

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
—  
**INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**  
—  
COURBEVOIE  
—

①1 N° de publication : **3 066 114**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)  
②1 N° d'enregistrement national : **18 70189**  
⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **A 61 K 8/97 (2018.01), A 61 Q 5/00, A 61 Q 19/08**

⑫

## BREVET D'INVENTION

**B1**

⑤4 COMPOSITION COMPRENANT UN EXTRAIT AQUEUX D'ANETHUM GRAVEOLENS ENRICHÉ EN PETITS ARN ET SES UTILISATIONS COSMÉTIQUES.

②2 Date de dépôt : 22.02.18.

③0 Priorité : 12.05.17 FR 1770486.

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 16.11.18 Bulletin 18/46.

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

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : *ISP INVESTMENTS LLC* —US et *JALA GROUP CO.* — CN.

⑦2 Inventeur(s) : *BONNANS MAGALI, BOTTO JEAN-MARIE, CHABERT RACHEL, OGER ELODIE, DOS SANTOS MORGAN* et *JIANG SHANSHAN.*

⑦3 Titulaire(s) : *ISP INVESTMENTS LLC, JALA GROUP CO.*

⑦4 Mandataire(s) : *AXE PI.*

**FR 3 066 114 - B1**



COMPOSITION COMPRENANT UN EXTRAIT AQUEUX D'ANETHUM GRAVEOLENS  
ENRICHIS EN PETITS ARN ET SES UTILISATIONS COSMÉTIQUES

L'invention concerne un procédé d'obtention d'un extrait  
5 d'*Anethum graveolens* aqueux enrichi en petits ARN (acides  
ribonucléiques) d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides (nt)  
ainsi que les extraits obtenus par le procédé et les compositions  
cosmétiques comprenant de tels extraits et leurs utilisations  
cosmétiques.

10 La famille des Apiacées (*Apiaceae*), appelées aussi Ombellifères,  
est constituée de plantes dicotylédones et comprend près de 3000  
espèces réparties en 420 genres surtout présentes dans les  
régions tempérées du monde. Cette famille inclut aussi des herbes  
comme le persil, la coriandre, le fenouil. *Anethum graveolens*,  
15 fait partie de la famille des *Apiaceae*. Son nom d'espèce admet  
plusieurs synonymes tels que *Anethum sowa*, *Peucedanum graveolens*  
et *Peucedanum sowa* (Janeen et al ; The Herb Society of America's  
Essential Guide to Dill. Kirtland, Ohio: The Herb Society of  
America, 2009). L'aneth odorant (*Anethum graveolens*) est  
20 largement répandue dans le monde et est une espèce très riche en  
différentes familles de molécules telles que des huiles  
essentielles, des acides gras, des protéines, des carbohydrates,  
de la furanocoumarine, des polyphénols, des minéraux et encore  
beaucoup d'autres molécules biologiquement actives. Elle est  
25 notamment très utilisée en médecine traditionnelle. Le nom de  
l'aneth dérive d'un mot grec «aneeson» ou « aneeton » et signifie  
« forte odeur ». Cette plante a une histoire longue et ancienne  
dans de nombreux pays comme une herbe culinaire et médicinale.  
Son utilisation est commune en médecine ayurvédique (médecines  
30 traditionnelles de l'Inde), principalement pour lutter contre  
l'inconfort abdominal et l'indigestion) (Jana et Shekhawat  
Shekhawat GS. Phytochemical Analysis and Antibacterial Screening  
of in vivo and in vitro Extracts of Indian Medicinal Herb:  
*Anethum graveolens*. Res. J. Med. Plant. 2010a; 4(4):206-212.  
35 2010; Janeen et al., The Herb Society of America's Essential

Guide to Dill. Kirtland, Ohio: The Herb Society of America, 2009). En France et dans plusieurs autres pays de l'Europe de l'ouest cette plante fait partie de nombreuses préparations médicinales traditionnelles pour ses propriétés digestives et fortifiantes qui subsistent encore aujourd'hui. La littérature scientifique décrit notamment des effets antimicrobien, anti-inflammatoire, analgésique, une protection des muqueuses respiratoires et des effets comme relaxant musculaire.

De nombreux extraits de graines d'aneth sont décrits dans la littérature en partie pour l'utilisation de ses huiles essentielles, en revanche peu d'études ont été réalisées sur des extraits issus des parties aériennes de l'aneth. De plus la plupart des extractions décrites d'aneth sont effectuées avec des solvants organiques de type apolaire et peu sont issus d'extraction avec un solvant polaire comme l'eau. De plus très peu de ces extraits sont revendiqués pour une utilisation cosmétique.

Malgré les différents produits cosmétiques anti-âge sur le marché pour le traitement de la peau, il reste un besoin de compositions cosmétiques efficaces appliquées topiquement qui présentent des effets anti-âges pour la peau et les cheveux en utilisant des ingrédients naturels comme agent actif.

Les produits dits « non naturels » et synthétisés chimiquement peuvent être perçus comme dangereux pour l'environnement ainsi que pour les personnes. En revanche, les produits naturels sont perçus comme supérieurs aux produits synthétisés chimiquement. De nombreux produits naturels extraits de plantes ou d'herbes sont connus pour contenir des agents antioxydants / radicaux libres qui peuvent neutraliser les effets des dégâts des radicaux libres tels que les polyphénols. L'aneth est une plante très riche en composés phénoliques et d'autres familles de molécules reconnues pour leurs effets bénéfiques sur la peau. En particulier, le procédé d'extraction décrit dans l'invention

permet d'enrichir l'extrait final avec des ARN de petit poids moléculaire.

Les protocoles d'extraction des acides ribonucléiques (ARN de petit poids moléculaire) classiquement décrits sont adaptés  
5 aux pratiques de laboratoire, et donc réalisés à petite échelle. Ils utilisent des solvants qui ne sont pas considérés comme des solvants cosmétiques (Zumbo, P. 2014 "Phenol-chloroform Extraction", 2014). De plus, ces protocoles d'extraction et purification ne permettent d'obtenir que la fraction d'acides  
10 nucléiques purifiée. Cette fraction d'acides nucléiques ARN ou ADN ou petits ARN est dépourvue de toute autre molécule d'intérêt telle que les métabolites secondaires, vitamines, sucres, peptides, etc. qui peuvent avoir des effets bénéfiques pour la peau et présentent donc un intérêt cosmétique.

15 L'invention a pour premier objet un procédé d'obtention d'un extrait aqueux d'*Anethum graveolens* enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides à partir d'une matière végétale comprenant les étapes suivantes :

a) Solubilisation des parties aériennes d'aneth avec de  
20 l'eau ;

b) auquel on ajoute de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) tétrasodique dans le mélange obtenu en a), le pH du mélange étant compris entre 10,5 et 11 ;

c) on ajuste ensuite le pH du mélange obtenu en b) à une  
25 valeur comprise entre 6 et 8 ;

d) on purifie le mélange obtenu en séparant la matière soluble de celle qui est insoluble c) de manière à récupérer un extrait brut aqueux ; et

e) on réalise au moins une filtration de l'extrait brut  
30 aqueux pour obtenir l'extrait aqueux enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides dont le pH est contrôlé et si nécessaire réajusté à une valeur comprise entre 6 et 8, préférentiellement entre 6 et 6,5.

De plus, l'invention a pour deuxième objet un extrait aqueux des parties aériennes d'*Anethum graveolens* enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides et dépourvu d'ADN, obtenu par le procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend en poids du poids total de l'extrait, de 5 à 30 g/kg d'extrait sec, 0,5 à 10 g/kg de fragments protéiques, 0,5 à 10 g/kg de sucres, 0,1 à 3 g/kg d'acides aminés, 50 à 2000 mg/kg de composés phénoliques et 10 à 100 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

10 L'invention a pour troisième objet une composition comprenant, en tant qu'agent actif anti-âge, un extrait selon l'invention, et un milieu physiologiquement acceptable.

L'invention a plus particulièrement pour objet une composition cosmétique comprenant, en tant qu'agent actif, dans un milieu physiologiquement acceptable, une quantité efficace d'un extrait aqueux des parties aériennes d'aneth (*Anethum graveolens*) enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides obtenu à partir d'une matière végétale suivant les étapes suivantes selon lesquelles :

20 a) on met en présence des parties aériennes d'*Anethum graveolens* avec de l'eau ;

b) on ajoute de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) tétrasodique dans le mélange obtenu en a) à un pH compris entre 10,5 et 11 ;

25 c) on ajuste ensuite le pH du mélange obtenu en b) à une valeur comprise entre 6 et 8 ;

d) on purifie le mélange obtenu en c) de manière à éliminer la matière végétale solide résiduelle et obtenir un extrait brut aqueux purifié ; et

30 e) on contrôle le pH et on le réajuste si nécessaire à une valeur comprise entre 6 et 8, préférentiellement entre 6 et 6,5.

L'invention a également pour objet l'utilisation cosmétique d'une composition selon l'invention pour le soin de la peau, du cuir chevelu et des phanères.

L'invention et les avantages qui en découlent seront mieux compris à la lecture de la description et des modes de réalisation non limitatifs qui suivent, au regard des dessins annexés dans lesquels :

5 - la Figure 1 est un graphique résultant d'une analyse au Bioanalyseur® représentant la quantification des ARN d'un extrait d'aneth provenant de Chine d'Himalaya obtenu selon l'exemple 5 ;

10 - la Figure 2 représente un graphique résultant d'une analyse au Bioanalyseur® représentant la quantification des ARN d'un extrait d'aneth provenant de Chine d'Himalaya obtenu après étape de précipitation des petits ARN selon l'exemple 6 ;

15 - la Figure 3 représente un graphique résultant d'une analyse au Bioanalyseur® représentant la quantification des ARN d'un extrait d'aneth provenant de Chine d'Himalaya obtenu par extraction conventionnelle selon l'exemple 7 ;

20 - la Figure 4 représente la quantification de la longueur des fibres après marquage immunofluorescent de l'élastine sur peau ex vivo traitée pendant 72h avec différents extraits d'aneth à 1% ;

- la Figure 5 représente la quantification du marquage de l'acide hyaluronique (HA) sur peau ex vivo traitée pendant 72h avec différents extraits d'aneth à 1% ; et

25 - la Figure 6 représente la quantification du marquage de p16 sur peau ex vivo traitée pendant 48h avec différents extraits d'aneth à 1%.

