

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 084 261**

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

②1 N° d'enregistrement national : **18 57081**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **A 61 K 8/98** (2018.01), A 61 K 35/56, A 61 P 17/00,  
A 61 Q 19/08

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 30.07.18.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 31.01.20 Bulletin 20/05.

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) : BCR Société par actions simplifiée —  
FR.

⑦2 Inventeur(s) : CANAC François, RÉVELEAU Philippe  
et BARONNET Jean Julien.

⑦3 Titulaire(s) : BCR Société par actions simplifiée.

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 COMPOSITIONS COSMETIQUES OU DERMATOLOGIQUES.

⑤7 La présente invention concerne un hydrolysate alcalin  
de chair d'huître et ses utilisations cosmétiques et dermato-  
logiques pour le traitement des signes du vieillissement tels  
que rides ou taches ou pour l'amélioration de la fermeté de  
la peau et l'obtention d'un effet tenseur cutané.

FR 3 084 261 - A1



## COMPOSITIONS COSMETIQUES OU DERMATOLOGIQUES

La présente invention concerne un nouvel extrait d'huitre, en particulier de chair d'huitre ainsi que les compositions pharmaceutiques et cosmétiques le contenant, plus particulièrement celles destinées à une application topique, leur procédé de préparation et leurs utilisations en dermatologie ou cosmétologie, notamment dans le traitement de désordres cutanés tels que des altérations de texture de la peau, de couleur de la peau, de transparence de la peau, une irritation et l'apparition de rides.

Le vieillissement cutané résulte de deux processus distincts et indépendants qui font intervenir des facteurs intrinsèques ou extrinsèques. Le vieillissement extrinsèque correspond au vieillissement provoqué par les facteurs environnementaux divers et variés et correspond plus particulièrement au photo-vieillissement dû à l'exposition au soleil mais aussi aux polluants, au tabac, etc. Il a pour conséquence des altérations telles que des rides plus ou moins épaisses, l'apparition de taches ainsi que la formation d'une peau « parcheminée ».

Le vieillissement intrinsèque ou chrono-biologique correspond au vieillissement normal ou physiologique lié à l'âge et traduit notamment par un ralentissement du renouvellement des cellules de l'épiderme et l'apparition de fines rides ou ridules. Ainsi avec l'âge, la peau perd une partie de l'eau retenue dans la matrice extracellulaire, subit alors un processus de vieillissement qui aboutit à une augmentation de la fibrose et à une baisse de l'élasticité des fibres. Au cours du processus de vieillissement, on observe une modification de la structure et des fonctions cutanées.

Les principaux signes cliniques du vieillissement cutané sont l'apparition de ridules et de rides profondes, qui augmentent bien évidemment avec l'âge. Les sillons et les rides se marquent ; la peau se creuse et perd sa fermeté ; en surface, la peau perd sa luminosité.

Parmi les facteurs extrinsèques, comme indiqué, on peut citer l'exposition aux variations de températures et d'humidité ou l'exposition aux polluants, aux UV, .... Parmi les facteurs intrinsèques affectant l'éclat du teint de la peau, on peut citer le stress, la fatigue, des changements hormonaux, une déshydratation de l'épiderme ou une altération de la fonction barrière de la peau, c'est-à-dire encore tous les facteurs associés au vieillissement chronobiologique.

Ces facteurs extrinsèques et intrinsèques tendent à brouiller le teint, à le rendre inhomogène, terne, cireux, à favoriser voire aggraver la présence d'imperfections cutanées,

rides, ridules, tâches pigmentaires, taches de vieillesse. Ces altérations du teint, souvent d'origine multifactorielle, sont une cause de plus en plus fréquente de consultations en centre de soins esthétiques ou auprès des dermatologues.

5 Ces dernières années, divers hydrolysats obtenus par hydrolyse enzymatique de protéines végétales et animales avec diverses enzymes protéolytiques ont été étudiés pour leurs activités physiologiques, et ils ont été utilisés pour divers aliments transformés, assaisonnements, shampoings, cosmétiques, etc.

10 Par exemple KR101841088 décrit un extrait d'huitre obtenu par protéolyse de chair d'huitre via des protéases ajoutées, à pH acide. Ledit extrait enrichi en peptides issus de la protéolyse enzymatique par protéases exogènes est utilisé pour le traitement des rides.

15 La Demanderesse a mis en évidence de manière surprenante qu'un extrait de chair d'huitre, obtenu par hydrolyse alcaline, donc sans protéolyse enzymatique ni ajout de protéases exogènes, présentait des propriétés très intéressantes pour le traitement des signes de vieillissement cutanés et pour stimuler la croissance cellulaire cutanée.

