1 : Préparation de cellules dédifférenciées de *Morus alba* et cultivées dans un milieu de culture in vitro

Cette étape de préparation de cellules dédifférenciées de *Morus alba* a été réalisée de manière classique, avec des étapes de repiquage successif, à partir de tiges.

Le milieu de culture utilisé est un milieu Gamborg B5 complet (G5893) commercialisé par Sigma-Aldrich (Allemagne). D'autres milieux de culture sont possibles.

- 5 Etape 2 : repiquage des cellules dédifférenciées de *Morus alba* de l'étape 1 dans un milieu de culture in vitro pour le développement et l'élicitation des cellules de *Morus alba*.

Le développement avec élicitation des cellules de *Morus alba* de l'étape 1 a été
10 opéré dans un milieu in vitro (par exemple Gamborg B5) sous une atmosphère gazeuse contenant de l'oxygène et du CO₂ (air enrichi en CO₂ pour que sa teneur est de 2 à 5% en volume) selon un cycle comprenant 100 périodes de faible luminosité avec une luminosité de moins de 10 lux (de 1 à 5 lux) pendant 1 heure sous une atmosphère constitué d'air humide (humidité relative de 75%) enrichi de
15 CO₂ (pour que la teneur en CO₂ soit de 5%) et présentant une température de 30°C, ces périodes de développement/élicitation sous faible (voire sans) luminosité étant séparées l'une de l'autre par une période de luminosité de plus de 100000 lux pendant 1 heure sous une atmosphère constituée d'air humide (humidité relative de 75%) enrichi de CO₂ (pour que la teneur en CO₂ de
20 l'atmosphère soit de 5%) et présentant une température de 45°C. Le passage d'un état d'obscurité à un état éclairé est réalisé par le déplacement d'une paroi opaque. Cette culture est opérée en chambre blanche.

Etape 3 : Extraction des cellules de *Morus alba* dédifférenciées et élicitées en
25 milieu de culture in vitro, par exemple par filtration du milieu de culture suivi d'une ou de plusieurs étapes de lavage, en particulier opérées pour ne pas détruire la structure des membranes des cellules de *Morus alba*.

Etape 4 : mélange des cellules de *Morus alba* dédifférenciées et élicitées en
30 milieu de culture in vitro, dans un véhicule, par exemple dans du glycérol.

2. Mélange de peptides

Pour la préparation des mélanges de peptides pour les compositions selon
5 l'invention, les composés suivants ont été utilisés :

2.1 Carnosine

La Carnosine est un dipeptide de la bêta-alanine et de l'histidine (numéro CAS :
305-84-0), son poids moléculaire étant de l'ordre de 226g. Elle se présente sous
10 la forme d'une poudre blanche.

2.2 Peptides de riz

Le/les peptides de riz se présente avantageusement sous une forme de solution
15 (aqueuse) comprenant moins de 1% en poids d'extrait de riz et comprenant moins
de 1% en poids d'agents de conservation (par exemple anti bactérien et anti
fongique). Cette solution aqueuse de peptides de riz est par exemple du type
commercialisé par Vincience sous le nom Thymophytane ® contenant environ
0,3% en poids de peptides de riz.

20

2.3 Hexapeptide Ala- Asp-Leu-Lys-Pro -Thr

L'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr (ci-après nommé en abrégé hexapeptide
Ala-...-Thr) est un agent actif utilisé dans les crèmes cosmétiques. Ce composé
25 est décrit dans le document "Determination of Hexapeptide ALA-ASP-LEU-LYS-
PRO-THR by MALDI MS", par Anna Olejnik et al, Int. J. Pept Res Ther (2013)
19:217-224 (article qui peut être consulté librement sur Springerlink.com).
L'hexapeptide est commercialisé sous la forme d'une solution contenant de 0,5 à
6% en poids (en particulier environ 5%) d'hexapeptide dans un mélange constitué
30 essentiellement d'eau et de butylène glycol.

2.4 Sh-oligopeptide-1

L'oligopeptide-1 est un peptide comprenant moins de 60 acides aminés. Il est également considéré comme étant une petite protéine ou comme un facteur de croissance pour l'épiderme. L'oligopeptide-1 est par exemple commercialisé sous le nom Dermatein® EGF par BioOrganic Concepts, Santa Fe Springs, CA 90670, USA. Ce produit se présente sous la forme d'une solution aqueuse comprenant 25% en poids de sulfate d'ammonium et moins de 0,01% en poids d'oligopeptide-1.

10

Pour la préparation du mélange de peptides 1 (MP1), on a placé dans un récipient muni d'un agitateur magnétique 100ml de Dermatein® EGF (correspondant à 0,01g de sh-oligopeptide-1). Sous agitation du mélange à température ambiante, 100ml de solution à 5% en poids d'hexapeptide Ala-...-Thr et 100g de carnosine ont été ajoutés. Par après, 100ml (solution) de Thymophytane® (correspondant à 0,3g de peptides de riz) ont été agités sous agitation. Le mélange MP1 contient ainsi un large excès de carnosine, par rapport au poids total sec de carnosine, de peptides de riz, d'hexapeptide Ala-...-Thr et d'oligopeptide-1.

Pour les autres mélanges de peptides MP2 à MP10, les quantités utilisées de Dermatein® EGF sous forme de solution, d'hexapeptide Ala-...-Thr sous forme de solution, de carnosine (sous forme de poudre) et de Thymophytane® (sous forme de solution) ont été adaptées pour obtenir les proportions différentes.

Le mélange de peptides est avantageusement réalisé en présence de véhicule cosmétiquement acceptable, par exemple en présence de glycérol.

25

Mélange	MP2	MP3	MP4	MP5	MP6	MP7	MP8	MP9	MP10
Sh-olig-1 (solution en ml)	100	100	100	100	100	100	100	100	50
Hexapept. (solution en ml)	100	100	50	50	25	50	50	75	20
Carnosine (poudre en g)	50	25	25	50	25	15	5	40	15
Pept riz (solution en ml)	100	100	100	50	50	100	25	75	40

Sh-Olig-1 : sh-oligopeptide-1

Hexapept. : hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr

5 Pept riz : peptide de riz

Des compositions (avantageusement aqueuses) selon l'invention comprennent un ou plusieurs excipients pour application cosmétique. Les compositions peuvent ainsi comprendre un ou des adjuvants cosmétiques classiques notamment choisis

10 parmi les corps gras, les solvants organiques, les épaississants ioniques ou non ioniques, hydrophiles ou lipophiles, les adoucissants, les humectants, les opacifiants, les stabilisants, les émoullients, les silicones, les agents anti-mousse, les parfums, les conservateurs, les tensioactifs anioniques, cationiques, non-

15 propulseurs, les agents alcalinisants ou acidifiants ou tout autre ingrédient habituellement utilisé dans le domaine cosmétique et/ou dermatologique.

Les corps gras peuvent être constitués par une huile ou une cire autre que les cires apolaires telles que définies précédemment ou leurs mélanges. Par huile, on entend un composé liquide à température ambiante. Par cire, on entend un composé solide ou substantiellement solide à température ambiante, et dont le point de fusion est généralement supérieur à 35°C.

Comme huiles, on peut citer les huiles minérales (paraffine); végétales (huile d'amande douce, de macadamia, de pépin de cassis, de jojoba) ; synthétiques comme le perhydrosqualène, les alcools, les amides grasses (comme l'isopropyl lauroyl sarcosinate), les acides ou les esters gras comme le benzoate d'alcools comprenant de 12 à 15 atomes de carbone, le Benzoate de 2-éthylphényle, le palmitate d'octyle, le lanolate d'isopropyle, les triglycérides dont ceux des acides caprique/caprylique, le dicaprylyl carbonate, les esters et éthers gras oxyéthylénés ou oxypropylénés; les huiles siliconées (cyclométhicone, polydiméthysiloxanes) ou fluorées, les polyalkylènes, les trimellitates de trialkyle comme le trimellitate de tridécyle.