L'invention concerne un procédé mis en œuvre pour l'obtention d'un extrait aqueux enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides à partir des parties 30 aériennes séchées ou fraîches d'aneth.

L'invention concerne plus particulièrement une composition cosmétique comprenant, en tant qu'agent actif, dans un milieu physiologiquement acceptable, une quantité efficace d'un extrait aqueux des parties aériennes d'aneth (*Anethum graveolens*)

enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides obtenu à partir d'une matière végétale suivant les étapes du procédé selon l'invention.

5 Par aneth (*Anethum graveolens*), on entend par exemple les espèces provenant d'Himalaya, d'Egypte et de Chine non himalayenne ; préférentiellement l'extrait est obtenu à partir d'aneth d'Himalaya.

Par « parties aériennes » on entend les feuilles, tiges et fleurs de l'aneth.

10 Les graines ne sont pas comprises dans les « parties aériennes » au sens de l'invention.

Dans le cours de la description les termes « aneth » et « *Anethum graveolens* » seront utilisées indifféremment, avec la même signification.

15 Par « petits ARN » ou « ARN de petit poids moléculaire », on entend des ARN (acides ribonucléiques) non codants de petit poids moléculaire, d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides, tels que tous types de petits ARN non messenger, simple et/ou double brins, par exemple les micro-ARN, les ARN interférents,  
20 les introns, les petits ARN nucléaires ou encore tous fragments d'ARN.

Dans une première étape a) du procédé selon l'invention, on met en présence la matière végétale soit les parties aériennes broyées séchées d'aneth avec de l'eau, préférentiellement dans  
25 un rapport matière végétale / eau de 4 à 20% en poids/poids, plus préférentiellement dans un rapport de 5 à 10%, par exemple dans un rapport de 5,7 ou 10 en poids/poids.

L'eau utilisée est une eau distillée, déminéralisée ou encore une eau riche en sels minéraux et/ou oligo-éléments,  
30 préférentiellement une eau distillée.

De préférence les parties aériennes de l'aneth sont sous forme sèche.

Préférentiellement, la matière végétale est broyée avant d'être mise en présence d'eau dans l'étape a). Le broyage est

une action mécanique qui permet une meilleure extraction. Le broyage mécanique, suivi d'une lyse alcaline en présence d'EDTA favorise la complète déstructuration de la membrane cellulaire et notamment de la membrane nucléaire.

5 On ajoute ensuite dans une étape b) de l'EDTA tétrasodique dans le mélange obtenu en a). Le pH à cette étape est basique et doit être ajusté, si nécessaire, à une valeur comprise entre 10,5 et 11 par l'ajout de soude (NaOH). Lors de l'étape b) il est essentiel de maintenir le pH basique entre 10,5 et 11. En  
10 effet, ce niveau de pH, associé à l'action de l'EDTA, provoque la déstructuration de la membrane cellulaire, y compris la membrane nucléaire, la lyse des cellules et la dénaturation de l'ADN (les 2 brins de la double hélice sont séparés). Le contrôle du pH lors de l'étape b) montre que celui-ci reste basique et se  
15 stabilise entre 9 et 11.

La concentration en EDTA tétrasodique est préférentiellement comprise entre 2 et 15 mM, et plus préférentiellement de 10 mM.

Cette concentration est choisie pour optimiser le rendement  
20 d'extraction des ARN de petit poids moléculaire dans l'extrait final. L'EDTA tétrasodique va fragiliser, déstructurer les membranes pecto-cellulosiques des cellules végétales en séquestrant par complexation les ions divalents tels que les ions calcium qui forment des ponts ioniques entre les molécules  
25 de pectines entourant les microfibrilles de cellulose. Ceci a pour conséquence de favoriser la libération du contenu cellulaire au cours de l'extraction. L'étape de traitement par EDTA est essentielle pour enrichir l'extrait en ARN de petit poids moléculaire.

30 L'étape de traitement par l'EDTA dure préférentiellement au moins 1h, à une température comprise entre 20 et 80°C. Pendant cette étape, le mélange obtenu en a) est avantageusement mis sous agitation.



Dans une étape c), on ajuste ensuite le pH du mélange obtenu en b) à une valeur comprise entre 6 et 8.

Par exemple, on ajuste le pH par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) ou encore n'importe quel acide  
5 pouvant réguler le pH qui soit compatible avec une utilisation cosmétique tel que l'acide citrique ou lactique.

Cette étape d'acidification provoque la renaturation brutale de l'ADN (réappariement des brins du duplex). Néanmoins l'ADN chromosomique, très long, ne parvient pas à se réappairier  
10 complètement et forme des enchevêtrements insolubles. Au contraire, les petits ARN, beaucoup plus courts, restent en solution. L'ADN et les petits ARN sont ainsi séparés en deux phases distinctes ; une phase solide contenant entre autres l'ADN chromosomique, et une phase liquide contenant, entre  
15 autres, les petits ARN.

Dans une étape d) on purifie le mélange obtenu en c) de manière à éliminer la matière végétale et récupérer un extrait brut aqueux. Toute méthode connue par l'homme du métier pourra être utilisé. Préférentiellement le mélange obtenu en c) est  
20 centrifugé à faible vitesse, par exemple pendant au moins 10 min à 4000 g, de manière à sédimenter la matière végétale résiduelle dans le culot et récupérer un extrait brut aqueux dans le surnageant.

Dans une étape d) on contrôle le pH et on le réajuste à une  
25 valeur comprise entre 6 et 8. Préférentiellement le pH est réajusté à une valeur comprise entre 6 et 6,5, encore plus préférentiellement à 6,5. Le pH est réajusté par l'ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) ou de soude (NaOH).

En effet, un pH inférieur à 6 peut entraîner la  
30 précipitation des acides nucléiques en général, donc celle des ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

L'étape d'ajustement du pH à l'étape d) du procédé selon l'invention est une étape indispensable à l'extraction optimale des ARN de petit poids moléculaire.

Avantageusement le réajustement du pH de l'étape d) est précédé par au moins une filtration de l'extrait brut aqueux obtenu en d). Préférentiellement des filtrations successives seront réalisées en abaissant le seuil de filtration de 50 à 20  $\mu\text{m}$  jusqu'à 0,4, 0,3, 0,2, ou 0,1  $\mu\text{m}$ .

L'invention a pour deuxième objet un extrait aqueux d'aneth enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides de l'invention obtenu par le procédé décrit ci-dessus.

Cet extrait ne contient pas d'ADN (acide désoxyribonucléique).

Un tel extrait aqueux enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides comprend, avant dilution, en poids du poids total de l'extrait, 10 à 30 g/kg d'extrait de poids sec, 2 à 10 g/kg de fragments protéiques, 2 à 10 g/kg de sucres, 0,2 à 3 g/kg d'acides aminés, 100 à 2000 mg/kg de composés phénoliques et 10 à 100 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides. L'extrait ainsi obtenu est considéré comme concentré. Il peut être ensuite dilué dans un solvant physiologiquement acceptable pour un usage cosmétique, de telle sorte que la concentration de l'extrait est alors ajustée à un poids en extrait sec particulier d'intérêt.

A titre d'exemples illustratifs et non limitatifs de solvants physiologiquement acceptables, on peut citer l'eau, le glycérol, l'éthanol, le propanediol ainsi que sa version naturelle appelée Zemea® issue du maïs, le butylène glycol, le dipropylène glycol, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, les polyols cycliques ou tout mélange de ces solvants.

Préférentiellement, l'extrait obtenu par le procédé selon l'invention est dilué dans un solvant tel que 30% de glycérol et de l'eau, et comprend en poids du poids total de l'extrait. L'extrait obtenu par le procédé selon l'invention comprend en

outre de 5-15 g/kg d'extrait sec, de 50 à 1000 mg/kg de polyphénols 0,5-10 g/kg de fragments protéiques, 0,5-10 g/kg de sucres, de 0,1 à 1 g/kg d'acides aminés et 10-100 mg/kg de petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

5 A titre illustratif, des exemples préférés de mode de réalisation du procédé selon l'invention sont décrits ci-dessous.

Exemple 1 : Préparation d'un extrait d'aneth (*Anethum*  
10 *graveolens*) de la famille des *Apiaceae*, enrichi en petits ARN

Un extrait aqueux enrichi en ARN de petit poids moléculaire (d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides) est obtenu à partir d'aneth (*Anethum graveolens*) de la famille des *Apiaceae*.

15 Dans une première étape, 5% de parties aériennes séchées d'aneth sous forme de poudre sont placés dans de l'eau distillée et 10 mM d'EDTA tétrasodique sont ajoutés, soit 50 g de poudre d'aneth séchée dans 950 g d'eau distillée et 3,8 g d'EDTA tétrasodique. Le pH à cette étape doit être basique et compris entre 10,5 et 11 pour un enrichissement optimal de l'extrait en  
20 ARN de petit poids moléculaire.

Le mélange est ensuite chauffé 2h à 55°C sous agitation.

Le mélange est ensuite centrifugé 10 min à 4000 g, pour ôter la matière solide.

25 A l'issue de cette étape, le pH est contrôlé, avant dilution éventuelle, afin de le placer si nécessaire entre 6 et 6,5 et préserver les petits ARN de l'extrait.

Des filtrations séquentielles sur filtres de porosité décroissante sont alors réalisées afin de clarifier l'extrait végétal jusqu'à une filtration stérilisante à 0,2 µm.

30

Exemple 2 : Caractérisation de l'extrait d'aneth

D'une manière générale, on obtient un extrait aqueux d'aneth de couleur vert clair titrant de 10 à 30 g/kg d'extrait de poids sec, 2 à 10 g/kg de fragments protéiques, 2 à 10 g/kg de sucres,

0,1 à 3 g/kg d'acides aminés, 300 à 750 mg/kg de composés phénoliques et 10 à 100 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

Néanmoins, pour des parties aériennes d'aneth de l'espèce  
5 *Anethum graveolens*, les extraits obtenus peuvent présenter une variabilité importante en fonction de facteurs tels que le lieu de récolte, l'année de récolte, la saison, les conditions climatiques, etc.

Dans l'extraction de l'exemple 1, on a obtenu un extrait  
10 aqueux titrant 12 g/kg d'extrait de poids sec.