20 Les compositions selon l'invention peuvent être utilisées dans des préparations topiques, dans le domaine de la dermatologie ou de la cosmétologie, dans le but de prévenir ou de traiter les signes de vieillissement pour lesquels il sera nécessaire de diminuer les rides, de lutter contre le vieillissement cutané photoinduit ou non, de relancer l'activité cellulaire épidermique et dermique, et ainsi de raffermir la peau, d'augmenter son élasticité, de prévenir ou traiter les tâches, voire de stimuler la cicatrisation.

C'est ainsi que la présente invention concerne, selon un mode de réalisation, un extrait d'huitre obtenu par hydrolyse alcaline de chair d'huitre.

25 Par l'expression « huitre », on entend ici faire référence à un mollusque bivalve de la famille des Ostreidae.

Plus particulièrement on fait référence aux espèces *Pycnodonta*, *Crassostrea* ou *Ostrea*.

Le genre des *Pycnodonta* rassemble les espèces des huîtres de fond, elles vivent dans des endroits ne découvrant jamais (jusqu'à 2000m). Elles ont une coquille très ronde et faite de vacuoles.

Les *Crassostrea* sont des huîtres de l'estran (partie du littoral découvrant à chaque marée). La reproduction a lieu à l'extérieur de la coquille, au hasard des rencontres entre ovules et spermatozoïdes.

5 Le genre *Ostrea* vit dans les zones toujours immergées ou découvrant qu'occasionnellement et a un mode de reproduction différent : la fécondation se fait à l'intérieur de la coquille, puis les larves sont rejetées vers le monde extérieur.

Une huître est constituée de deux valves, ou coquilles, enfermant une partie charnue. Cette partie charnue comprend, le manteau, les branchies, la laitance selon la saison et le muscle adducteur.

10 Dans le cadre de la présente invention, on fait référence à un extrait de « chair d'huître », il s'agit d'un extrait obtenu à partir de la partie charnue, c'est-à-dire, l'ensemble comprenant le manteau et les branchies, la laitance le cas échéant, et tout ou partie du muscle adducteur.

De manière préférentielle, la chair d'huître utilisée comprend la laitance de l'huître.

15 L'extrait selon l'invention est un extrait obtenu par hydrolyse alcaline de la chair d'huître.

La chair d'huître peut être fraîche ou congelée, entière, coupée ou broyée puis soumise à une étape d'hydrolyse alcaline.

20 Par l'expression « hydrolyse alcaline » de la chair d'huître, on entend ici que la chair d'huître est mise à incuber avec un composé alcalin, à pH compris entre 8 et 13, particulièrement entre 9 et 12. En particulier, cette hydrolyse est réalisée sans ajout d'une quelconque enzyme extérieure, particulièrement sans ajout d'enzyme protéolytique extérieure.

L'hydrolyse alcaline selon l'invention n'est pas une protéolyse enzymatique compte tenu de l'absence d'addition de protéase et du pH auquel est menée cette hydrolyse.

25 Le composé alcalin peut être toute base, en particulier une base forte, telle que NaOH ou KOH, ou encore  $(\text{Ca}(\text{OH})_2)$  ou  $\text{NH}_4\text{OH}$ , en quantité et à une concentration permettant l'obtention du pH voulu.

Selon un mode de réalisation préféré, l'extrait selon l'invention est susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'invention décrit ci-après. Un tel procédé de préparation d'un extrait selon l'invention comprend une étape de macération de chair d'huître, en particulier de chair

avec laitance, en milieu alcalin à un pH compris entre 8 et 13, particulièrement entre 9 et 12, plus particulièrement encore environ 11.

Particulièrement, la chair d'huitre, crue fraîche ou congelée, éventuellement réduite en morceaux et/ou broyée, est mélangée avec une base, de préférence une base, en particulier une base forte et l'ensemble est laissé à incuber, de préférence à température ambiante, pendant 2 à 12 heures, en particulier pendant 3 à 9 heures, plus particulièrement environ 6 heures.

La chair d'huitre pourra être préalablement égouttée afin d'éliminer l'eau en excédent et éviter la dilution du milieu d'hydrolyse alcaline. Par chair d'huitre égouttée, on entend ici de la chair d'huitre contenant entre 80 et 90%, en poids, d'eau.

Le mélange en incubation peut être agité par tout moyen adéquat, soit en continu soit par intermittence.

La base choisie peut être NaOH, KOH,  $(\text{Ca}(\text{OH})_2)$  ou encore  $\text{NH}_4\text{OH}$ , en quantité et à une concentration suffisante pour atteindre le pH souhaité.

Typiquement, la base, telle que NaOH,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $(\text{Ca}(\text{OH})_2)$  ou KOH, par exemple, aura une concentration de 0.5 à 2 M, particulièrement 1 M.

Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, l'hydrolyse alcaline est réalisée sous agitation ou de façon statique, à une température comprise entre 2°C et 37°C, en particulier entre 2°C et 25°C, plus particulièrement entre 2°C et 20°C, plus particulièrement encore entre 2°C et 15°C, voire encore entre 2°C et 10°C.