Comme composés cireux, on peut citer la cire de carnauba, la cire d'abeille, l'huile de ricin hydrogénée, les cires de polyéthylène et les cires de polyméthylène.

Parmi les solvants organiques, on peut citer les alcools et polyols inférieurs.

Ces derniers peuvent être choisis parmi les glycols et les éthers de glycol comme l'éthylène glycol, le propylène glycol, le butylène glycol, le dipropylène glycol ou le diéthylène glycol.

Comme épaississants hydrophiles, on peut citer les polymères carboxyvinyliques tels que les Carbopols ® (Carbomères) et les Pemulen ® de The Lubrizol Corporation (Copolymère acrylate/ acrylate d'alkyle avec 10 à 30 atomes de carbone) ; les polyacrylamides ; les polymères et copolymères d'acide 2-acrylamido 2-méthylpropane sulfonique, éventuellement réticulés et/ou

neutralisés ; les copolymères d'acide 2-acrylamido 2-méthylpropane sulfonique et d'hydroxyethyl acrylate; les dérivés celluloses tels que l'hydroxyéthylcellulose ; les polysaccharides et notamment les gommés telles que la gomme de Xanthane ; et leurs mélanges.

5

Comme épaississants lipophiles, on peut citer les polymères synthétiques tels que les poly alkyl (avec de 10 à 30 atomes de carbone) acrylates ou encore les argiles modifiées telles que l'hectorite et ses dérivés.

- 10 Les compositions selon l'invention peuvent être préparées selon les techniques bien connues de l'homme de l'art. Elles peuvent se présenter en particulier sous forme d'émulsion, simple ou complexe (H pour huile et E pour Eau : H/E, E/H, H/E/H ou E/H/E) telle qu'une crème, un lait ou d'un gel crème ; sous la forme d'un gel aqueux ; sous la forme d'une lotion. Elles peuvent éventuellement être
- 15 conditionnées en aérosol et se présenter le cas échéant sous forme de mousse ou de spray.

De préférence, les compositions selon l'invention se présentent sous la forme d'une émulsion / suspension huile-dans-eau ou eau-dans huile, avec ou sans

20 présence d'un alcool, avec une bonne dispersion des cellules de *Morus alba* (en particulier *Morus alba*)

Les émulsions contiennent généralement au moins un émulsionnant choisi parmi les émulsionnants amphotères, anioniques, cationiques ou non ioniques, utilisés

25 seuls ou en mélange. Les émulsionnants sont choisis de manière appropriée suivant l'émulsion à obtenir (E/H ou H/E). Les émulsions peuvent contenir également d'autres types de stabilisants comme par exemple des charges, des polymères gélifiants ou épaississants.

- 30 Comme tensioactifs émulsionnants utilisables pour la préparation des émulsions Eau/Huile, on peut citer par exemple les alkyl esters ou éthers de sorbitane, de

glycérol ou de sucres ; les tensioactifs siliconés comme les diméthicone copolyols tels que le mélange de cyclométhicone et de diméthicone copolyol, et les alkyl-diméthicone copolyols tels que le Laurylméthicone copolyol; le Cetyl diméthicone copolyol et le mélange de cétyl diméthicone copolyol, d'isostéarate de polyglycérol et de laurate d'hexyle. On peut y ajouter aussi un ou plusieurs co-émulsionnants, qui, de manière avantageuse, peuvent être choisis dans le groupe comprenant les esters alkylés de polyol.

Comme esters alkylés de polyol, on peut citer notamment les esters de polyéthylèneglycol. Comme esters de glycérol et/ou de sorbitan, on peut citer par exemple l'isostéarate de polyglycérol; l'isostéarate de sorbitan; l'isostéarate de sorbitan et le glycérol, et leurs mélanges.

Pour les émulsions H/E, on peut citer par exemple comme émulsionnants, les émulsionnants non ioniques tels que les esters d'acides gras et de glycérol oxyalkylés (plus particulièrement polyoxyéthylés) ; les esters d'acides gras et de sorbitan oxyalkylés ; les esters d'acides gras oxyalkylés (oxyéthylés et/ou oxypropylés) comme le mélange PEG-100 Stearate/ Glyceryl Stearate; les éthers d'alcools gras oxyalkylés (oxyéthylés et/ou oxypropylés) ; les esters de sucres comme le stéarate de sucrose ; les éthers d'alcool gras et de sucre, notamment les alkylpolyglucosides (APG) tels que le décylglucoside et le laurylglucoside, le cétostéarylglucoside éventuellement en mélange avec l'alcool cétostéarylique, ainsi que l'arachidyl glucoside, par exemple sous la forme du mélange d'alcools arachidique et béhénique et d'arachidylglucoside.

Parmi les autres stabilisants d'émulsion ou de suspension, on utilisera plus particulièrement les polymères d'acide isophtalique ou d'acide sulfoisophtalique, et en particulier les copolymères de phtalate / sulfoisophtalate / glycol par exemple le copolymère de Diéthylèneglycol / Phtalate / Isophtalate / 1,4-cyclohexane-diméthanol (nom INCI : Polyester-5).

Lorsqu'il s'agit d'une émulsion / suspension, la phase aqueuse de celle-ci peut comprendre une dispersion vésiculaire non ionique préparée selon des procédés connus (FR 2 315 991 et FR 2 416 008).

5 Description des figures

Les figures 1A, 1B, 1C et 1D montrent des vues histologiques respectivement d'un épiderme reconstitué témoin (non traité), d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 0,5% en poids d'agent actif par rapport au poids de l'épiderme reconstitué, d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 1% en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme reconstitué, et d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 2,5% en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme reconstitué ;

La figure 2 est un graphe représentant la densité optique à 570nm (optical density 570nm) pour un épiderme non traité (épiderme témoin "control") et pour des épidermes traités pendant 24 heures avec respectivement 0,5 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme, 1 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme, et 2,5 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme;

La figure 3 est un graphe donnant la teneur en hydroxyproline en mg/l (Hydroxyproline concentration (mg/l)) pour l'épiderme témoin (non traité – « control ») et pour les épidermes traités pendant 24 heures avec respectivement 0,5 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme, 1 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme, et 2,5 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme,

La figure 4 est un graphe donnant le nombre de cellules marquées déterminées par ce test pour l'épiderme témoin (non traité – « Control ») et pour les les épidermes traités pendant 24 heures avec respectivement 0,5 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme, 1 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme, et 2,5 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme,

Les figures 5A, 5B, 5C et 5D montrent des vues histologiques après coloration par chromogène pour révéler les sites Ki-67 respectivement d'un épiderme reconstitué témoin (non traité), d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 0,5% en poids d'agent actif par rapport au poids de l'épiderme reconstitué, d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 1% en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme reconstitué, et d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 2,5% en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme reconstitué, et

Les figures 6A, 6B, 6C et 6D montrent des vues histologiques après congélation pour déterminer la présence de filaggrine respectivement d'un épiderme reconstitué témoin (non traité – « control »), d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 0,5% en poids d'agent actif par rapport au poids de l'épiderme reconstitué, d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 1% en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme reconstitué, et d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 2,5% en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme reconstitué.

L'agent actif (MCF) est par exemple un mélange de cellules fraîches de *Morus Alba* dédifférenciées et élicitées (20ml) et de glycérol (80ml), auquel on a ajouté 20ml d'un des mélanges MP1 à MP10.

20

Exemples de composition selon l'invention

On donnera ci-après quelques exemples, non limitatifs, de compositions cosmétiques à usage topique. Dans ces exemples, on a utilisé un mélange de cellules fraîches de *Morus Alba* dédifférenciées et élicitées (20ml) et de glycérol (80ml), auquel on a ajouté 20ml d'un des mélanges MP1 à MP10. Ces mélanges contenant des cellules fraîches sont appelées de manière générale ci-après MCF.