L'analyse physico-chimique montre que cet extrait présente une concentration de 2,55 g/kg de fragments protéiques, 3 g/kg de sucres, 340 g/kg d'acides aminés, 650 mg/kg de composés phénoliques et 50 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une  
15 longueur d'au maximum 150 nucléotides. L'extrait est ensuite dilué avec un solvant cosmétique notamment avec 30% de glycérine ou de butylène glycol ou propanediol. Après dilution l'extrait présente une concentration de 1,7 g/kg de fragments protéiques, 2 g/kg de sucres, 240 g/kg d'acides aminés, 455 mg/kg de composés  
20 phénoliques et 35 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

Méthodes utilisées dans le dosage de spectrophotométrie pour déterminer la quantité de composés différents dans l'extrait d'aneth :

25 La teneur totale en protéines de l'extrait d'aneth a été déterminée par un dosage de protéines de Lowry (Lowry et al, 1951). L'absorbance de l'échantillon est lue sur le spectrophotomètre à 550 nm. La teneur en protéines est déterminée à l'aide d'une courbe standard de BSA.

30 La teneur en acides aminés de l'extrait a été déterminée à partir d'un protocole publié par Moore et al (1948), la teneur en acides aminés libre de l'extrait a été évaluée par la formation d'un complexe coloré, suite à la rupture des fonctions amine et carboxylique par le Réactif ninhydrine. L'absorbance du

complexe est lue sur le spectrophotomètre à 570 nm. La teneur totale en acide aminées est déterminée par rapport à un pool d'acide aminés comme standard.

La teneur totale en sucres de l'extrait a été déterminée par une adaptation du dosage décrit par Dubois et al. (1956) (Dubois et al., "Méthode colorimétrique pour la détermination des sucres et des substances apparentées", Anal. Chem., 1956, 28 (3), 350-356). Cette analyse consiste en la dissolution de la matière première dans l'acide sulfurique concentré puis en réagissant avec du phénol pour former un complexe coloré. L'absorbance du complexe est lue sur le spectrophotomètre à 490 nm. La teneur en sucre est déterminée à l'aide d'une courbe standard de glucose.

La teneur en polyphénols de l'extrait a été déterminée à l'aide du dosage de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., Analyse des phénols totaux et d'autres substrats d'oxydation et antioxydants au moyen du réactif folin-ciocalteu, 1999, 299: 152). Les composés de type polyphénols dans l'échantillon réagissent avec le réactif Folin-Ciocalteu, l'oxydation du réactif donne une couleur bleue. L'absorbance de l'échantillon est lue sur le spectrophotomètre à 760 nm. Le contenu a été exprimé en équivalents d'acide gallique à l'aide d'une courbe standard d'acide gallique.

La quantification des ARN de bas poids moléculaires au moyen d'un Bioanalyseur® (Agilent) qui permet de réaliser des électrophorèses miniaturisées grâce à des puces électroniques spécifiques de l'analyse des acides nucléiques telle que celle des ARN de petit poids moléculaire. Il permet de déterminer la taille et la concentration contenues dans un extrait à partir de quelques microlitres. Le résultat se présente sous forme d'un graphique avec une unité arbitraire de fluorescence en ordonnée (FU) et en abscisse le nombre de nucléotides (nt). Un marqueur interne est ajouté à chaque analyse (pic à 25 nt sur la figure

1, 2 et 3), et sert de contrôle interne pour valider le bon déroulement de l'analyse.

5 Exemple 3 : Préparation d'un extrait d'aneth provenant de Chine région non himalayenne (*Anethum graveolens*) de la famille des *Apiaceae*, enrichi en petits ARN

Un extrait aqueux enrichi en ARN de petit poids moléculaire (d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides) est obtenu à partir d'aneth (*Anethum graveolens*) de la famille des *Apiaceae*.

10 Dans une première étape, 5% de parties aériennes séchées d'aneth provenant de Chine région non himalayenne sous forme de poudre sont placés dans de l'eau distillée et 10 mM d'EDTA tétrasodique sont ajoutés, soit 50 g de poudre d'aneth séchée dans 950 g d'eau distillée et 3,8 g d'EDTA tétrasodique. Le pH  
15 à cette étape doit être basique et compris entre 10,5 et 11 pour un enrichissement optimal de l'extrait en ARN de petit poids moléculaire.

Le mélange est ensuite chauffé 1h à 55°C sous agitation.

20 Le mélange est ensuite centrifugé 10 min à 4000 g, pour ôter la matière solide.

A l'issue de cette étape, le pH est contrôlé, avant dilution éventuelle, afin de le placer si nécessaire entre 6 et 6,5 et préserver les petits ARN de l'extrait.

25 Des filtrations séquentielles sur filtres de porosité décroissante sont alors réalisées afin de clarifier l'extrait végétal jusqu'à une filtration de 0,2 µm.

30 D'une manière générale, on obtient un extrait aqueux d'aneth de couleur vert clair titrant de 10 à 30 g/kg d'extrait de poids sec, 2 à 10 g/kg de fragments protéiques, 2 à 10 g/kg de sucres, 0,1 à 3 g/kg d'acides aminés, 300 à 750 mg/kg de composés phénoliques et 10 à 100 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

Néanmoins, pour des parties aériennes d'aneth de l'espèce *Anethum graveolens*, les extraits obtenus peuvent présenter une

variabilité importante en fonction de facteurs tels que le lieu de récolte, l'année de récolte, la saison, les conditions climatiques, etc.

Dans cet exemple, on a obtenu un extrait aqueux titrant à  
5 12 g/kg d'extrait de poids sec.

L'analyse physico-chimique montre que cet extrait présente une concentration de 2,5 g/kg de fragments protéiques, 3 g/kg de sucres, 340 g/kg d'acides aminés, 650 mg/kg de composés phénoliques et 50 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une  
10 longueur d'au maximum 150 nucléotides. L'extrait est ensuite dilué avec de l'eau ou un mélange eau et un solvant cosmétique notamment avec 30% de glycérine ou de butylène glycol ou propanediol pour obtenir un extrait à 8 g/Kg en poids sec. Après dilution, l'extrait présente une concentration de 1,7 g/kg de  
15 fragments protéiques, 2 g/kg de sucres, 240 g/kg d'acides aminés, 455 mg/kg de composés phénoliques et 35 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

Méthodes utilisées dans le dosage de spectrophotométrie pour  
déterminer la quantité des différents composés dans l'extrait  
20 d'aneth selon l'exemple 3 :

La teneur totale en protéines de l'extrait d'aneth a été déterminée par un dosage de protéines de Lowry (Lowry et al, 1951). L'absorbance de l'échantillon est lue sur le spectrophotomètre à 550 nm. La teneur en protéines est déterminée  
25 à l'aide d'une courbe standard de BSA.

La teneur en acides aminés de l'extrait a été déterminée à partir d'un protocole publié par Moore et al (1948), la teneur en acides aminés libre de l'extrait a été évaluée par la formation d'un complexe coloré, suite à la rupture des fonctions  
30 amine et carboxylique par le Réactif ninhydrine. L'absorbance du complexe est lue sur le spectrophotomètre à 570 nm. La teneur totale en acide aminées est déterminée par rapport à un pool d'acide aminés comme standard.

La teneur totale en sucres de l'extrait a été déterminée par une adaptation du dosage décrit par Dubois et al. (1956) (Dubois et al., "Méthode colorimétrique pour la détermination des sucres et des substances apparentées", Anal. Chem., 1956, 28  
5 (3), 350-356). Cette analyse consiste en la dissolution de la matière première dans l'acide sulfurique concentré puis en réagissant avec du phénol pour former un complexe coloré. L'absorbance du complexe est lue sur le spectrophotomètre à 490 nm. La teneur en sucre est déterminée à l'aide d'une courbe  
10 standard de glucose.

La teneur en polyphénols de l'extrait a été déterminée à l'aide du dosage de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., Analyse des phénols totaux et d'autres substrats d'oxydation et antioxydants au moyen du réactif folin-ciocalteu, 1999, 299:  
15 152). Les composés de type polyphénols dans l'échantillon réagissent avec le réactif Folin-Ciocalteu, l'oxydation du réactif donne une couleur bleue. L'absorbance de l'échantillon est lue sur le spectrophotomètre à 760 nm. Le contenu a été exprimé en équivalents d'acide gallique à l'aide d'une courbe  
20 standard d'acide gallique.

Exemple 4 : Préparation d'un extrait d'aneth (*Anethum graveolens*) de la famille des *Apiaceae*, enrichi en petits ARN provenant d'Egypte.

25 Le procédé d'extraction est le même que dans l'exemple 3, seule l'origine géographique de provenance de l'aneth est différente ici l'Egypte.

Dans une première étape, 5% de parties aériennes séchées d'aneth d'Egypte sous forme de poudre sont placés dans de l'eau  
30 distillée et 10 mM d'EDTA tétrasodique sont ajoutés, soit 50 g de poudre d'aneth séchée dans 950 g d'eau distillée et 3,8 g d'EDTA tétrasodique. Le pH à cette étape doit être basique et compris entre 10,5 et 11 pour un enrichissement optimal de l'extrait en ARN de petit poids moléculaire.



Le mélange est ensuite chauffé 1h à 55°C sous agitation.  
Le mélange est ensuite centrifugé 10 min à 4000 g, pour ôter la matière solide.

A l'issue de cette étape, le pH est contrôlé, avant dilution  
5 éventuelle, afin de le placer si nécessaire entre 6 et 6,5 et préserver les petits ARN de l'extrait.

Des filtrations séquentielles sur filtres de porosité décroissante sont alors réalisées afin de clarifier l'extrait végétal jusqu'à une filtration à 0,2 µm de porosité.

10 Dans cet exemple on a obtenu un extrait aqueux titrant 20,4 g/kg d'extrait de poids sec.

L'analyse physico-chimique montre que cet extrait présente une concentration de 4,3 g/kg de fragments protéiques, 3,1 g/kg de sucres, 650 g/kg d'acides aminés, 720 mg/kg de composés  
15 phénoliques et 46 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides. L'extrait est ensuite dilué avec de l'eau ou un mélange d'eau et d'un solvant cosmétique notamment avec 30% de glycérine ou de butylène glycol ou propanediol. Après dilution l'extrait présente une  
20 concentration de 1,8 g/kg de fragments protéiques, 1,5 g/kg de sucres, 360 g/kg d'acides aminés, 490 mg/kg de composés phénoliques et 32 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

25 Exemple 5 : Préparation d'un extrait d'aneth (*Anethum graveolens*) de la famille des *Apiaceae*, enrichi en petits ARN provenant de Chine, région Himalayenne.