Elle peut être assistée par ultra-sons ou par extrusion..

La durée de l'hydrolyse peut être comprise entre 1 minute et 48 heures, plus particulièrement encore environ 3 à 10 heures, et plus particulièrement environ 6 heures.. L'extraction peut être renouvelée une fois, voire 2 à 3 fois.

Le ratio volume de base/masse de chair d'huitre peut varier de 15 :1 à 2 :1, particulièrement de 15 :1 à 5 :1, plus particulièrement de l'ordre de 10 :1.

Ce ratio sera variable en fonction de la concentration de la base et de la quantité d'eau contenue dans la chair d'huitre. Le ratio n'est pas critique en soit et sera déterminé en fonction de ces paramètres afin d'obtenir un pH du mélange à incuber compris dans la

gamme comprise entre 8 et 13, particulièrement entre 9 et 12, plus particulièrement environ 11.

Après l'étape d'incubation en milieu alcalin tel qu'indiqué supra, le mélange est neutralisé par ajout d'un acide afin d'obtenir un pH du milieu de l'ordre de 4 à 7, particulièrement de 4 à 6, plus particulièrement de 4 à 5 La neutralisation peut être effectuée par tout acide convenable, faible ou fort, par exemple choisi parmi acide citrique, acide sulfurique, acide acétique ou tout autre acide convenable.

Le mélange neutralisé ou ensuite soumis à une étape de séparation liquide/solide afin de récupérer la phase liquide limpide débarrassée de particules en suspension.

10 Toute technique adéquate telle que filtration, centrifugation permettant d'éliminer les morceaux, particules et débris cellulaires est convenable. Typiquement, l'étape de séparation liquide/solide est réalisée afin d'éliminer les particules de taille supérieure à 20  $\mu\text{m}$ .

Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, la phase solide est ensuite séparée par centrifugation ou filtration afin de récupérer une phase liquide limpide exempte de particules. La filtration peut être réalisée sur papier filtre ou plaque de filtration présentant un seuil de coupure compris entre 5 et 20  $\mu\text{m}$ , particulièrement entre 10 et 20  $\mu\text{m}$ . Des filtres ou plaques de filtration adaptés peuvent être choisis parmi la gamme de plaques de filtration en profondeur série K de chez Pall®. De telles plaques sont composées d'un mélange équilibré de fibres de cellulose, de terres de diatomées, et de perlite, ce qui permet la création d'une matrice bien définie. On pourra choisir ainsi des plaques Pall® série K de type K300 à K900 par exemple. La phase liquide représentant l'extrait peut être plus ou moins concentrée pouvant aller jusqu'à l'obtention d'un extrait sec.

25 La phase liquide limpide obtenue constitue un extrait selon l'invention.

La matière sèche d'un extrait selon l'invention ainsi obtenu peut être comprise entre 2 et 15%, particulièrement entre 2 et 12%, particulièrement aux environs de 10%, en % massique. Cette matière sèche de l'extrait comprend la matière organique de l'huitre hydrolysée mais aussi les composés ajoutés, base pour l'hydrolyse et acide pour la neutralisation.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, un support peut aussi être rajouté lors de l'étape de concentration de façon à obtenir un extrait contenant 1 à 75% d'extrait sec ou matière sèche.

5 Le support peut être de la maltodextrine, du lactose, de la silice, de la glycérine, un glycol, ou tout autre support cosmétologiquement acceptable et solubilisant l'extrait, préférentiellement d'origine biosourcée comme par exemples des glycols biosourcés (1,2-pentanediol ; 1,3-butanediol ; 1,3-propanediol...), et également les hydrotropes comme par exemple les alkyls glycosides (Sepiclear, Apyclean, APXC4...).

10 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, l'extrait peut être décoloré, par exemple sur charbon actif.

L'extrait ainsi obtenu peut être utilisé tel quel ou plus ou moins concentré, voire séché sous forme de poudre avec ou sans support de séchage.

15 L'extrait, sans support, peut ainsi être concentré sous vide jusqu'à un taux massique de matière sèche compris entre 5 et 30%, préférentiellement entre 5 et 20% et plus particulièrement encore entre 5 et 15%, voire plus particulièrement aux environs de 10%.

La concentration peut être réalisée thermiquement (à une température préférentiellement inférieure à 50°C et sous vide) afin d'augmenter les degrés Brix et stabiliser vis à vis de contaminations microbiologiques.

20 L'extrait peut également être séché seul ou sur un support (par exemple maltodextrine, amidon ou lactose par exemple).