25

Exemple 1 : Dispersion de cellules de *Morus alba* avec du glycérol dans une base cosmétique

Les cellules entières de *Morus alba* différenciées et élicitées (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable) sont dispersés dans la base suivante :

-	Eau déionisée (pour arriver à 100%)	85,41 %
5-	Huile minérale	8,00 %
-	Glycérol	0,90 %
-	Alcool cétylique	3,00 %
-	ceteareth – 20	0,75 %
-	MCF(**)	0,50 %
10-	fragrance	0,15 %
-	carbomer	0,10 %
-	méthylchloroisothiazoline et méthylisothiazoline [kathon CG]	0,065 %
-	hydroxyde de sodium (45 %)	0,06 %
15-	hydroxyanisole butylée	0,06 %

TOTAL 100,00 %

(**) provenant d'un mélange de cellules fraîches de *Morus Alba* différenciées et élicitées (20ml) et de glycérol (80ml), auquel on a ajouté 20ml d'un des mélanges MP1 à MP10

La composition obtenue montre une dispersion homogène des cellules de *Morus alba* dans la crème et une granulométrie très fine. L'étude de propriété a montré l'absence de germes et champignons ainsi qu'une remarquable stabilité de la composition.

Des compositions similaires sont préparées mais en ajoutant 1% et 2,5% de MCF, la quantité d'eau étant alors diminuée pour arriver à 100%.

Exemple 2 : Dispersion de cellules de *Morus alba* dans une base cosmétique

Les cellules de *Morus alba* différenciées sont dispersées dans la base suivante

:

	- eau (pour arriver à 100%)	45,59 %
	- laureth sulfate de sodium (25%)	36,40 %
5	- glycérol	1,00 %
	- PEG-7 glyceryl cocoate	2,00 %
	- laureth-2	1,50 %
	- laureth-11 carboxylate de sodium	4,00 %
	- cocamidopropyl bétaine & acide benzoïque	3,48 %
10	- chlorure de sodium	1,60 %
	- propylène glycol	1,00 %
	- parfum	0,13 %
	- PEG-40 huile hydrogénée de castor & propylène glycol & eau	0,50 %
15	- oleth-10	0,50 %
	- phosphate de sodium	0,30 %
	- phosphate dissodique	0,08 %
	- acide citrique (50 %)	0,52 %
	- benzoate de sodium	0,50 %
20	- MCF (**)	0,50 %
	- acide salicylique	0,20 %
	- phénoxyéthanol	0,20 %
	TOTAL	100,00 %

(**)provenant d'un mélange de cellules fraîches (entières) de *Morus Alba*
25 différenciées et élicitées (20ml) et de glycérol (80ml), auquel on a ajouté 20ml
d'un des mélanges MP1 à MP10

La composition obtenue montre une dispersion homogène des cellules de *Morus*
alba dans la crème, et une granulométrie très fine. L'étude de propriété a montré
30 l'absence de germes et champignons ainsi qu'une remarquable stabilité de la
composition.

Des compositions similaires sont préparées mais en ajoutant 1% et 2,5% de MCF, la quantité d'eau étant alors diminuée pour arriver à 100%.

Exemple 3 : Crèmes

5

-phase aqueuse A : eau déminéralisée associée à un produit hydratant

-phase huileuse B : émulsionnant + émollient ou matière émollissante + huile

-phase C : conservateur, parfum

-phase D : produit actif : cellules de *Morus alba* différenciées
10 (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable, en particulier du glycérol) avec un mélange de peptides (MP1 à MP10) sous forme d'une suspension visqueuse ou d'un gel.

Exemple 4 : Lotions

15

Lotions contenant seulement une phase aqueuse A : eau déminéralisée, propylène glycol, conservateur, parfum ; et produit actif : cellules de *Morus alba* (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable) et , avec un mélange de peptides (MP1 à MP10), sous forme d'une
20 suspension visqueuse ou d'un gel.

Exemple 5 : Shampoings

Shampoings contenant seulement une phase aqueuse A à base d'eau
25 déminéralisée, détergents, moussants, épaississants, parfum et produit actif : cellules de *Morus alba* (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable) et , avec un mélange de peptides (MP1 à MP10), sous forme d'une suspension visqueuse ou d'un gel .

30 Exemple 6 : Gels

-On considère les hydrogels et les oléogels, obtenus par adjonction à la phase aqueuse A ou à la phase huileuse B d'agents de type émulsifiant et épaississant.

-phase C : parfum, conservateur

-phase D : cellules de *Morus alba* (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable) , avec un mélange de peptides (MP1 à MP10), sous forme d'une suspension visqueuse ou d'un gel.

Exemple 7 : Solutions

Solutions contenant seulement une phase aqueuse A essentiellement à base d'eau déminéralisée, parfum, conservateur et produit actif : cellules de *Morus alba* (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable) et , avec un mélange aqueux de peptides (MP1 à MP10), sous forme d'une suspension visqueuse ou d'un gel.

15

Exemple 8 : Laits

-phase aqueuse A : essentiellement à base d'eau déionisée

-phase huileuse B : huile + émulsionnant + émollient

-phase C : conservateur + produit hydratant

-phase D : produit actif : cellules de *Morus alba* et , avec un mélange aqueux de peptides (MP1 à MP10), sous forme d'une suspension visqueuse ou d'un gel.

Dans les exemples donnés ci-dessus, concernant les crèmes, gels ou laits, les différentes phases A, B, C et D, dans des proportions qui peuvent varier entre elles en fonction des applications souhaitées, sont mélangées de manière habituelle, comme le réalise habituellement l'Homme de l'art dans ce domaine.

Concernant les lotions, solutions et shampooings, la composition à usage topique contient les différents constituants, dont on peut varier les teneurs en fonction des

30

applications, mélangés dans la seule phase aqueuse, comme le réalise habituellement l'Homme de l'art dans ce domaine.

La proportion de cellules de *Morus alba* (entières) et mélange de peptides (MP1 à MP10), est fonction de la nature de la composition à usage topique et de l'application souhaitée.

Evidemment, l'invention n'est pas limitée aux exemples de réalisation donnés ci-dessus et il est possible de réaliser la composition à usage topique sous d'autres formes, telles que huile, onguent, laques, fards (fond de teint, rouge à lèvres, crayon, mascara ou produit cosmétique permettant de surligner les yeux en colorant les cils et/ou leur donnant plus de longueur ou d'épaisseur apparente, ombre à paupières) qui entrent aussi dans le cadre de l'invention.

15

Tests d'efficacité de compositions selon l'invention

Pour ces tests, on a préparé une base cosmétique liquide (contenant de l'alcool éthylique et de l'eau) pour préparer d'une part une composition de contrôle (« témoin »), et d'autre part, une composition similaire selon l'invention (« Invention ») comprenant des cellules *Morus alba* différenciées et élicitées entière dans un véhicule de glycérol + le mélange MP1 (ledit agent actif ayant une teneur en cellules en poids sec 2% et une teneur en poids sec de peptides provenant de MP1, d'environ 0,03%).

25

Pour ces tests, on a utilisé un épiderme humain reconstitué in vitro (SkinEthic® commercialisé par Episkin, 4, rue Alexandre Fleming, F-69366 – LYON, France). Sur le site de cette société, toute information utile quant à cet épiderme reconstitué est donnée. Les cellules de kératinocyte humain ont été cultivées pendant 14 jours à l'interface air/liquide avec un milieu de culture pour SkinEthic® (milieu

30

« modified MCDB 153 Medium » commercialisé par ID Labs, Inc., Ontario, Canada, numéro de catalogue IS 1141 ; www.idlabs.com), milieu qui a été renouvelé tous les deux jours.