Le procédé d'extraction est le même que dans l'exemple 3 (et 4) seule l'origine géographique de provenance de l'aneth est  
30 différente ici la région Himalayenne.

Dans une première étape, 5% de parties aériennes séchées d'aneth provenant de Chine, région Himalayenne, sous forme de poudre sont placées dans de l'eau distillée et 10 mM d'EDTA tétrasodique sont ajoutés, soit 50 g de poudre d'aneth séchée

dans 950 g d'eau distillée et 3,8 g d'EDTA tétrasodique. Le pH à cette étape doit être basique et compris entre 10,5 et 11 pour un enrichissement optimal de l'extrait en ARN de petit poids moléculaire. Le mélange est ensuite chauffé 1h à 55°C sous  
5 agitation.

Le mélange est ensuite centrifugé 10 min à 4000 g, pour ôter la matière solide.

A l'issue de cette étape, le pH est contrôlé, avant dilution éventuelle, afin de le placer si nécessaire entre 6 et 6,5 et  
10 préserver les petits ARN de l'extrait.

Des filtrations séquentielles sur filtres de porosité décroissante sont alors réalisées afin de clarifier l'extrait végétal jusqu'à une filtration à 0,2 µm de porosité.

Dans cet exemple on a obtenu un extrait aqueux titrant 20  
15 g/kg d'extrait de poids sec.

L'analyse physico-chimique montre que cet extrait présente une concentration de 4,5 g/kg de fragments protéiques, 2,8 g/kg de sucres, 670 g/kg d'acides aminés, 650 mg/kg de composés phénoliques et 90 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une  
20 longueur d'au maximum 150 nucléotides. L'extrait est ensuite dilué avec de l'eau ou un mélange eau et un solvant cosmétique notamment avec 30% de glycérine ou de butylène glycol ou propanediol. Après dilution l'extrait présente une concentration de 2,3 g/kg de fragments protéiques, 1,7 g/kg de sucres, 470  
25 g/kg d'acides aminés, 455 mg/kg de composés phénoliques et 65 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

La quantification des ARN de bas poids moléculaires a été réalisée au moyen d'un Bioanalyseur® (Agilent) qui permet de  
30 réaliser des électrophorèses miniaturisées grâce à des puces électroniques spécifiques de l'analyse des acides nucléiques telle que celle des ARN de petit poids moléculaire. Il permet de déterminer la taille et la concentration contenues dans un extrait à partir de quelques microlitres. Le résultat se présente

sous forme d'un graphique avec une unité arbitraire de fluorescence en ordonnée (FU) et en abscisse le nombre de nucléotides (nt) tel qu'illustré par la Figure 1. Un marqueur interne est ajouté à chaque analyse (pic à 25 nt sur la Figure 1, 2 et 3), et sert de contrôle interne pour valider le bon déroulement de l'analyse.

Exemple 6 : Etude de l'influence du pH final dans la préparation d'extraits d'aneth (*Anethum graveolens*) provenant de Chine, région Himalayenne, afin d'obtenir un extrait d'aneth dépourvu de petits ARN

Le procédé d'extraction est réalisé dans les mêmes conditions opératoires que l'exemple 3, 4 et 5, pour enrichir un extrait en ARN de petit poids moléculaire, hormis l'étape finale d'ajustement du pH.

Ce procédé d'extraction est réalisé avec une étape de traitement par EDTA tétrasodique, mais avec un ajustement final de l'extrait à un pH acide compris entre 4 et 4,5 au lieu d'un pH compris entre 6 et 8.

Ceci entraîne la précipitation des ARN de petit poids moléculaire, résultats confirmés par l'analyse au Bioanalyseur® qui donne une concentration nulle en ARN de petit poids moléculaire (tel qu'illustré à la Figure 2).

Exemple 7 : Réalisation d'un extrait conventionnel obtenu par macération d'aneth (*Anethum graveolens*) provenant de Chine, région Himalayenne. Mise en évidence du rôle d'une étape de traitement par EDTA pour la mise en œuvre d'un procédé d'extraction de petits ARN.

Dans le but de mettre en évidence le rôle d'une étape de traitement par EDTA lors de l'extraction des ARN de petit poids moléculaire, un extrait d'aneth (*Anethum graveolens*) a également été obtenu, en modifiant certaines étapes essentielles du

procédé selon l'invention, ne permettant pas d'enrichir l'extrait en ARN de petit poids moléculaire.

Dans une première étape, 5% d'aneth sont broyés puis de l'eau est ajoutée, soit 50 g d'aneth dans 950 g d'eau distillée.

5 Le pH est mesuré et est de 5,5, le mélange est mis sous agitation pendant 1h à 55°C.

Ensuite, l'extrait est centrifugé 10 min à 4000 g pour ôter la matière solide.

10 Des filtrations séquentielles sont alors réalisées sur des filtres de porosité décroissante de taille comprise entre 50 et 20 µm puis jusqu'à une porosité de 0,4 à 0,3 µm.

On obtient alors un extrait aqueux de couleur vert clair titrant à 13 g/kg d'extrait de poids sec, contenant 3,3 g/kg de fragments protéiques, 2,2 g/kg de sucres, 380 mg/kg d'acides aminés, et 410 mg/kg de composés phénoliques.

15 L'extrait est alors dilué pour être à 8 g/Kg en poids sec, par seul ajout d'eau.

L'analyse physico-chimique montre qu'après dilution l'extrait végétal présente une concentration en fragments protéiques de 2,8 g/kg, et en sucres de 1,7 g/kg, en acides aminés de 240 mg/kg, et en composés phénoliques de 280 mg/kg. Dans ces conditions d'extraction dite conventionnelle (absence de traitement par EDTA), l'analyse au Bioanalyseur® indique que la concentration en ARN de petit poids moléculaire est nulle pour cet extrait (tel qu'illustré à la Figure 3). Ce résultat confirme qu'un extrait obtenu à partir d'un procédé d'extraction en l'absence de traitement par EDTA (à pH basique) ne contient pas d'ARN de petit poids moléculaire. L'étape de traitement par EDTA est essentielle pour obtenir un extrait riche en ARN de petit poids moléculaire selon l'invention.

30 Plus particulièrement, selon un troisième aspect de l'invention, les extraits aqueux enrichis en petits ARN obtenus selon l'invention sont avantageusement utilisés dans la

préparation de compositions cosmétiques comprenant, à titre d'agent actif, une quantité efficace d'un tel extrait de petits ARN selon l'invention, et un milieu physiologiquement acceptable.

5 Par quantité efficace, on désigne la quantité minimum d'extrait selon l'invention qui est nécessaire pour obtenir l'activité de l'extrait, en particulier cosmétique et plus particulièrement pour améliorer l'aspect de la peau, lutter contre les signes du vieillissement cutané ou pour  
10 l'amélioration de l'hydratation de la peau, sans que cette quantité soit toxique.

Avantageusement, l'extrait de petits ARN selon l'invention est utilisé, de préférence dilué dans un solvant cosmétique, à un poids sec compris entre 5 à 15 g/kg.

15 Avantageusement, l'extrait de petits ARN selon l'invention est présent dans la composition à une concentration de 0,1 à 5% en poids par rapport au poids total de la composition, et de préférence à une concentration comprise entre 0,5% et 2,5% en poids par rapport au poids total de la composition.

20 Un milieu physiologiquement acceptable désigne un véhicule adapté pour une mise en contact avec les couches externes de la peau ou des muqueuses, sans toxicité, irritation, réponse allergique induite et similaire ou réaction d'intolérance, et proportionné à un rapport avantage/risque raisonnable.

25 La composition utilisable selon l'invention pourra être appliquée par toute voie appropriée, notamment orale, ou topique externe, et la formulation des compositions sera adaptée par l'homme du métier.

30 La composition selon l'invention peut être formulée pour être administrée par voie orale. Les formes galéniques utilisées peuvent être sous forme solide ou liquide. Les formes orales solides sont généralement des comprimés, capsules dures (gélules), capsule molle, sachets comprenant une poudre ou des granulés. Les formes orales liquides sont généralement des

solutions buvables, sirops, élixirs, émulsions buvables, suspensions buvables, gouttes buvables.

Préférentiellement, les compositions selon l'invention se présentent sous une forme adaptée à l'application par voie  
5 topique. Ces compositions doivent donc contenir un milieu physiologiquement acceptable, c'est-à-dire compatible avec la peau et les phanères, sans risque d'inconfort lors de leur application et couvrent toutes les formes cosmétiques adaptées.

Par application topique, on désigne le fait d'appliquer ou  
10 d'étaler l'extrait aqueux enrichi en petits ARN selon l'invention, et plus particulièrement une composition le contenant, à la surface de la peau ou d'une muqueuse.

« Peau » désigne la peau du visage, notamment le contour des yeux et la bouche, le nez, le front, le cou, les mains, mais  
15 aussi la peau de l'ensemble du corps.

Les compositions pour la mise en œuvre de l'invention pourront notamment se présenter sous forme d'une solution aqueuse, hydro-alcoolique ou huileuse, d'une émulsion huile-dans-eau, eau-dans-huile ou émulsions multiples ; elles peuvent  
20 aussi se présenter sous forme de suspensions, ou encore poudres, adaptées à une application sur la peau, les muqueuses, les lèvres et/ou les cheveux.

Ces compositions peuvent être plus ou moins fluides et avoir également l'aspect d'une crème, d'une lotion, d'un lait, d'un  
25 sérum, d'une pommade, d'un gel, d'une pâte ou d'une mousse. Elles peuvent aussi se présenter sous forme solide, comme un stick ou être appliquées sur la peau sous forme d'aérosol.

A titre de milieu physiologiquement acceptable communément utilisé dans le domaine d'application envisagé, on peut citer  
30 par exemple des adjuvants nécessaires à la formulation, tels que des solvants, des épaississants, des diluants, des antioxydants, des colorants, des filtres solaires, des agents auto-bronzants, des pigments, des charges, des conservateurs, des parfums, des absorbeurs d'odeur, des huiles essentielles, des vitamines, des

acides gras essentiels, des tensioactifs, des polymères filmogènes, etc.