25 De manière avantageuse, l'extrait concentré correspond à un extrait correspondant à 1.5 à 8 grammes d'extrait pour 1 gramme de chair d'huitre, plus particulièrement entre 2 et 6 grammes d'extrait pour 1 gramme de chair d'huitre, plus particulièrement encore environ 3 à 5 grammes d'extrait pour 1 gramme de chair d'huitre, plus particulièrement environ 4 grammes d'extrait pour 1 gramme de chair d'huitre. Il s'agit ici de chair d'huitre égouttée.

30 Le procédé de fabrication de l'extrait est caractérisé en ce qu'aucune enzyme exogène n'est ajoutée au mélange. En particulier aucune protéase n'est ajoutée au mélange chair d'huitre et base.

L'hydrolyse de la matière organique de l'huitre consiste donc en une hydrolyse alcaline et la matière organique est ainsi réduite en ses composants organiques et minéraux essentiellement solubles. Dans cette hydrolyse alcaline, la combinaison du mouvement de l'eau, de sa température, et de son alcalinité accélère le processus de dissolution et  
5 décomposition des tissus, qui après quelques heures de traitement, disparaissent donnant un liquide coloré riche en aminoacides, peptides, glucides, savons d'acides gras, nucléotides, sels, etc.

Selon mode particulier de réalisation, l'extrait d'huitre selon l'invention comprenant en %  
10 en poids, par rapport à la matière sèche de l'extrait, de 1 % à 10 % d'acides aminés libres ; de 3 % à 12 % de protéines ou peptides, de 0.005 % à 0.05% de sucres totaux et de 0.1% à 1% de polyphénols.

La quantité d'acide aminés libres, en % en poids, par rapport à la matière sèche de l'extrait, pourra être comprise entre 1 et 8 % ; celle de protéines ou peptides, en % en poids, par  
15 rapport à la matière sèche de l'extrait, entre 5 et 10% ; celle de sucres totaux, en % en poids, par rapport à la matière sèche de l'extrait, entre 0.01 et 0.05% et celle de polyphénols, en % en poids, par rapport à la matière sèche de l'extrait, entre 0.1 et 0.5%. Les % sont exprimés en % en poids par rapport à la matière sèche de l'extrait. Comme  
20 indiqué plus avant, la matière de l'extrait comprend la matière organique de l'huitre mais aussi plus ou moins de composés ajoutés pour l'hydrolyse (i.e. base) et pour la neutralisation (i.e. acide).

C'est aussi un objet de la présente invention que de fournir une composition dermatologique ou cosmétique comprenant un extrait d'huitre selon la présente invention et un excipient  
25 dermatologiquement ou cosmétiquement acceptable.

La composition pharmaceutique ou cosmétique selon l'invention comprend un extrait selon l'invention tel que défini précédemment en mélange avec au moins un excipient pharmaceutiquement ou cosmétiquement acceptable. Il s'agit de préférence d'une  
30 composition topique au niveau de la peau, en particulier au niveau de la peau du visage et/ou de la peau des mains.

Dans la présente invention, on entend désigner par « pharmaceutiquement ou cosmétiquement acceptable » ce qui est utile dans la préparation d'une composition pharmaceutique ou cosmétique, qui est généralement sûr, non toxique et ni biologiquement

ni autrement non souhaitable et qui est acceptable pour une utilisation pharmaceutique ou cosmétique, et en particulier dermatologique ou cosmétique, notamment par application topique. Les compositions selon l'invention sont avantageusement destinées à une application topique, en particulier sur la peau. De préférence, les excipients cosmétiquement acceptables sont adaptés à une administration topique. Les excipients acceptables permettent en particulier d'assurer une bonne stabilité, une texture et un toucher agréables. Il peut aussi s'agir par exemple d'agents de formulations ou d'additifs d'usage connu et classique en cosmétique : on peut citer des tensioactifs, colorants, conservateurs, parfums, agents filmogènes, épaississants, etc.

10

Les compositions selon l'invention pourront ainsi se présenter sous les formes qui sont habituellement connues pour une administration topique, c'est à dire notamment les lotions, les mousses, les gels, les dispersions, les émulsions, les sprays, les sérums, les masques ou les crèmes, avec des excipients permettant notamment une pénétration cutanée afin d'améliorer les propriétés et l'accessibilité du principe actif.

15

Avantageusement, il s'agira d'une crème. Ces compositions contiennent généralement, outre l'extrait selon la présente invention, un milieu physiologiquement acceptable, en général à base d'eau ou de solvant, par exemple des alcools, des éthers ou des glycols. Elles peuvent également contenir des agents tensioactifs, des agents complexant, des conservateurs, des agents stabilisants, des émulsifiants, des épaississants, des gélifiants, des humectants, des émoullients, des oligo-éléments, des huiles essentielles, des parfums, des colorants, des agents matifiants, des filtres chimiques ou minéraux, des agents hydratants.