Après 14 jours de culture, les épidermes reconstitués étaient prêts pour les tests.

5

A Test de toxicité

La composition « témoin » (dispersion de l'exemple 1 sans cellule de *Morus alba* et sans mélange MP1) et la composition « Invention » (dispersion de l'exemple 1 avec mélange MP1) (à raison de 10µl par cm² d'épiderme reconstitué) ont été
10 mises en contact avec de l'épiderme reconstitué. Ces épidermes reconstitués traités ont été comparés avec l'épiderme reconstitué non traité.

Après un contact pendant 24 heures, les différents épidermes ont été fixés au
15 moyen d'une solution à 10% de formaldéhyde. Des sections verticales des épidermes de 4µm d'épaisseur ont été colorées au moyen d'hématoxyline et d'éosine pour examen optique des cellules aux différents niveaux de la couche de l'épiderme.

20 L'épiderme traité avec la composition « témoin » et l'épiderme traité avec la composition « Invention » avaient une structure similaire à celle de l'épiderme non traité, confirmant ainsi la viabilité cellulaire pour les épidermes traités, et dès lors l'absence de toxicité de la composition « Invention ».

25 B Test pour évaluer la viabilité cellulaire par analyse histologique et par le test MTT

Pour ce test, l'agent actif aqueux (ci-après « Agent Actif ») constitué d'agent actif de cellules *Morus alba* différenciées et élicitées (non broyées ou entière)
30 dispersées dans un véhicule de glycérol + le mélange MP1 (ledit agent actif ayant

une teneur en cellules en poids sec 2% et une teneur en poids sec de peptides provenant de MP1, d'environ 0,03% a été utilisé.

L'agent actif a été placé sur de l'épiderme reconstitué, à raison de 0,5%, 1% et
5 2,5% en poids par rapport au poids de l'épiderme, pour former des épidermes traités. L'épiderme non traité au moyen de l'agent actif sert de témoin.

Une analyse histologique a été opérée sur des échantillons d'épidermes reconstitués après coloration HES (hematoxyline-éosine-safran). Après une
10 période d'incubation de 24 heures et même de 48 heures, les épidermes reconstitués traités et non traités étaient similaires. Les figures 1A, 1B, 1C et 1D montrent des vues histologiques respectivement d'un épiderme reconstitué témoin (non traité), d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 0,5% en poids d'agent actif par rapport au poids de l'épiderme reconstitué, d'un
15 épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 1% en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme reconstitué, et d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 2,5% en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme reconstitué. Ces figures 1A à 1D montrent clairement que les épidermes traités (figures 1B à 1D) sont similaires à l'épiderme non traité
20 (épiderme témoin figure 1A).

Une description du test MTT est par exemple donnée dans :

web.mnstate.edu/provost/mtt%20proliferation%20assay%20protocol.pdf

25 Après une période de 24 heures d'incubation à 37°C des cellules de l'épiderme en présence ou non de l'agent actif, chaque puits de cellules a été vidé pour être soumis à une étape de rinçage avec le milieu de culture pour être ensuite remplacé dans un puits. Chaque puits de cellules d'épiderme a ensuite reçu une solution de MTT (MTT est un produit vendu par Sigma-Aldrich, produit numéro M5655,
30 bromure de (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; ou bleu de Thiazolylyle) à raison de 200µl (solution contenant 5mg de MTT/ml).

Les puits de cellules ont ensuite été remis à incubation pendant 4 heures à 37°C. Lors de cette incubation, des cristaux bleus de formazan sont formés en une quantité inversement proportionnelle à la succinate déshydrogénase. Chaque puits a été vidé et les cellules ont été lysées et les cristaux bleus de formazan ont été
5 dissous par addition de diméthyl sulfoxyde à raison de 200µl. Après homogénéisation de la couleur, la couleur des cellules de chaque puits a été déterminée par spectrophotométrie à 570nm.

L'analyse spectrophotométrique des échantillons d'épidermes traités avec l'agent
10 actif et non traité avec l'agent actif n'a pas montré l'existence d'une différence de densité optique à 570nm significative (différence moyenne de moins de 1,5%).

La figure 2 est un graphe représentant la densité optique à 570nm (optical density
15 570nm) pour un épiderme non traité (épiderme témoin = "control") et pour des épidermes traités pendant 24 heures avec respectivement 0,5 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme, 1 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme, et 2,5 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme. Il n'existe donc pas de différence de densité optique à 570nm entre un épiderme traité et l'épiderme témoin (non traité).

20

On peut donc en conclure que l'agent actif n'est pas toxique pour l'épiderme.

C Test sur la synthèse de collagène total

25

Après incubation de 24heures à 37°C, les épidermes reconstitués traités et non traités ont été soumis à une centrifugation pour récupérer les fibroblastes. La fraction récupérée pour chaque type d'épidermes a été soumise à une digestion par des collagénases dans une solution d'acide acétique à 0,5ml/l pendant
30 24heures à 4°C. Après centrifugation à 10000G, les collagènes sont précipités par une solution 1 molaire de NaCl. Le précipité de collagène est mis en

suspension et dialysé. Les acides aminés primaires sont déterminés par l'acide ophtaldéhyde pour éliminer leur interférence. La proline et l'hydroxyproline sont alors déterminés par l'action de NBD-Cl (4-Chloro-7-nitrobenzofurazan). NBD couplé à l'hydroxyproline est séparé et identifié par HPLC (après une étape de calibration).

Des échantillons de collagène provenant des différents épidermes (traités et non traités) analysés par HPLC ont montré, qu'après incubation de 24 heures, les épidermes traités avec l'agent actif présentaient une teneur en hydroxyproline supérieure de 25% par rapport à la teneur déterminée pour l'épiderme témoin (non traité). La teneur en hydroxyproline de l'épiderme traité avec 2,5% d'agent actif présentait même la teneur en hydroxyproline de près de 40% par rapport à la teneur du témoin.

L'agent actif (utilisé à raison de 2,5% du poids de l'épiderme) permet donc d'améliorer la synthèse du collagène total de l'épiderme de près de 40% par rapport à l'épiderme témoin.

La figure 3 est un graphe donnant la teneur en hydroxyproline en mg/l (Hydroxyproline concentration (mg/l)) pour l'épiderme témoin (non traité = « control ») et pour les épidermes traités pendant 24 heures avec respectivement 0,5 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme, 1 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme, et 2,5 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme. Cette figure montre un accroissement marqué de la teneur en hydroxyproline pour un épiderme traité avec uniquement 0,5% en poids d'agent actif par rapport au poids de l'épiderme.

D Test de détermination de l'indice mitotique

Les épidermes traités et non traité après une période d'incubation de 24 heures à 37°C ont été fixés au moyen d'une composition aqueuse à 10% en poids de

formaldéhyde. Après placement des épidermes fixés au formaldéhyde dans des blocs de paraffine, les épidermes fixés ont été coupés en tranche et ensuite traités par immunohistochimie. Cette réaction est réalisée en utilisant l'anticorps MIB1 de Immunotech (Westbrook, ME; catalogue no. 0505). La détermination est
5 obtenue par la méthode de peroxydase-antiperoxydase après prétraitement thermique. La coloration par chromogène DAB (3,3'-Diaminobenzidine) révèle en brun les sites nucléaire Ki-67 des fractions cellulaires en croissance exprimées dans les phases :

- G1 et S = phases de latence et de synthèse cellulaire
- 10 G2 = phase de libération des composés des cellules
- M = mitose

L'indice mitotique est évalué en comptant le nombre de sites nucléaires, à raison de 10 zones par couche via un microscope avec un facteur de grossissement de
15 250 fois, et doit être comparé par rapport au nombre de sites nucléaires déterminés pour l'épiderme de contrôle ou témoin.