Dans tous les cas, l'homme de métier veillera à ce que ces adjuvants ainsi que leurs proportions soient choisis de telle manière à ne pas nuire aux propriétés avantageuses recherchées de la composition selon l'invention. Ces adjuvants peuvent, par exemple, correspondre à 0,01 à 20% du poids total de la composition. Lorsque la composition selon l'invention est une émulsion, la phase grasse peut représenter de 5 à 80% en poids et de préférence de 5 à 50% en poids par rapport au poids total de la composition. Les émulsionnants et co-émulsionnants utilisés dans la composition sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine considéré. Par exemple, ils peuvent être utilisés en une proportion allant de 0,3 à 30% en poids par rapport au poids total de la composition.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, l'extrait aqueux enrichi en petits ARN selon l'invention peut être encapsulé ou inclus dans un vecteur cosmétique tels que les liposomes ou toute autre nanocapsule ou microcapsule utilisée dans le domaine de la cosmétique ou adsorbé sur des polymères organiques poudreux, des supports minéraux comme les talcs et bentonites.

Avantageusement, la composition selon l'invention peut comprendre, outre l'agent actif selon l'invention, au moins un autre agent actif présentant des effets cosmétiques similaires et/ou complémentaires à ceux de l'invention. Selon l'invention, cet agent actif est défini comme un « agent actif additionnel ».

Par exemple, le ou les agents actifs additionnels peuvent être choisis parmi : les agents anti-âge, raffermissants, éclaircissants, hydratants, drainants, favorisant la microcirculation, exfoliants, desquamants, stimulant la matrice extracellulaire, activant le métabolisme énergétique, antibactériens, antifongiques, apaisants, anti-radicalaires, anti-UV, anti-acné, anti-inflammatoires, anesthésiques,

procurant une sensation de chaleur, procurant une sensation de fraîcheur, amincissants.

De tels agents actifs additionnels peuvent être choisis dans les groupes comprenant :

- 5           - la vitamine A et notamment l'acide rétinoïque, le rétinol, le rétinol proprionate, le rétinol palmitate ;
- la vitamine B3 et plus particulièrement le niacinamide, le nicotinate de tocophérol ;
- la vitamine B5, la vitamine B6, la vitamine B12, le  
10 panthénol ;
- la vitamine C, notamment l'acide ascorbique, l'ascorbyl glucoside, l'ascorbyl tétrapalmitate, magnésium et sodium ascorbyl phosphate ;
- les vitamines E, F, H, K, PP, le coenzyme Q10 ;
- 15           - les inhibiteurs de métalloprotéinase, ou un activateur des TIMP ;
- la DHEA, ses précurseurs et dérivés ;
- les acides aminés tels que l'arginine, ornithine, hydroxyproline, hydroxyproline dipalmitate, palmitoylglycine,  
20 hydroxylysine, méthionine et ses dérivés, composés acides aminés N-acylés ;
- les peptides naturels ou de synthèse, incluant les di-, tri-, tetra-, penta- et hexapeptides et leurs dérivés lipophiles, isomères et complexés avec d'autres espèces telles  
25 qu'un ion métal (par exemple cuivre, zinc, manganèse, magnésium, et autres). A titre d'exemples, on peut citer les peptides commercialement connus sous le nom de MATRIXYL® (SEDERMA®), ARGIRELINE® (LIPOTEC®), CHRONOGEN™, LAMINIXYL IS™, PEPTIDE Q10™, COLLAXYL™ (brevet FR2827170, ASHLAND®), PEPTIDE VINCI 01™  
30 (brevet FR2837098, ASHLAND®), PEPTIDE VINCI 02™ (brevet FR2841781, ASHLAND®), ATPeptide™ (brevet FR2846883, ASHLAND®) ou encore le peptide de synthèse de séquence Arg-Gly-Ser-NH<sub>2</sub>, commercialisé sous le nom ATPeptide™ par ASHLAND® ;



- l'extrait d'*Artémia salina*, commercialisé sous le nom GP4G™ (FR2817748, ASHLAND®) ;

- les extraits peptidiques végétaux tels que les extraits de lin (Lipigénine™, brevet FR2956818, ASHLAND®), les extraits  
5 de soja, d'épeautre, de vigne, de colza, de lin, de riz, de maïs, de pois ;

- les extraits de levures, par exemple le Dynagen™, (brevet FR2951946, ASHLAND®) ou l'Actopontine™ (brevet FR2944526, ASHLAND®) ;

10 - l'acide déhydroacétique (DHA) ;

- les phytostérols d'origine synthétique ou naturelle ;

- l'acide salicylique et ses dérivés, les alpha- et bêta-hydroxyacides, les silanols ;

- les sucres aminés, glucosamine, D-glucosamine, N-acetyl glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, mannosamine, N-acetyl  
15 mannosamine, galactosamine, N-acetyl galactosamine ;

- les extraits de polyphénols, isoflavones, flavonoïdes, tels que les extraits de raisin, les extraits de pin, les extraits d'olive ;

20 - les lipides tels que les céramides ou les phospholipides, les huiles d'origine animale, telles que le squalène ou le squalane ; les huiles végétales, telles que l'huile d'amande douce, de coprah, de ricin, de jojoba, d'olive, de colza, d'arachide, de tournesol, de germes de blé, de germes de maïs,  
25 de soja, de coton, de luzerne, de pavot, de potiron, d'onagre, de millet, d'orge, de seigle, de carthame, de passiflore, de noisette, de palme, de noyau d'abricot, d'avocat, de calendula ; les huiles végétales éthoxylées, le beurre de karité ;

- tous écrans UV et filtres solaires ;

30 - l'AMP cyclique et ses dérivés, les agents activateurs de l'enzyme adénylate cyclase et les agents inhibiteurs de l'enzyme phosphodiesterase, l'extrait de *Centella asiatica*, l'asiaticoside et l'acide asiatique, les méthyls xanthines, la théine, la caféine et ses dérivés, la théophylline, la

théobromine, la forskoline, l'esculine et l'esculoside, les inhibiteurs d'ACE, le peptide Val-Trp, l'inhibiteurs du neuropeptide Y, l'enkephaline, l'extrait de *Ginkgo biloba*, l'extrait de *dioscorea*, la rutine, l'extrait de yerba mate, l'extrait de guarana, les oligosaccharides, les polysaccharides, la carnitine, l'extrait de lierre, l'extrait de fucus, l'extrait hydrolysé de *Prunella vulgaris*, l'extrait hydrolysé de *Celosia cristata*, l'extrait d'*Anogeissus leiocarpus*, l'extrait de feuilles de *Manihot utilissima*, la palmitoylcarnitine, la carnosine, la taurine, l'extrait de sureau, les extraits d'algue tel que l'extrait de *Palmaria Palmata*.

A titre d'illustration, il est mentionné ci-après des exemples de formulations d'une composition cosmétique contenant un extrait aqueux enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides obtenu selon l'invention :

#### Exemple 8 : Baume pour le contour des yeux

Ingrédients (Nom de marque)	INCI	% w/w
Phase A		
Eau purifiée	Aqua	Qsp 100
EDTA tétrasodique	Tetrasodium EDTA	0,01
Phase B		
RapiThix™ A-100 polymer	Sodium Polyacrylate	1,80
Phase C		
Cegesoft VP	Vegetable oil (and) Hydrogenated vegetable oil (and) <i>Euphorbia Cerifera (Candelilla) Wax</i>	3,00
Si-Tec™ GF 3096 silicone	Dimethicone (and) Dimethiconol	10,00
Phase D		
DC 9701 Cosmetic Powder	Dimethicone/Vinyl Dimethicone Crosspolymer (and) Silica	1,00
Phase E		
Optiphen™ preservative	Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol	0,50
Phase F		
Extrait selon l'exemple 1	Water/Aqua (and) Glycerin (and) Peucedanum Graveolens (Dill) extract	1,00
Zemea®	Propanediol	5,00
Timiron Splendid Violet	CI 77891 (Titanium Dioxide) (and) Mica (and) Silica	1,00

Procédé de préparation:

1. Homogénéiser la phase A dans le récipient principal jusqu'à ce qu'elle soit claire ;
2. A 25°C, saupoudrer dans la Phase B et homogénéiser pendant 10 minutes jusqu'à homogénéité ;
3. A 25°C, préparer la phase C dans un bécher à part, mélanger jusqu'à homogénéité. Saupoudrer dans la phase D et bien mélanger jusqu'à homogénéité ;
4. A 25°C, ajouter la phase C + D dans le récipient principal et mélanger jusqu'à homogénéité ;
5. À 25°C, ajouter la phase E dans le récipient principal et mélanger jusqu'à homogénéité ;
6. A 25°C, Prémélanger la phase F, l'ajouter dans le récipient principal et mélanger jusqu'à homogénéité ;
7. Arrêter à 25°C.

La composition se présente ainsi sous forme d'un gel crème nacré violet, avec un pH compris entre 5,70 et 6,20 et une viscosité (D0) de 80000 - 130000 cps (Brookfield RVT/Spindle C/5 RPM/1 minute/25°C).

20

#### Exemple 9 : Crème riche

Ingrédients (Nom de marque)	INCI	% w/w
Phase A		
Eau purifiée	Aqua	Qsp 100
Optiphen™ Plus preservative	Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol (and) Sorbic Acid	1,50
Phase B		
Stabileze™ QM polymer	PVM/MA Decadiene Crosspolymer	0,15
Phase C		
ProLipid™ 141 lamellar gel	Glyceryl Stearate (and) Behenyl Alcohol (and) Palmitic Acid (and) Stearic Acid (and) Lecithin (and) Lauryl Alcohol (and) Myristyl Alcohol (and) Cetyl Alcohol	5,00
Ceraphyl™ 494 ester	Isocetyl Stearate	4,00
Ceraphyl™ SLK ester	Isodecyl Neopentanoate	4,00
DC 580 Wax	Stearoxytrimethylsilane (and) Stearyl Alcohol	2,00
Emulsynt™ GDL ester	Glyceryl Dilaurate	3,00

Phase D		
Gransil DM-5	Dimethicone (and) Polysilicone-11	3,00
Phase E		
Hydroxyde de sodium	Sodium Hydroxide	0,04
Eau purifiée	Aqua	0,50
Phase F		
PF Bois Précieux	Parfum/Fragrance	0,30
Unipure* Red LC 381 ADT-C	CI 77491 (Iron oxides) (and) Isopropyl Titanium Triisostearate (and) Bis-Hydroxyethoxypropyl Dimethicone (and) PEG-2-Soyamine (and) Isophorone Diisocyanate	0,03
Phase G		
Extrait selon l'exemple 1	Water/Aqua (and) Glycerin (and) Peucedanum Graveolens (Dill) extract	3,00
Ronaflair Balance Gold	CI 77891 (Titanium Dioxide) (and) Mica (and) Tin Oxide	0,30
Covabead Velvet 10	Polymethyl Methacrylate	1,00
Ronaflair Balance Red	CI 77891 (Titanium Dioxide) (and) Mica (and) Tin Oxide	1,20
Phase H		
Eau purifiée	Aqua	15,00
Natrosol™ Plus 330 CS	Cetyl Hydroxyethylcellulose	0,50