25

Selon un mode de réalisation, la composition dermatologique ou cosmétique selon l'invention est caractérisée en ce que la quantité d'extrait d'huitre selon l'invention est comprise entre 0,01 % et 10 % en poids par rapport au poids total de la composition, plus particulièrement entre 0.05 % et 5% en poids par rapport au poids total de la composition. Ce pourcentage pourra varier en fonction du taux de matière sèche de l'extrait et de sa concentration.

30

Typiquement, la composition dermatologique ou cosmétique selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme orale ou topique, préférentiellement sous forme topique.

35

L'objet de la présente invention vise l'utilisation cosmétique, particulièrement non thérapeutique, d'un extrait selon l'invention ou d'une composition dermatologique ou cosmétique contenant ledit extrait selon la présente invention ou de cette composition dermatologique ou cosmétique selon l'invention pour lutter contre les signes du vieillissement cutané.

L'utilisation cosmétique de l'extrait selon la présente invention ou la composition cosmétique ou dermatologique selon l'invention est plus particulièrement destinée à redonner de la matière à la peau, renforcer sa fermeté et réduire visiblement les rides marquées et les sillons profonds.

La présente invention concerne également une méthode pour lutter contre les signes du vieillissement cutané comprenant l'administration, de préférence topique, d'une quantité efficace d'un extrait selon l'invention ou d'une composition cosmétique ou dermatologique selon l'invention à une personne en ayant besoin.

Un autre objet de la présente invention concerne une composition dermatologique destinée à accélérer la réparation cutanée afin de rétablir l'intégrité et la qualité de la peau comprenant en tant que principe actif dermatologique ou cosmétique l'extrait selon l'invention et comprenant en outre au moins un excipient dermatologiquement ou cosmétiquement acceptable.

Selon un mode de réalisation, la présente invention vise ainsi l'utilisation d'une composition cosmétique pour la prévention et/ou le traitement des désordres cutanés, ladite composition cosmétique comprenant, à titre de principe actif, un extrait d'huitre selon la présente invention.

Dans un mode de réalisation, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que les désordres cutanés se manifestent par des altérations de texture, de couleur, de transparence de la peau, une irritation et l'apparition de rides.

Plus particulièrement, les désordres cutanés sont consécutifs à un stress environnemental. Selon un mode de réalisation particulier, le stress environnemental est causé par le soleil, le tabac.

Selon une alternative, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la composition se présente sous une forme orale ou topique, préférentiellement sous forme topique.

De manière préférentielle la forme topique est choisie parmi le groupe comprenant des crèmes, des gels, des pommades et des sprays.

Dans un mode de réalisation ou l'utilisation vise une forme orale, celle-ci est caractérisée en ce que cette forme orale est choisie parmi le groupe comprenant des comprimés, des gélules et des poudres pour suspensions buvables. La composition selon la présente invention peut être administrée par voie orale ou toute autre voie d'administration pharmaceutique. Les compositions selon la présente invention peuvent être formulées pour l'administration aux mammifères, y compris l'homme. Ces compositions sont réalisées de façon à pouvoir être administrées par voie orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, transdermique. Dans ce cas, le ou les ingrédients actifs peuvent être administrés sous formes unitaires d'administration, en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques, aux animaux ou aux êtres humains.

Dans le cas d'un complément alimentaire ou d'un médicament, les formes galéniques suivantes peuvent être envisagées : gélules, comprimés à avaler, comprimés à croquer, comprimés effervescents, pastilles, pilules, poudres, granules, solutions ou suspensions orales et les formes d'administration sublinguale et buccale. La forme galénique préférentielle est la gélule. Lorsque l'on prépare une composition solide sous forme de comprimé, on mélange l'extrait selon l'invention avec un véhicule pharmaceutique tel que la gélatine, l'amidon, le lactose, le stéarate de magnésium, le talc, la gomme arabique, la silice ou analogues. On obtient une préparation en gélules en mélangeant l'extrait selon l'invention avec un diluant (étape facultative) et en versant le mélange obtenu dans des gélules molles ou dures. Une préparation sous forme de sirop ou d'élixir peut contenir l'extrait selon l'invention conjointement avec un édulcorant, un agent donnant du goût et un colorant approprié. Les poudres ou les granules dispersibles dans l'eau peuvent contenir l'extrait selon l'invention en mélange avec des agents de mise en suspension, de même qu'avec des correcteurs du goût ou des édulcorants.

Avantageusement, la composition selon la présente invention est destinée à une administration par voie orale.

Un autre objet de la présente invention est une composition selon l'invention pour son utilisation comme médicament.

Un autre objet de la présente invention vise un extrait ou une composition selon la présente invention pour son utilisation pour stimuler la croissance cellulaire et favoriser la cicatrisation.

Ainsi l'invention vise encore une composition dermatologique comprenant un extrait d'huître selon l'invention et un excipient dermatologique acceptable, pour son utilisation pour le traitement de la cicatrisation et de l'irritation cutanée.