La figure 4 est un graphe donnant le nombre de cellules marquées déterminées par ce test pour l'épiderme témoin (non traité – Control) et pour les les épidermes
20 traités pendant 24 heures avec respectivement 0,5 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme, 1 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme, et 2,5 % en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme. Cette figure montre un accroissement marqué du nombre de cellules marquées pour un épiderme traité avec uniquement 0,5% en poids d'agent actif par rapport
25 au poids de l'épiderme.

Les figures 5A, 5B, 5C et 5D montrent des vues histologiques après coloration par chromogène pour révéler les sites Ki-67 respectivement d'un épiderme reconstitué témoin (non traité), d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures
30 avec 0,5% en poids d'agent actif par rapport au poids de l'épiderme reconstitué, d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 1% en poids d'agent actif

par rapport au poids d'épiderme reconstitué, et d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 2,5% en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme reconstitué.

- 5 Cette analyse a donc permis de déterminer un accroissement de l'indice mitotique de plus de 20%, en particulier de plus de 27% pour l'épiderme traité avec 2,5% en poids d'agent actif.

E Test de détermination de la présence de filaggrine après traitement

10 immunohistologique.

Pour ce test, l'épiderme traité et non traité, après incubation de 24heures à 37°C, a été soumis à congélation à -18°C. Les épidermes congelés ont été placés dans des blocs de paraffine, avant d'être coupés en fines tranches pour examen immuno
15 histologique.

La détermination de filaggrine a été réalisée d'un point de vue quantitatif au moyen d'un examen visuel au microscope.

Les figures 6A, 6B, 6C et 6D montrent des vues histologiques après congélation
20 pour déterminer la présence de filaggrine respectivement d'un épiderme reconstitué témoin (non traité), d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 0,5% en poids d'agent actif par rapport au poids de l'épiderme reconstitué, d'un épiderme reconstitué traité pendant 24 heures avec 1% en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme reconstitué, et d'un épiderme reconstitué traité
25 pendant 24 heures avec 2,5% en poids d'agent actif par rapport au poids d'épiderme reconstitué.

Cet examen visuel a démontré pour l'épiderme témoin la présence d'une marque intense et continue de filaggrine dans la couche granuleuse. Pour les épidermes
30 traités, la forme cuniforme de filaggrine dans la couche granuleuse était moins intense, démontrant une diminution du marqueur de différenciation épidermique.

L'agent actif (cellules de *Morus alba* dédifférenciées et élicitées + mélange de peptides comprenant de la carnosine, un ou des peptides de riz, l'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et oligopeptide-1) permet donc d'obtenir une composition cosmétique non toxique, améliorant de manière significative la synthèse de collagène total, la prolifération cellulaire, tout en diminuant la différenciation épidermique. L'agent actif dans la base cosmétique permet donc une amélioration significative de la régénération des cellules de l'épiderme. Il semble qu'une interaction existe entre les cellules fraîches entières de *Morus Alba* et le mélange de peptides comprenant de la carnosine, un ou des peptides de riz, l'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et oligopeptide-1, cette interaction étant bénéfique pour une utilisation cosmétique.

Revendications

1. Composition cosmétique contenant au moins (a) des cellules élicitées dédifférenciées de *Morus alba*, (b) un mélange de peptides comprenant de la carnosine, un ou des peptides de riz, l'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et oligopeptide-1, et (c) un support pour application cosmétique.
5
2. Composition suivant la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient de 0,0005 % en poids sec à 20% en poids sec, avantageusement de 0,001 à 10% en poids sec de cellules dédifférenciées et élicitées de *Morus Alba* (avantageusement mélangées ou dispersées dans un véhicule cosmétiquement acceptable), et de 0,0001 à 10% en poids sec, avantageusement de 0,0001% à 5% en poids sec d'un mélange de peptides comprenant de la carnosine, un ou des peptides de riz, l'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et oligopeptide-1.
10
3. Composition suivant la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le mélange de peptides constitués de la carnosine, un ou des peptides de riz, l'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et oligopeptide-1 comprend de 1 à 95% en poids, avantageusement de 5 à 90% en poids, de préférence de 50 à 85% en poids de carnosine, de 1 à 50% en poids, avantageusement de 3 à 40% en poids, de préférence de 4 à 20% en poids d'un ou des peptides de riz, de 1 à 50% en poids, avantageusement de 3 à 40% en poids, de préférence de 4 à 20% en poids d'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et de 1 à 50% en poids, avantageusement de 3 à 40% en poids, de préférence de 4 à 20% en poids d'oligopeptide-1.
15
20
25
4. Composition suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle contient au moins des cellules dédifférenciées et élicitées de *Morus alba*, l'élicitation étant opérée dans une atmosphère d'air enrichi en CO₂, en alternant des périodes d'éclairage pendant 30minutes à 6 heures et des zones d'obscurité pendant 15 minutes à 2 heures.
30

5. Composition suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle contient en outre des cellules dédifférenciées et élicitées de *Morus Alba* mélangées ou dispersées dans un véhicule acceptable pour utilisation cosmétique, en particulier dans du glycérol.
6. Composition suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins de la glycérine ou glycérol.
7. Composition suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend une ou des protéines hydrolysées de riz *Oryza sativa*.
8. Composition suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle contient une quantité efficace de cellules élicitées dédifférenciées de *Morus alba*, et d'un mélange de peptides comprenant de la carnosine, un ou des peptides de riz, l'hexapeptide Ala-Asp-Leu-Lys-Pro-Thr et oligopeptide-1, pour son utilisation dans la régénération de l'épiderme.
9. Composition suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle contient des cellules dédifférenciées et élicitées de *Morus Alba* dispersées ou mélangées dans un véhicule cosmétiquement acceptable et présentant une taille moyenne en poids de moins de 200 μ m, de préférence de moins de 100 μ m.
10. Composition suivant l'une quelconque des revendications précédentes, pour son utilisation de soin du visage, des joues, des pommettes, des pattes d'oie, du creux orbital, des vallées des larmes, en particulier des contours des yeux.
11. Composition suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme de crèmes, de pâtes, de gels, de

suspensions, de compositions fluides ou liquides, compositions solides ou semi-solides, stick, bâtons, crayon, gel solide ou semi-solide à libération contrôlée.

11. Composition suivant l'une quelconque des revendications précédentes,
5 caractérisée en ce qu'elle contient une quantité efficace une quantité efficace de cellules élicitées dédifférenciées de *Morus alba*, et d'un mélange de peptides comprenant de la carnosine, un ou des peptides de riz, l'hexapeptide ALA-ASP-LEU-LYS-PRO-THR et oligopeptide-1,

pour son utilisation antioxydante et/ou anti radicaux libres, et/ou
10 pour son utilisation de protection contre les rayons UV, en particulier UV-B, et/ou

pour son utilisation pour induire un effet anti-âge, en particulier pour limiter le creusement de parties du visage et/ou ralentir le creusement de parties du visage, et/ou

15 pour son utilisation pour induire un effet hydratant de la peau, et/ou pour son utilisation pour induire un effet antioxydant au niveau de la peau, et/ou

pour son utilisation pour assurer un effet d'homéostasie, et/ou pour son utilisation pour assurer une cohésion cellulaire des kératinocytes,
20 et/ou

pour son utilisation pour assurer un effet de renouvellement cellulaire par prolifération des cellules cutanées, en particulier pour accélérer ledit renouvellement cellulaire, et/ou

pour son utilisation pour assurer une diminution de la différenciation de
25 l'épiderme, et/ou

pour son utilisation pour induire et/ou accélérer une néosynthèse du collagène.