Procédé de préparation:

1. Homogénéiser la phase A dans le récipient principal et commencer à chauffer à 75-80°C ;
2. A 30°C, saupoudrer dans la Phase B et homogénéiser tout en chauffant ;
3. Dans un bécher à part, préparer la phase C, chauffer à 75-80°C jusqu'à homogénéité ;
4. A 75°C, ajouter la phase C dans le récipient principal et homogénéiser pendant 10 minutes ;
5. Laisser refroidir la température et ajouter la phase D à 65°C. Bien mélanger pour homogénéiser pendant 10 minutes ;
6. Prémélanger la phase E avant de l'ajouter dans le récipient principal ;
7. Ajouter la phase E à 60°C. Bien mélanger pour homogénéiser pendant 10 minutes ;
8. A 35°C, prémélanger la phase F avant de l'ajouter et de bien mélanger ;
9. Prémélanger la phase G avant de l'ajouter dans le récipient principal ;

10. Ajouter la phase G à 35°C. Bien mélanger pour homogénéiser ;  
 11. Dans un bêcher à part, préparer la phase H: saupoudrer Natrosol™ dans l'eau à température ambiante et homogénéiser tout en chauffant à 60°C ;

- 5 12. Ajouter la phase H à 30°C. Bien mélanger pour homogénéiser ;  
 13. Arrêter à 25°C.

La composition se présente ainsi sous forme d'une crème beurre rose, avec un pH compris entre 4,90 et 5,40 et une viscosité (D0) de 160000 - 210000 cps (Brookfield RVT/Spindle D/5 RPM/10 minute/25°C).

#### Exemple 10: Sérum visage

Ingrédients (Nom de marque)	INCI	% w/w
Phase A		
Eau purifiée	Aqua	Qsp 100
Propylène Glycol	Propylene Glycol	35,10
SD Alcohol 40B Absolute	Alcohol	10,00
Butylène Glycol	Butylene Glycol	5,00
EDTA disodique	Disodium EDTA	0,10
Phase B		
Flexithix™ polymer	PVP	2,00
Phase C		
Gomme xanthane	Xanthan Gum	0,25
Phase D		
Rapithix™ A-60 polymer	Sodium Polyacrylate (and) Hydrogenated Polydecene (and) Trideceth-6	1,00
Rokonsal™/LiquaPar™ MEP preservative	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Propylparaben	0,70
Phase E		
Extrait selon l'exemple 1	Water/Aqua (and) Glycerin (and) Peucedanum Graveolens (Dil) extract	5,00
Phase F		
Cyclopentasiloxane	Cyclopentasiloxane	6,00
DM 350	Dimethicone	3,00
Gransil* DMCM-5	Dimethicone (and) Cyclopentasiloxane (and) Polysilicone-11	1,50
KSP* 100	Vinyl Dimethicone/Methicone Silsesquioxane Crosspolymer	1,00
Phase G		
Unicert* Yellow 08006-J	Water/Aqua (and) CI 15985 (Yellow 6)	0,60

Procédé de préparation :

1. Dans un bécher à température ambiante, peser les ingrédients de la phase A et mélanger. Saupoudrer la phase B et homogénéiser ;
  - 5 2. A température ambiante, saupoudrer dans la phase C et continuer à homogénéiser l'ensemble ;
  3. A température ambiante, ajouter la phase D à la phase ABC et continuer à homogénéiser ;
  4. A température ambiante, ajouter la phase E et homogénéiser ;
  - 10 5. A température ambiante, ajouter la phase F et homogénéiser l'ensemble ;
  6. A température ambiante, ajouter la phase G et mélanger jusqu'à homogénéité ;
  7. Arrêter à 25°C.
- 15 La composition se présente ainsi sous forme d'un gel lisse, translucide, jaune crème, avec un pH compris entre 6,30 et 7,10 et une viscosité (D0) de 10000 - 15000 cps (Brookfield RVT/Spindle B/5 RPM/1 minute/25°C).

20 Exemple 11 : Masque anti-âge

Ingrédients (Nom de marque)	INCI	% w/w
Phase A		
Eau purifiée	Aqua	Qsp 100
EDTA tétrasodique	Tetrasodium EDTA	0,05
Phase B		
N-Hance™ HP40S guar	Hydroxypropyl Guar	0,10
Phase C		
Lubrajel™ DV Free hydrogel	Glycerin (and) Glyceryl Acrylate/Acrylic Acid Copolymer	6,00
Phase D		
Si-Tec™ GF 3096 silicone	Dimethicone (and) Dimethiconol	12,00
RapiThix™ A-60 polymer	Sodium Polyacrylate (and) Hydrogenated Polydecene (and) Trideceth-6	2,40
Phase E		
Optiphen™ preservative	Plus Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol (and) Sorbic Acid	1,50
Phase F		

Surfin* 96	Alcohol Denat.	3,50
PF Cucumber & Aloe	Parfum/Fragrance	0,50
Phase G		
Extrait selon l'exemple 1	Water/Aqua (and) Glycerin (and) Peucedanum Graveolens (Dil) extract	1,00
Achromaxyl™ biofunctional	ISR Water/Aqua (and) Glycerin (and) Hydrolyzed Brassica Napus Seedcake Extract	3,00
Xirona Carribean Blue	Mica (and) CI 77891 (Titanium Dioxide) (and) Silica (and) Tin Oxide	1,00

Procédé de préparation:

1. A 25°C, homogénéiser la phase A dans le récipient principal ;
2. A 25°C, saupoudrer dans la phase B et bien mélanger jusqu'à
- 5 homogénéité ;
3. A 25°C, ajouter la phase C et bien mélanger jusqu'à homogénéité ;
4. Prémélanger la phase D dans un bêcher à part et ajouter dans le récipient principal à 25°C ;
- 10 5. A 25°C, ajouter la phase E dans le récipient principal et bien mélanger ;
6. Prémélanger la phase F et l'ajouter lentement. Bien mélanger bien jusqu'à homogénéité ;
7. Prémélanger la phase G dans un bêcher à part et ajouter dans
- 15 le récipient principal jusqu'à homogénéité ;
8. Arrêter à 25°C.

La composition se présente ainsi sous forme d'un gel crème avec des effets vert scintillant, avec un pH compris entre 5,30 et 5,80 et une viscosité (D0) de 70000 - 100000 cps (Brookfield

20 RVT/Spindle C/5 RPM/1 minute/25°C).

#### Exemple 12 : Sérum

Ingrédients (Nom de marque)	INCI	% w/w
Phase A		
Eau déminéralisée	Aqua	87,40
Sodium Hyaluronate	Sodium Hyaluronate	0,20
RapiThix™ A-60 polymer	Sodium Polyacrylate (and) Hydrogenated Polydecene (and) Trideceth-6	0,40

Lubrajel™ DV hydrogel	Glycerin (and) Glyceryl Acrylate/Acrylic Acid Copolymer (and) Propylene Glycol	6,00
Lubrajel™ Oil hydrogel	Glycerin (and) Glyceryl Acrylate/Acrylic Acid Copolymer (and) Propylene Glycol (and) PVM/MA Copolymer	1,00
Wacker-Belsil* DM 100	Dimethicone	2,00
Cyclopentasiloxane NF	Cyclopentasiloxane	0,50
Extrait selon l'exemple 1	Water/Aqua (and) Glycerin (and) Peucedanum Graveolens (Dil) extract	1,00
Optiphen™ preservative	Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol	1,50

Procédé de préparation :

1. Ajouter de l'eau dans le récipient principal et de commencer le mélange avec une pale d'hélice hi-lo ;
- 5 2. Ajouter le reste des ingrédients, un après l'autre tout en mélangeant entre chaque addition.

La composition se présente ainsi sous forme d'un sérum lisse, semi-opaque, avec un pH compris entre 5,75 et 6,25 et une viscosité (D0) de 1,100 - 1,400 cps (Brookfield RVT/spindle 3/20 rpm/25° C/1 minute).

Selon un quatrième aspect, l'invention concerne l'utilisation cosmétique d'une composition selon l'invention pour le soin de la peau, du cuir chevelu et des phanères.

15 L'invention concerne notamment l'utilisation cosmétique de la composition selon l'invention pour améliorer l'aspect de la peau, lutter contre les signes du vieillissement cutané ou améliorer l'hydratation cutanée.

Par phanères, on entend des substances naturellement présentes dans l'organisme humain ou l'organisme animal riches en kératine, et plus particulièrement les cheveux, les poils, les cils, les sourcils et les ongles. L'utilisation et les compositions selon la présente invention sont particulièrement destinées aux cheveux.



L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation cosmétique d'une composition selon l'invention pour améliorer l'hydratation de la peau et renforcer la fonction barrière.

5 L'invention concerne également plus particulièrement l'utilisation cosmétique d'une composition selon l'invention pour lutter contre les signes du vieillissement cutané et améliorer la fermeté et l'élasticité de la peau.

10 Enfin, l'invention concerne aussi l'utilisation cosmétique d'une composition selon l'invention pour améliorer la santé du cheveu.

On entend par « améliorer l'aspect de la peau » que le grain de la peau apparaît plus fin, la luminosité plus intense et le teint plus homogène.

15 Par « signes du vieillissement cutané » on entend toutes modifications de l'aspect extérieur de la peau dues au vieillissement comme, par exemple, les rides et ridules, les crevasses, les poches sous les yeux, les cernes, le flétrissement, la perte d'élasticité, de fermeté et/ou de tonus de la peau, mais également toutes modifications internes de la  
20 peau qui ne se traduisent pas systématiquement par un aspect extérieur modifié comme, par exemple, l'amincissement de la peau, ou toutes dégradations internes de la peau consécutives à des stress environnementaux tels que la pollution et les rayonnements UV.

25 On entend par « amélioration de l'hydratation cutanée », toutes améliorations des modifications de l'aspect extérieur de la peau dues à la déshydratation comme, par exemple, la sécheresse, les tiraillements et l'inconfort.

30 Par « améliorer la santé du cheveu » on entend un renforcement de la structure du cheveu permettant d'améliorer leur apparence et de favoriser leur lissage et leur résistance.