- 5 L'invention vise encore une méthode de traitement cosmétique, en particulier non thérapeutique, de la peau destinée à améliorer, prévenir ou traiter les désordres cutanés comprenant, ou consistant en, l'application sur la peau d'une composition cosmétique selon l'invention.
- 10 La méthode de traitement cosmétique selon l'invention est caractérisée en ce que l'amélioration des désordres cutanés comprend l'amélioration des signes associés au vieillissement cutané, en particulier un effet choisi parmi : l'amélioration des rides, l'amélioration de la fermeté de la peau et l'obtention d'un effet tenseur cutané.
- 15 La méthode de traitement cosmétique de la peau selon l'invention est aussi caractérisée en ce que l'amélioration des désordres cutanés associés au vieillissement cutané comprend le traitement des taches de vieillesse et l'éclaircissement du teint.

#### EXEMPLE 1 : Prélèvement chair d'huître

- 20 Environnement du prélèvement : en pièce fermée.
- Matériel à prélever = huîtres laiteuses à coquilles " propres" (bien brosser et rincer les coquilles avant ouverture) ;
- Matériel et accessoires = sacs de congélation + Bac de glace qui servira à poser les sacs de chair d'huîtres.
- 25 Les huîtres sont ouvertes et la chair (manteau, muscle, laitance) est prélevée puis déposée dans un sac reposant sur de la glace.
- Une fois fermé, le sac est pesé et conservé jusqu'à encore 30 minutes sur la glace avant de placer le sachet au congélateur à -18°C ou -20°C.

- 30 EXEMPLE 2 : Obtention de l'extrait par hydrolyse alcaline et caractérisation

L'extrait issu d'hydrolyse alcaline est réalisé à partir d'huîtres « laiteuses » congelées, maintenues en carboglace dès leur extraction de la coquille.

L'approche hydrolytique choisie est la voie alcaline, et plus particulièrement une solution de NaOH à 1 M.

- 5 La chair d'huître (env. 200 g égoutté) est mélangée avec 200 ml d'une solution de NaOH 1 M afin d'obtenir un pH de la solution de 10 à 11 environ.

Après un temps de contact de 6 heures sous agitation à température ambiante et à l'obscurité, le mélange est ensuite neutralisé à l'acide citrique pour obtenir un pH d'environ 4.7.

- 10 Le mélange est filtré sur filtre de cellulose puis concentré sous vide de sorte à obtenir 4 g d'extrait pour 1 g d'huître fraîche. L'extrait ainsi obtenu présente un taux de matière sèche de 10 %.

L'extrait obtenu présente les caractéristiques suivantes :

<b>Extrait Huître</b>	<b>Quantité (en % en poids par rapport à la matière sèche de l'extrait )</b>
Protéines	7,8 %
Polyphénols Totaux	0,3%
Sucres Totaux	0,01%
Acides aminés libres	2 %

- 15 Dosage des protéines

Les protéines totales sont testées selon la méthode de Lowry. Pour ce dosage colorimétrique, une courbe étalon  $DO_{750nm}=f(\text{quantité de protéines})$  est réalisée. La protéine de référence utilisée au cours de cette expérience est la sérum-albumine bovine (BSA). La détermination de la quantité totale en protéines dans chaque extrait est obtenue

- 20 en utilisant le même protocole que celui réalisé pour la gamme étalon.

Dosage des polyphénols

Les polyphénols totaux sont évalués selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu. Pour ce dosage colorimétrique, une courbe étalon  $DO_{720nm}=f$  est réalisée à partir de concentrations croissantes d'une molécule de référence. Le polyphénol de référence utilisé au court de cette expérience est l'acide gallique. La détermination de la quantité totale en polyphénols dans chaque extrait est obtenue en utilisant le même protocole que celui réalisé pour la gamme étalon.

#### Dosage des sucres

Les sucres totaux sont évalués selon la méthode d'hydrolyse à l'acide sulfurique et à l'anthrone. Pour ce dosage colorimétrique, une courbe étalon  $DO_{578nm}=f$  est réalisée à partir de concentrations croissantes d'une molécule de référence. Le sucre de référence utilisé au court de cette expérience est le glucose. La détermination de la quantité totale en sucres dans chaque extrait est obtenue en utilisant le même protocole que celui réalisé pour la gamme étalon.

#### 15 EXEMPLE 3 : ETUDES DE PROPRIETES BIOLOGIQUES DE L'EXTRAIT

L'extrait utilisé est celui obtenu selon l'exemple 1, présentant un taux de matière sèche de 10%.

Il est utilisé après dilution dans de l'eau Ultra Pure. Les concentrations de l'extrait sont : 0.5%, 1.5% et 4.5% p/v (en grammes d'extrait pour 100 mL d'eau).