1/6

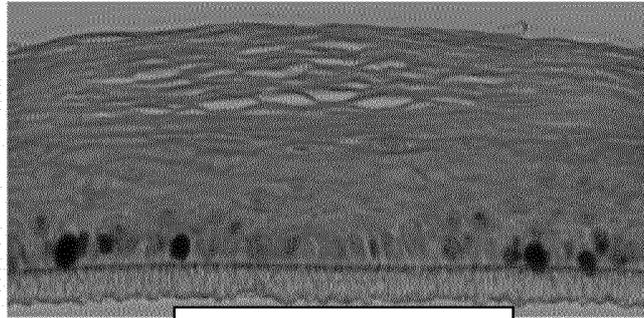


FIG 1A

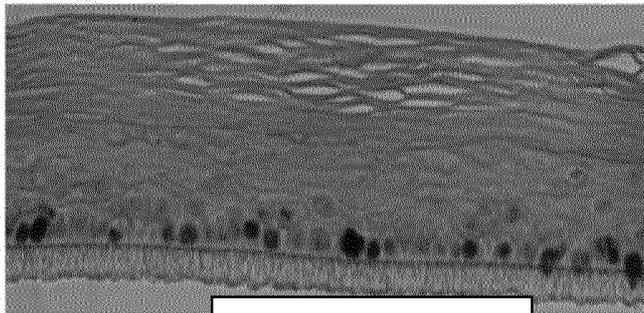


FIG 1B

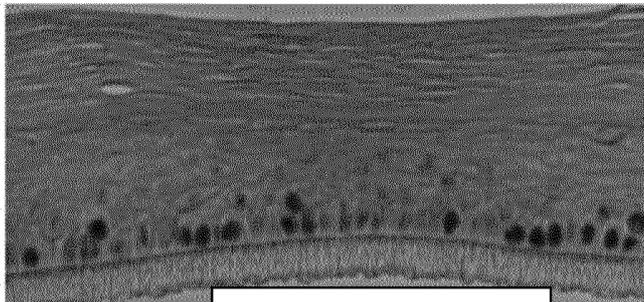


FIG 1C

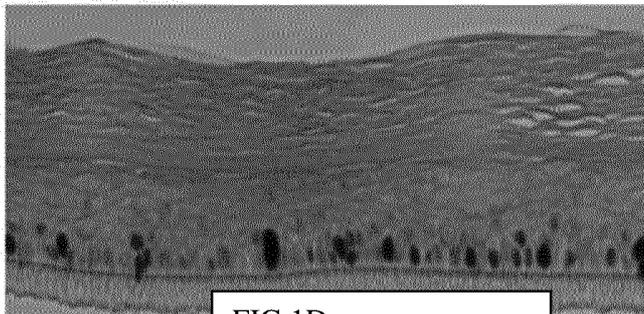


FIG 1D

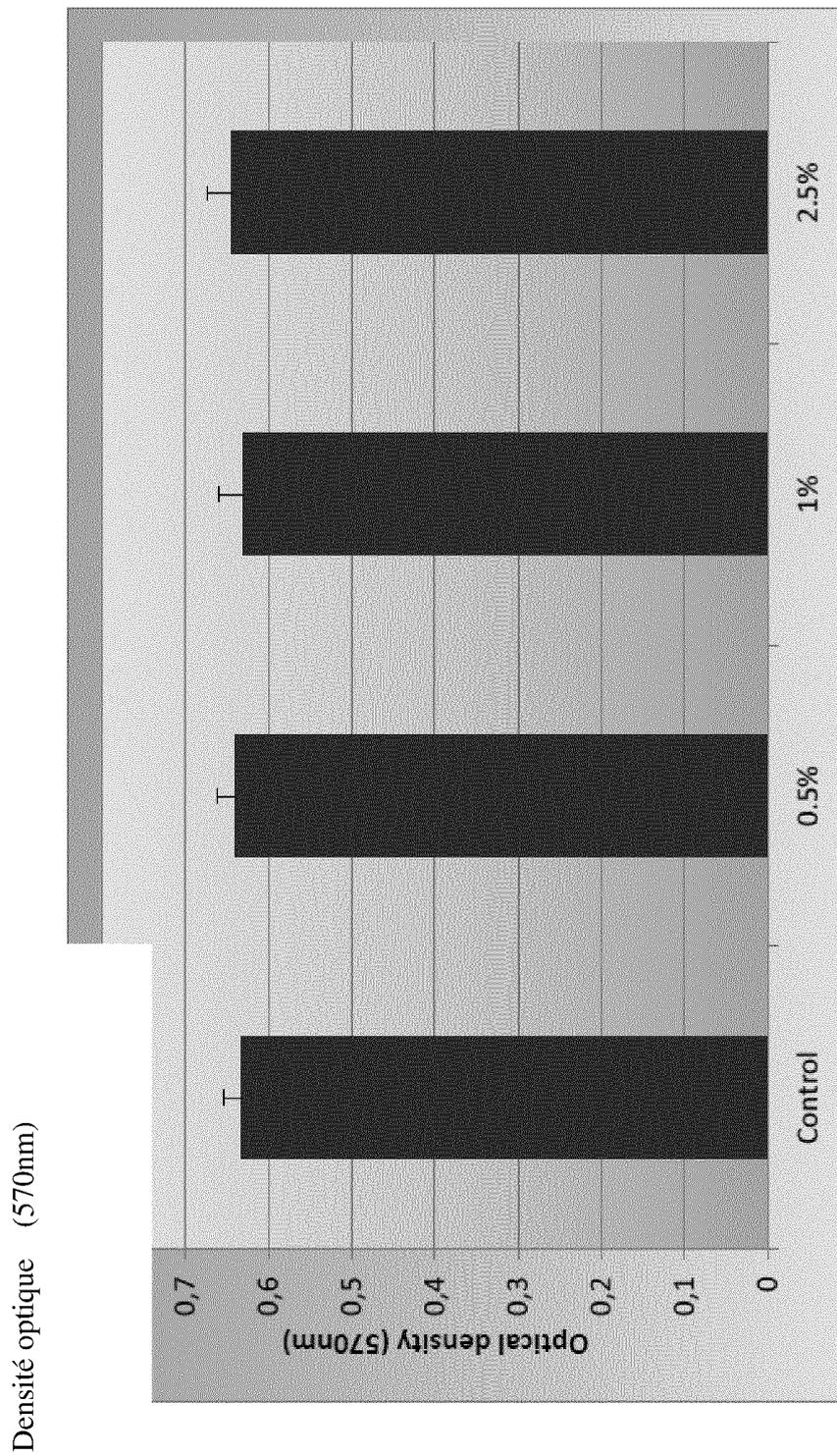


FIG 2

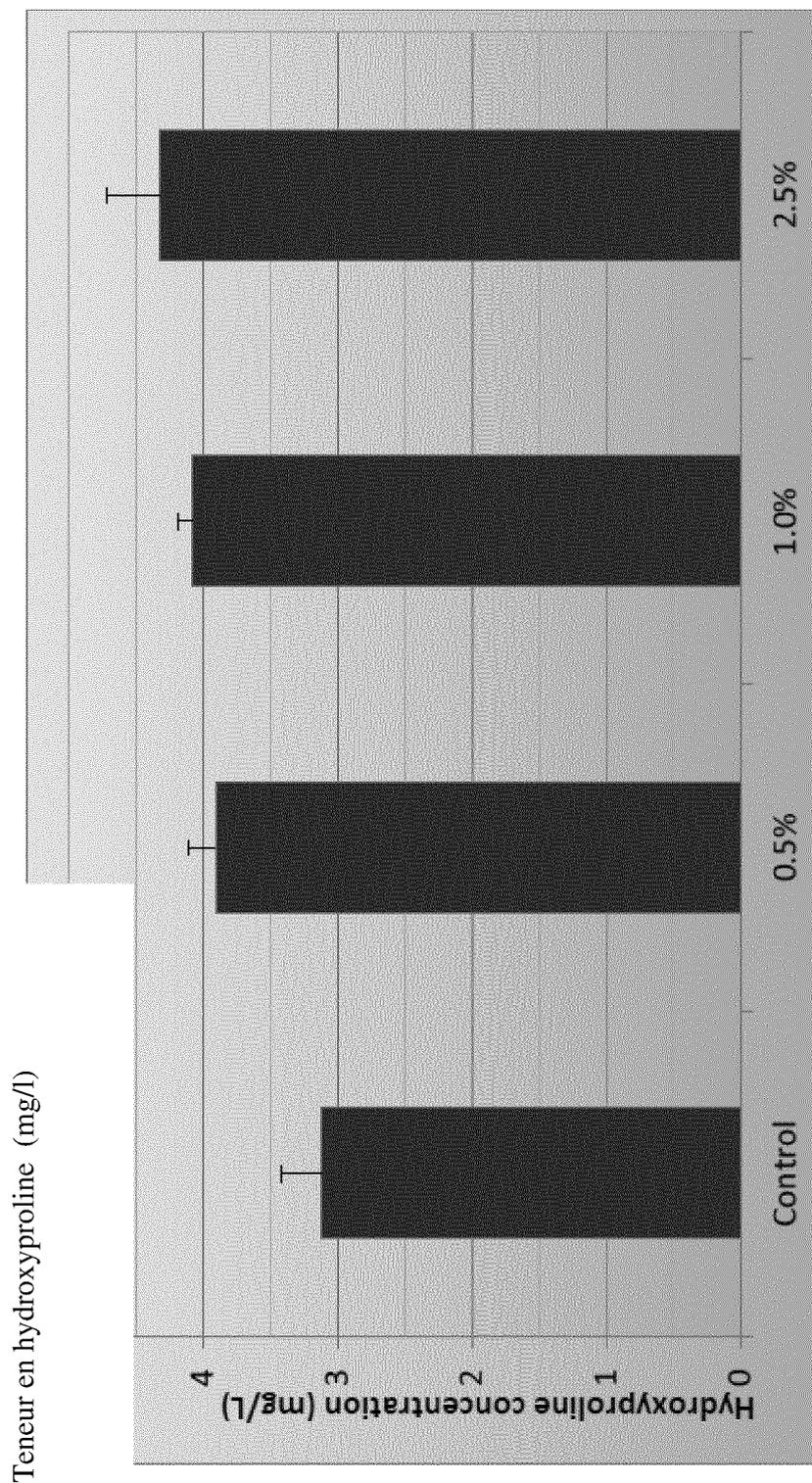


FIG 3

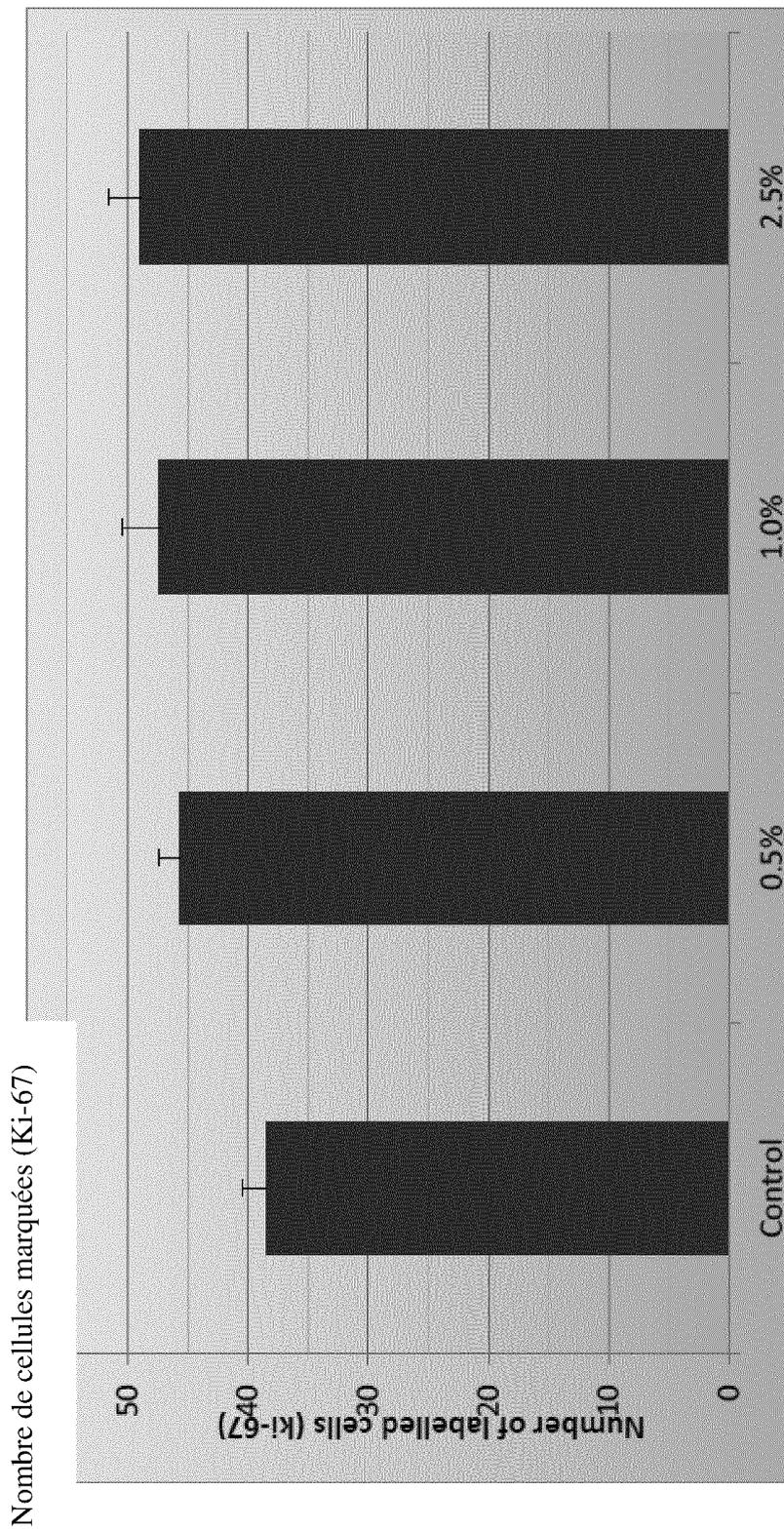


Fig 4

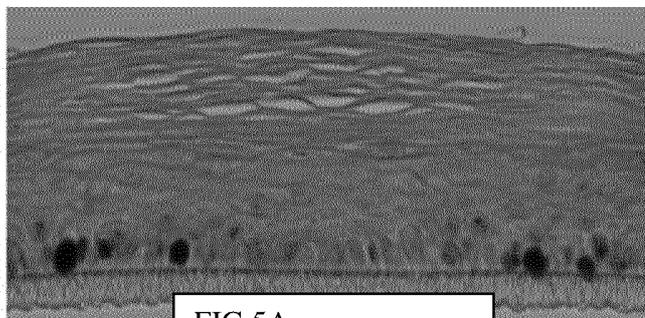


FIG 5A

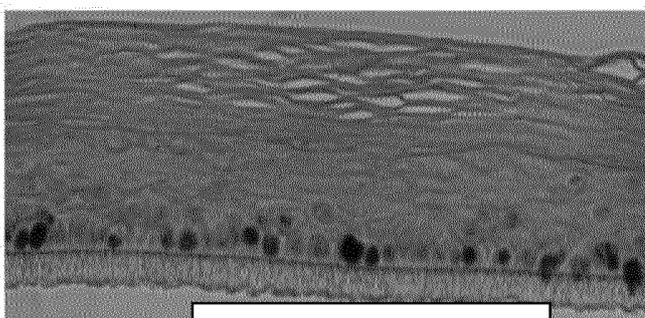


FIG 5B

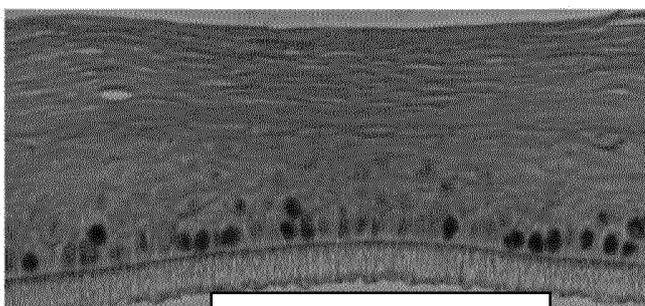


FIG 5C

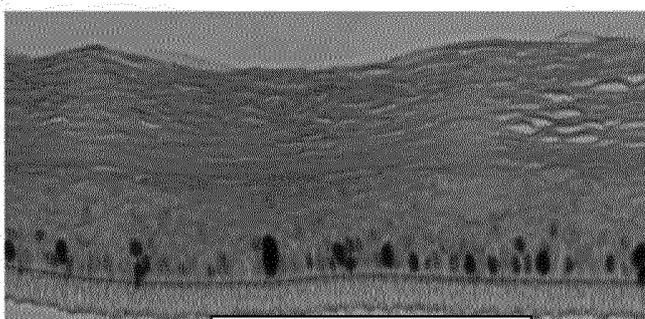


FIG 5D

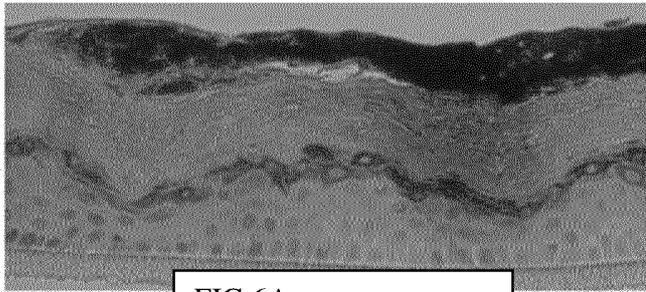


FIG 6A

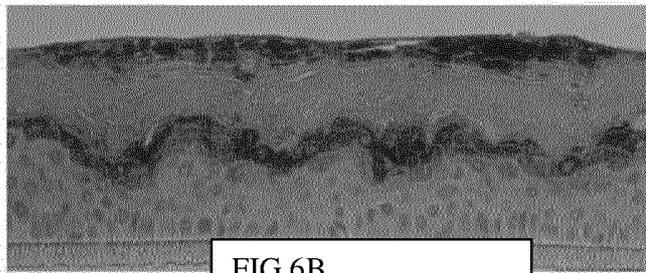


FIG 6B

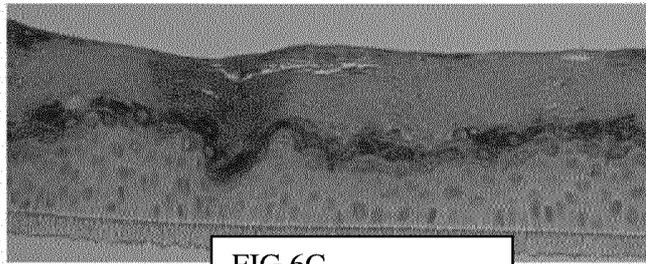


FIG 6C

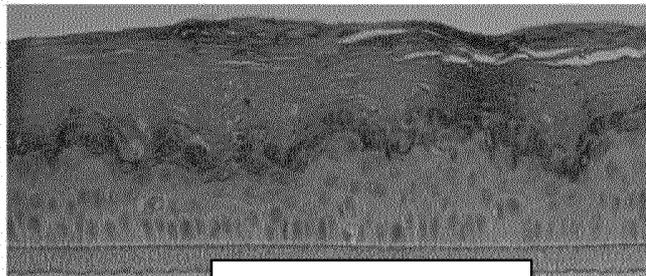


FIG 6D

SEQUENCE LISTING - Listage de séquences

<110> Infinitus (China) Company Ltd

<120> Composition cosmétique à base de Morus alba enrichie de peptides

<130> 121988

<140> FR1654501

<141> 2016-05-20

<160> 2

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence / Séquence artificielle

<220>

<223> Synthetic construct / construction synthétique

<300>

<301> Anna Olejnik, Izabela Nowak, Krystian Eitner, Grzegorz Schroeder

<302> Determination of Hexapeptide ALA-ASP-LEU-LYS-PRO-THR by MALDI MS

<303> Int J Pept Res Ther

<304> 19

<306> 217-224

<307> 2013

<308> DOI 10.1007/s10989-012-9334-8

<400> 1

Ala Asp Leu Lys Pro Thr

1 5

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement
national

FA 827652
FR 1654501