A ce titre, l'invention est illustrée ci-après, par des résultats de tests d'activité pour le soin de la peau et du cuir chevelu.

Exemple 13 : Evaluation des effets des extraits d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 sur la matrice extracellulaire du derme par l'étude du collagène I, de la dermatopontine et de l'élastine

5 Le but de cette étude est de comparer les effets sur la matrice extracellulaire du derme de trois extraits d'aneth d'Himalaya. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 5, le deuxième extrait ne contenant pas d'ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon  
10 l'exemple 6 et le dernier extrait obtenu après macération selon l'exemple 7.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois extraits d'aneth sur l'expression des protéines collagène I, dermatopontine et élastine impliquées dans la structure de la  
15 matrice extracellulaire. Le collagène et l'élastine sont très importants pour le maintien de l'élasticité et de la fermeté de la peau. La dermatopontine est localisée sur les fibres de collagène (Forbes EG, Cronshaw AD, MacBeath JRE, Hulmes DJS. Tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) is a tyrosine-  
20 sulphated and widely distributed protein of the extracellular matrix. *FEBS Lett.* 1994 351(3):433-6). Elle facilite la fibrogénèse, stabilise les fibres de collagène et régule leur diamètre (Macbeath J, Shackleton D, and Hulmes D. Tyrosine-rich Acidic Matrix Protein (TRAMP) accelerates collagen fibril  
25 formation in vitro. *J. Biol. Chem.* 1993 268:19826-32).

Protocole:

Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts.  
30 Les biopsies sont cultivées pendant 48h (dermatopontine) ou 72h (collagène I et élastine) et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de

PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées. Les marquages du collagène I, de la dermatopontine et de l'élastine sont effectués après démasquage des sites spécifiques. Les immunomarquages sont réalisés à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique du collagène I (Rockland, Réf. 600-401-103-0.5), d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la dermatopontine (Santa Cruz, Réf. Sc-376863), d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique de l'élastine (Abcam, Réf. Ab21610), puis d'un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf. A21206 et A21202). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage du collagène I est réalisée, à l'aide du logiciel Velocity® (Improvision). Une quantification du contenu de dermatopontine dans le derme est réalisée, à l'aide du logiciel Velocity® (Improvision). Une quantification de la longueur des fibres obtenues après marquage de l'élastine est réalisée, à l'aide du logiciel ImageJ.

#### Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 1 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h (dermatopontine) ou 72h (collagène I et élastine) permettent d'observer une augmentation significative de l'expression de collagène I et de dermatopontine et de la longueur des fibres d'élastine comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 6 (absence d'ARN de petit poids moléculaire) et 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya. Les résultats obtenus

sur la quantification de la longueur des fibres après marquage immunofluorescent de l'élastine sur peau *ex vivo* traitée pendant 72h avec les différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 1) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 4, dans laquelle : moyenne +/- sem ; n=3 ; \*\*\*: hautement significatif, \*: significatif, ns: non significatif, avec le test t de Student.

Tableau 1 :

	Expression du col I (%)	Contenu en DPT (%)	Longueur des fibres d'élastine (%)
Contrôle	100	100	100
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	164	165	166
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 6	133	141	105
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 7	128	139	108

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule davantage l'expression du collagène I, de la dermatopontine et de l'élastine dans la peau *ex vivo* humaine en comparaison des extraits d'aneth d'Himalaya non enrichis en petits ARN (exemples 6 et 7). Ces protéines sont impliquées dans la fermeté et l'élasticité de la peau, leur synthèse permet donc un effet raffermissant. L'extrait d'aneth obtenu selon l'invention permet donc de lutter efficacement contre les signes du vieillissement cutané en améliorant la fermeté et l'élasticité de la peau.

Exemple 14 : Evaluation des effets des extraits d'aneth de différentes origines (Chine non himalayenne, Egypte, Chine Himalaya) respectivement selon les exemples 3, 4 et 5 sur la matrice extracellulaire du derme par l'étude du collagène I, de la dermatopontine et de l'élastine

Le but de cette étude est de comparer les effets sur la matrice extracellulaire du derme de trois extraits d'aneth

obtenus selon les exemples 3, 4 et 5 ayant des origines géographiques différentes. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine non himalayenne, le deuxième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Egypte et le troisième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine d'Himalaya.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois extraits d'aneth sur l'expression des protéines collagène I, dermatopontine et élastine impliquées dans la structure de la matrice extracellulaire.

#### Protocole:

Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 48h (dermatopontine) ou 72h (collagène I et élastine) et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth de différentes origines géographiques, dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées. Les marquages du collagène I, de la dermatopontine et de l'élastine sont effectués après démasquage des sites spécifiques. Les immunomarquages sont réalisés à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique du collagène I (Rockland, Réf. 600-401-103-0.5), d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la dermatopontine (Santa Cruz, Réf. Sc-376863), d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique de l'élastine (Abcam, Réf. Ab21610), puis d'un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris couplé à un fluorochrome (Invitrogen,

Réf. A21206 et A21202). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage du collagène I est réalisée, à l'aide du logiciel Velocity® (Improvision). Une quantification du contenu de dermatopontine dans le derme est réalisée, à l'aide du logiciel Velocity® (Improvision). Une quantification de la longueur des fibres obtenues après marquage de l'élastine est réalisée, à l'aide du logiciel ImageJ.

## 10 Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 2 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h (dermatopontine) ou 72h (collagène I et élastine) permettent d'observer une augmentation significative de l'expression de collagène I et de dermatopontine et de la longueur des fibres d'élastine comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3 et 4 à partir de plantes provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. Les résultats obtenus sur la quantification de la longueur des fibres après marquage immunofluorescent de l'élastine sur peau ex vivo traitée pendant 72h avec les différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 2) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 4.

Tableau 2 :

	Expression du col I (%)	Contenu en DPT (%)	Longueur des fibres d'élastine (%)
Contrôle	100	100	100
Extrait d'aneth d'Egypte selon l'exemple 4	139	119	134
Extrait d'aneth de Chine non himalayenne selon l'exemple 3	81	115	125

Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	164	165	166
---	-----	-----	-----

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule davantage l'expression du collagène I et de l'élastine dans la peau *ex vivo* humaine en comparaison des extraits d'aneth enrichi en petits ARN (exemples 3 et 4) provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. Ces protéines sont impliquées dans la fermeté et l'élasticité de la peau, leur synthèse permet donc un effet raffermissant. L'extrait d'aneth, et notamment d'aneth provenant d'Himalaya, obtenu selon l'invention permet donc de lutter efficacement contre les signes du vieillissement cutané en améliorant la fermeté et l'élasticité de la peau.

Exemple 15 : Evaluation des effets des extraits d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 sur l'hydratation par l'étude de l'acide hyaluronique

Le but de cette étude est de comparer les effets sur la synthèse de l'acide hyaluronique de trois extraits d'aneth d'Himalaya. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 5, le deuxième extrait ne contenant pas d'ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 6 et le dernier extrait obtenu après macération selon l'exemple 7.

L'étude de l'expression de l'acide hyaluronique est un moyen de juger de l'effet hydratant de l'invention. En effet, l'acide hyaluronique est un composant majoritaire de la matrice extracellulaire du derme, également présent dans l'épiderme, et est impliqué dans l'hydratation cutanée.

Protocole:

Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 72h et reçoivent 2

applications par jour d'un extrait d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme  
5 d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées. Le marquage de l'acide hyaluronique est réalisé à l'aide d'une protéine de liaison spécifique de l'acide  
10 hyaluronique, biotinylé (Coger-Seikagaki, Réf. 400-763-1A), et de streptavidine couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf. S32354). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage de l'acide  
15 hyaluronique est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

#### Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 3 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN,  
20 obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 72h permettent d'observer une augmentation significative de la synthèse d'acide hyaluronique aussi bien dans le derme que dans l'épiderme, comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec  
25 les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 6 (absence d'ARN de petit poids moléculaire) et 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya. Les résultats obtenus sur la quantification du marquage de l'acide hyaluronique sur peau ex vivo traitée pendant 72h avec différents extraits d'aneth à 1%  
30 (Tableau 3) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 5, dans laquelle : moyenne +/- sem ; n=3 ; \*\*\*: hautement significatif, \*\*: très significatif, ns: non significatif, avec le test t de Student.



Tableau 3 :

	Synthèse d'acide hyaluronique dans l'épiderme (%)	Synthèse d'acide hyaluronique dans le derme (%)
Contrôle	100	100
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	171	175
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 6	133	134
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 7	107	94

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule davantage la synthèse d'acide hyaluronique dans l'épiderme et le derme de la peau ex vivo humaine en comparaison des extraits d'aneth d'Himalaya non enrichis en petits ARN (exemples 6 et 7). L'acide hyaluronique est impliqué dans l'hydratation de la peau.

10 Exemple 16 : Evaluation des effets des extraits d'aneth de différentes origines (Chine non himalayenne, Egypte, Chine d'Himalaya) respectivement selon les exemples 3, 4 et 5 sur l'hydratation par l'étude de l'acide hyaluronique

15 Le but de cette étude est de comparer les effets sur la synthèse de l'acide hyaluronique de trois extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3, 4 et 5 ayant des origines géographiques différentes. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine non himalayenne, le deuxième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Egypte et le troisième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Himalaya.

25 L'étude de l'expression de l'acide hyaluronique est un moyen de juger de l'effet hydratant de l'invention. En effet, l'acide hyaluronique est un composant majoritaire de la matrice

extracellulaire du derme, également présent dans l'épiderme, et est impliqué dans l'hydratation cutanée.

#### Protocole:

Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont  
5 maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique  
(DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts.  
Les biopsies sont cultivées pendant 72h et reçoivent 2  
applications par jour d'un extrait d'aneth de différentes  
origines géographiques, dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la  
10 concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle  
est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées  
sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la  
biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde  
puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm  
15 d'épaisseur sont ensuite réalisées. Le marquage de l'acide  
hyaluronique est réalisé à l'aide d'une protéine de liaison  
spécifique de l'acide hyaluronique, biotinylé (Coger-Seikagaki,  
Réf. 400-763-1A), et de streptavidine couplé à un fluorochrome  
(Invitrogen, Réf. S32354). Les biopsies sont alors examinées au  
20 microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une  
quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après  
marquage du collagène I est réalisée, à l'aide du logiciel  
Volocity® (Improvision).