20

**Test sur banc d'essai avec microbilles de collagènes** / Mesure de l'effet Tenseur Dans ce modèle des disques de collagène lyophilisé de 8 mm de diamètre sont utilisés. La contraction de ces disques en réponse aux différents traitements est mesurée par analyse d'image. Plus la surface des disques de collagène diminue, plus l'effet tenseur des actifs est important.

25

Le produit de référence utilisé dans cette étude est l'albumine sérique bovine à 100 mg/ml.

Les disques de collagène de 8 mm de diamètre sont imbibés avec 40  $\mu$ l d'eau ultra pure (contrôle), du produit de référence et des concentrations croissantes du produit à l'essai.

- **RESULTAT Effet tenseur**
- Pour extrait à 1,5% / résultat + 49,4% ;
- Pour Extrait à 4,5% / résultat +56,5%

#### 5 **Tests sur cultures de cellules de peaux humaines normales / inhibition Mélanine :**

Ce modèle d'étude utilise des mélanocytes humains normaux obtenus à partir du prépuce d'un donneur âgé de 4 ans. Les mélanocytes sont isolés et cultivés en monocouche jusqu'à confluence. Les cellules sont alors incubées pendant 72H en absence (Contrôle) ou présence d'un produit de référence (contrôle positif) ou concentrations croissantes du produit à tester.

Le produit de référence (contrôles positif) est l'acide Kojique à 250 µM.

A la fin de la période d'incubation, la quantité de mélanine intra-cellulaire est évaluée dans le lysat cellulaire par mesure spectro-photométrique à 405 nm.

#### **RESULTAT Effet inhibiteur de mélanine :**

15 Extrait à 0,5%; Résultat : -17,1%

#### **Effet stimulant sur la production de Pro-collagène de type I**

Ce modèle d'étude utilise des fibroblastes humains normaux obtenus sur une femme donneuse de 68 ans. Les fibroblastes sont isolés et cultivés en monocouche jusqu'à confluence. Les cellules sont alors incubées pendant 48 H en absence (contrôle) ou présence d'un produit de référence (contrôle positif) ou concentrations croissantes du produit à tester.

Le produit de référence (contrôles positif) est le TGF-Béta à 1 ng/ml et 10 ng/ml.

Après 48 H d'incubation, la quantité de pro-collagène de type I produite dans le milieu de culture est évaluée grâce à un kit Elisa sensible et spécifique.

#### **RESULTAT : stimulation production de procollagène de type I :**

Extrait à 0.015% ; Résultat+18%

- **Tests enzymatiques**

#### **Effet inhibiteur de collagénase de Type I**

5 Ce système d'essai est réalisé à partir de collagénases de type I purifiées produites par Clostridium histolyticum, et d'un substrat spécifique détectable selon une méthode colorimétrique. La consommation de ce substrat par les collagénases de type I est suivie par mesure de la DO (Densité Optique) avec un spectromètre à la longueur d'onde de 405 nm toutes les 3 minutes. La période d'incubation pour ces mesures est de 45 minutes.

10 Un témoin de référence (à savoir l'EDTA à 2,5 mM) a été utilisé afin de vérifier la capacité de modulation et notamment d'inhibition des enzymes à l'essai.

#### **RESULTAT sur inhibition Collagénase Type I**

Extrait à 0,15% ; résultat : - 67,3%

Extrait à 0,5% ; résultat -82,2%

Extrait à 1,5% ; résultat -91,1%

15

#### **Effet inhibiteur sur collagénases totales**

20 Ce système d'essai est réalisé à partir des collagénases semi-purifiées issues du milieu de culture d'une culture de fibroblastes humains normaux, et d'un substrat spécifique détectable selon une méthode colorimétrique. La consommation de ce substrat par les collagénases totales est suivie par mesure de la DO (Densité Optique) avec un spectromètre à la longueur d'onde de 405 nm toutes les 3 minutes. La période d'incubation pour ces mesures est de 45 minutes.

25 Un témoin de référence (à savoir l'EDTA à 2,5 mM) a été utilisé afin de vérifier la capacité de modulation et notamment d'inhibition des enzymes à l'essai.

#### **RESULTAT sur inhibition collagénases totales**

Extrait à 0,5% ; résultat -18,7%

Extrait à 1,5% ; résultat -44,7%

### CONCLUSION :

L'extrait (à 10% de matière sèche), et ce dès la dose de 1% montre un effet tenseur qui à la surface de la peau peut apporter un effet de tension de sorte à gommer les rides. La stimulation de la production de pro-collagène de type I sur culture de fibroblastes montre que l'extrait issu d'hydrolyse alcaline de chair d'huître améliore le contenu de la matrice extracellulaire du tissu cutané en augmentant les fibres associées à la fermeté de la peau. Cette capacité permet également d'envisager du comblement de ride. Fort de cette hypothèse, nous écartons tout effet leurre (la dégradation des fibres de collagènes stimule par réaction la production de collagène, donc toute stimulation de l'activité des collagénases pourrait prétendre à stimuler indirectement la production de collagène).