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	Anonyme: "There is no eternal youth", BIO-FD&C Life Science for Happiness 11 juin 2015 (2015-06-11), pages 1-20, XP002763906, Extrait de l'Internet: URL:http://www.in-cosmeticsasia.com/_nova documents/291733?v=636106766733930000 [extrait le 2016-11-08] * pages 6,8; composé Mulberry Callus Culutre Extract *	1-11	A61K8/97 A61K8/64 A61K36/605 A61K38/08 A61K38/05 A61P17/18 A61Q19/00 A61Q19/08 A61K8/64 A61Q19/08 A61K8/97
A	WANG A.M. ET AL.: "Use of Carnosine as a Natural Anti-Senescence Drug for Human Beings", BIOCHEMISTRY, vol. 65, no. 7, juillet 2000 (2000-07), pages 869-871, XP002763907, (MOSCOW) * page 871, colonne de gauche, alinéa 2 *	1-11	
A	FR 2 895 261 A1 (VINCIENCE SA [FR]) 29 juin 2007 (2007-06-29) * pages 1-3; revendications; exemples *	1-11	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K A61Q
A,D	ANNA OLEJNIK ET AL: "Determination of Hexapeptide ALA-ASP-LEU-LYS-PRO-THR by MALDI MS", INTERNATIONAL JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH AND THERAPEUTICS, vol. 19, no. 3, 25 novembre 2012 (2012-11-25), pages 217-224, XP055317230, NL ISSN: 1573-3149, DOI: 10.1007/s10989-012-9334-8 * page 217 - page 218 *	1-11	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		8 novembre 2016	Steffen, Pierre
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			

4

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 827652
FR 1654501

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	Anonymous: "Dermatein(R) EGF Product Information", BioOrganic concepts 10 avril 2013 (2013-04-10), page 1, XP002763908, Extrait de l'Internet: URL:http://www.essentialingredients.com/pdf/Dermatein%20EGF%20TDS.pdf [extrait le 2016-11-08] * le document en entier * -----	1-11	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; janvier 2013 (2013-01), "Firming Night Moisturizer", XP002763909, Database accession no. 1959789 * le document en entier * -----	1-11	
A	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; mars 2016 (2016-03), "Luxe Bloom Serum", XP002763910, Database accession no. 3875817 * le document en entier * -----	1-11	
A	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; mai 2015 (2015-05), "The Eye & Lips Solution", XP002763911, Database accession no. 2967503 * le document en entier * -----	1-11	
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 novembre 2016		Steffen, Pierre	
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			

4

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement
national

FA 827652
FR 1654501

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; mai 2013 (2013-05), "Be Firm The Ultimate Lifting Serum", XP002763912, Database accession no. 2450951 * le document en entier * -----	1-11	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 novembre 2016		Steffen, Pierre	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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		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	

4

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1654501 FA 827652**

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 **08-11-2016**

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2895261	A1	FR 2895261 A1	29-06-2007
		WO 2007077318 A2	12-07-2007