Cette performance est confortée par la capacité de l'extrait à stopper la dégradation du collagène par inhibition de l'enzyme collagénase de type I et plus généralement de toutes les collagénases, tout effet leurre est ainsi écarté, nous observons bien une réelle capacité biologique de l'extrait à stimuler le pro-collagène de type I. Enfin, l'extrait permet de limiter la production de mélanine dès la dose de 0,5%, cette propriété concoure à limiter les tâches de vieillesse, mais aussi à éclaircir le teint.

## RENDICATIONS

1. Extrait d'huitre obtenu par hydrolyse alcaline de chair d'huitre.
  
- 5 2. Extrait d'huitre selon la revendication 1 comprenant en % en poids, par rapport à la matière sèche de l'extrait, de 1 % à 10 % d'acides aminés libres ; de 3 % à 12 % de protéines ou peptides, de 0.005 % à 0.05% de sucres totaux et de 0.1% à 1 % de polyphénols.
  
- 10 3. Composition dermatologique ou cosmétique comprenant un extrait d'huitre selon la revendication 1 ou 2 et un excipient dermatologiquement ou cosmétiquement acceptable.
  
- 15 4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que la quantité d'extrait d'huitre est comprise entre 0,01 % et 10 % en poids par rapport au poids total de la composition.
  
- 20 5. Composition selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisée en ce que la composition se présente sous une forme orale ou topique, préférentiellement sous forme topique.
  
- 25 6. Composition cosmétique selon l'une des revendications 3 à 5 pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement des désordres cutanés, ladite composition cosmétique comprenant, à titre de principe actif, un extrait d'huitre selon l'une des revendications 1 ou 2 en association avec un excipient cosmétiquement acceptable.
  
- 30 7. Composition pour son utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que les désordres cutanés se manifestent par des altérations de texture, de couleur, de transparence de la peau, et l'apparition de rides.
  
- 35 8. Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce que les désordres cutanés sont consécutifs à un stress environnemental.

9. Composition pour son utilisation selon la revendication 8 caractérisée en ce que le stress environnemental est causé par le soleil, le tabac.
- 5 10. Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 6 à 9, caractérisée en ce que la composition se présente sous une forme orale ou topique, préférentiellement sous forme topique.
- 10 11. Composition pour son utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que la forme topique est choisie parmi le groupe comprenant des crèmes, des gels, des pommades et des sprays.
- 15 12. Composition pour son utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que la forme orale est choisie parmi le groupe comprenant des comprimés, des gélules et des poudres pour suspensions buvables.
- 20 13. Composition selon l'une des revendications 3 à 5 pour son utilisation dans l'amélioration des signes associés au vieillissement cutané, en particulier choisi parmi : l'amélioration des rides, l'amélioration de la fermeté de la peau et l'obtention d'un effet tenseur cutané, le traitement des taches de vieillesse et l'éclaircissement du teint..
14. Composition dermatologique comprenant un extrait d'huitre selon l'une des revendications 1 ou 2 et un excipient dermatologiquement acceptable, pour son utilisation pour le traitement de la cicatrisation et de l'irritation cutanée.

**RAPPORT DE RECHERCHE  
 PRÉLIMINAIRE**

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

 N° d'enregistrement  
 national

 FA 858619  
 FR 1857081

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	FR 2 798 140 A1 (IFREMER [FR]) 9 mars 2001 (2001-03-09) * page 1, colonnes 3-5 * * page 7, ligne 18 - ligne 27 * * page 8, ligne 8 - ligne 17 * * page 9, ligne 22 - ligne 29 * * page 8, ligne 25 - ligne 28 * * revendications 8-10 * -----	1-14	A61K8/98 A61K35/56 A61P17/00 A61Q19/08
X	JP H07 102252 A (MIKIMOTO SEIYAKU KK) 18 avril 1995 (1995-04-18) * abrégé * -----	1-14	
A	JP S59 128321 A (MIMURA YASUMASA) 24 juillet 1984 (1984-07-24) * abrégé * -----	1-14	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			A61Q A61K A61P
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
3 avril 2019		Verrucci, Marinella	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		.....	
		& : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1857081 FA 858619**

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 **03-04-2019**

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 2798140	A1	09-03-2001	AT 279931 T	15-11-2004
			AU 7296500 A	10-04-2001
			DE 60015156 T2	02-02-2006
			EP 1207892 A1	29-05-2002
			FR 2798140 A1	09-03-2001
			US 6841171 B1	11-01-2005
			US 2005074423 A1	07-04-2005
			WO 0117538 A1	15-03-2001
-----				
JP H07102252	A	18-04-1995	AUCUN	
-----				
JP S59128321	A	24-07-1984	AUCUN	
-----				