#### Résultats:

25 Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 4 ci-  
après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits  
ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant  
d'Himalaya à 1% pendant 72h permettent d'observer une  
augmentation significative de la synthèse d'acide hyaluronique  
30 aussi bien dans le derme que dans l'épiderme, comparé à la  
condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux  
traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples  
3 et 4 à partir de plantes provenant de Chine non himalayenne et  
d'Egypte. Les résultats obtenus sur la quantification du

marquage de l'acide hyaluronique sur peau *ex vivo* traitée pendant 72h avec différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 4) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 5.

Tableau 4 :

	Synthèse d'acide hyaluronique dans l'épiderme (%)	Synthèse d'acide hyaluronique dans le derme (%)
Contrôle	100	100
Extrait d'aneth d'Egypte selon l'exemple 4	133	157
Extrait d'aneth de Chine non himalayenne selon l'exemple 3	89	109
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	171	175

## 5 Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule davantage la synthèse d'acide hyaluronique dans l'épiderme et le derme de la peau *ex vivo* humaine en comparaison des extraits d'aneth enrichi en petits ARN (exemples 3 et 4) provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. L'acide hyaluronique est impliqué dans l'hydratation de la peau.

Exemple 17 : Evaluation des effets des extraits d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 sur le vieillissement de la peau par l'étude de P16, de la kératine 14 et de la fibrilline 1

Le but de cette étude est de comparer les effets sur le vieillissement de la peau de trois extraits d'aneth d'Himalaya. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 5, le deuxième extrait ne contenant pas d'ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 6 et le dernier extrait obtenu après macération selon l'exemple 7.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois extraits d'aneth sur l'expression des protéines p16, kératine 14 (K14) et fibrilline 1, impliquées dans le vieillissement cutané. p16 est un régulateur du cycle cellulaire qui augmente avec l'âge

(Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Dürr P, Wlaschek M. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell*. 2006 5(5):379-89). La kératine 14 est un composant du cytosquelette des kératinocytes de la lame basale de l'épiderme, qui disparaît avec la différenciation de ces cellules. La fibrilline 1 est un composant des fibres élastiques particulièrement sensible au vieillissement photoinduit (Watson RE, Griffiths CE, Craven NM, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin. Distribution at the dermal-epidermal junction. *J Invest Dermatol*. 1999 112(5):782-7).

#### Protocole:

Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 48h (p16 et K14) ou 72h (fibrilline 1) et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite congelées (fibrilline 1) ou fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine (p16 et K14). Des coupes de peau de 4 µm sont ensuite réalisées. Les marquages p16, kératine 14 et fibrilline 1 sont effectués après un éventuel démasquage des sites spécifiques. Les immunomarquages sont réalisés à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de p16 (Abcam, Réf. Ab54210), d'un anticorps monoclonal de lapin spécifique de la kératine 14 (Abcam, Réf. Ab51054), d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la fibrilline 1 (Abcam, Réf. Ab3090), puis d'un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf. A21202 et A21206). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence

(Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage p16 et K14 est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision). Une quantification de la longueur des fibres obtenues après marquage fibrilline 1 est réalisée, à l'aide du logiciel ImageJ.

### Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 5 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h permettent d'observer une diminution significative de l'expression de p16 et une augmentation significative de l'expression de la kératine 14 comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 6 (absence d'ARN de petit poids moléculaire) et 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 72h permettent d'observer une augmentation significative de la longueur des fibres comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec l'extrait d'aneth obtenu selon l'exemple 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya. Les résultats obtenus sur la quantification du marquage de p16 sur peau ex vivo traitée pendant 48h avec différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 5) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 6, dans laquelle : moyenne +/- sem ; n=3-6 ; \*\*\*: hautement significatif, \*\*: très significatif, \*: significatif, ~: presque significatif (p=0.055), ns: non significatif, avec le test t de Student.

30 Tableau 5 :

	Expression de p16 (%)	Expression de K14 (%)	Longueur des fibres de fibrilline 1 (%)
Contrôle	100	100	100

Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	65	122	138
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 6	83	113	162
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 7	89	108	98

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) limite l'expression de p16 et stimule davantage l'expression de K14 dans la peau *ex vivo* humaine en comparaison des extraits d'aneth d'Himalaya non enrichis en petits ARN (exemples 6 et 7). L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule également davantage l'expression de la fibrilline 1 en comparaison de la macération, non enrichis en petits ARN, d'aneth d'Himalaya (exemple 7) mais pas en comparaison de l'extrait ne contenant pas de petits ARN (exemple 6). Ces protéines sont impliquées dans le vieillissement de la peau. L'extrait d'aneth obtenu selon l'invention permet donc de lutter efficacement contre les signes du vieillissement cutané.

Exemple 18 : Evaluation des effets des extraits d'aneth de différentes origines (Chine non himalayenne, Egypte, Chine d'Himalaya) respectivement selon les exemples 3, 4 et 5 sur le vieillissement de la peau par l'étude de P16, de la kératine 14 et de la fibrilline 1

Le but de cette étude est de comparer les effets sur le vieillissement de la peau de trois extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3, 4 et 5 ayant des origines géographiques différentes. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine non himalayenne, le deuxième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Egypte et le troisième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Himalaya.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois extraits d'aneth sur l'expression des protéines p16, kératine 14 (K14) et fibrilline 1, impliquées dans le vieillissement cutané.

Protocole:

5 Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 48h (p16 et K14) ou 72h (fibrilline 1) et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait  
10 d'aneth de différentes origines géographiques, dilué au 1/100eme dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite  
15 congelées (fibrilline 1) ou fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine (p16 et K14). Des coupes de peau sont ensuite réalisées. Les marquages p16, kératine 14 et fibrilline 1 sont effectués après un éventuel démasquage des sites spécifiques. Les immunomarquages sont réalisés à l'aide d'un  
20 anticorps monoclonal de souris spécifique de p16 (Abcam, Réf. Ab54210), d'un anticorps monoclonal de lapin spécifique de la kératine 14 (Abcam, Réf. Ab51054), d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la fibrilline 1 (Abcam, Réf. Ab3090), puis d'un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin couplé à un  
25 fluorochrome (Invitrogen, Réf. A21202 et A21206). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage du collagène I est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision). Une quantification  
30 de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage p16 et K14 est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision). Une quantification de la longueur des fibres obtenues après marquage fibrilline 1 est réalisée, à l'aide du logiciel ImageJ.

Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 6 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h (p16 et K14) ou 72h (fibrilline 1) permettent d'observer une diminution significative de l'expression de p16, une augmentation significative de l'expression de la kératine 14 et une augmentation de la longueur des fibres comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3 et 4 à partir de plantes provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. Les résultats obtenus sur la quantification du marquage de p16 sur peau ex vivo traitée pendant 48h avec différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 6) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 6.

Tableau 6 :

	Expression de p16 (%)	Expression de K14 (%)	Longueur des fibres de fibrilline 1 (%)
Contrôle	100	100	100
Extrait d'aneth d'Egypte selon l'exemple 4	79	115	116
Extrait d'aneth de Chine non himalayenne selon l'exemple 3	102	104	93
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	65	122	138

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) limite l'expression de p16 et stimule davantage l'expression de K14 et de fibrilline 1 dans la peau ex vivo humaine en comparaison des extraits d'aneth enrichi en petits ARN (exemples 3 et 4) provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. Ces protéines sont impliquées dans le vieillissement de la peau. L'extrait d'aneth, et notamment d'aneth provenant d'Himalaya,



obtenu selon l'invention permet donc de lutter efficacement contre les signes du vieillissement cutané.

5 Exemple 19 : Evaluation des effets des extraits d'aneth  
selon les exemples 5, 6 et 7 sur la fonction barrière de la peau  
par l'étude de la pénétration du Lucifer Yellow dans des  
épidermes reconstruits (RHE) stressés

Le but de cette étude est de comparer les effets de trois extraits d'aneth d'Himalaya sur le maintien de la fonction  
10 barrière d'une peau reconstruite stressée par du SDS et des  
particules grossières de pollution (PM10). Le premier extrait  
enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple  
5, le deuxième extrait ne contenant pas d'ARN de petit poids  
moléculaire, obtenu selon l'exemple 6 et le dernier extrait  
15 obtenu après macération selon l'exemple 7.

L'étude de la pénétration du colorant fluorescent, Lucifer Yellow, est un moyen de juger de l'état de la barrière cutanée.

Protocole:

Des épidermes reconstruits de peau humaine (RHE) de 8 mm de  
20 diamètre sont maintenues en culture en présence d'un milieu  
spécifique sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant  
72h. Elles reçoivent 2 applications par jour pendant 48h d'un  
extrait d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 dilué au 1/100ème  
dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume,  
25 puis 1 application de SDS à 0,15% pendant 3h, puis 1 application  
de PM10 à 100 µg/ml pendant 24h. Deux conditions contrôles sont  
réalisées à l'aide de PBS 1X, suivi, ou non, de l'application de  
SDS et de PM10. Les applications sont réalisées sous forme d'une  
goutte de 150 µl déposée à la surface des RHE. Après les  
30 traitements le Lucifer Yellow est appliqué sur les RHE à 0,5  
mg/ml pendant 1h. Les RHE sont ensuite fixés dans le formaldéhyde  
puis incluses dans la paraffine. Des coupes de 4 µm d'épaisseur  
sont ensuite réalisées. Les RHE sont alors examinées au  
microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une

quantification de la pénétration de la fluorescence obtenue après application du Lucifer Yellow est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

#### Résultats:

5 L'application des stress SDS et PM10 induit une perméabilisation de la barrière cutanée qui laisse pénétrer le Lucifer Yellow.

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 7 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits  
 10 ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h avant stress SDS et PM10 permettent d'observer une pénétration du Lucifer Yellow moins profonde, comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X avant stress SDS et PM10 et comparé aux traitements avec les extraits  
 15 d'aneth obtenus selon les exemples 6 (absence d'ARN de petit poids moléculaire) et 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya. L'extrait d'aneth obtenu selon l'invention permet donc de renforcer la fonction barrière de la peau.

Tableau 7 :

	Pénétration du Lucifer Yellow (%)
Contrôle stressé	100
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5 + stress	77
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 6+ stress	103
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 7+ stress	112

#### 20 Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) permet de limiter la pénétration du Lucifer Yellow, donc de renforcer la fonction barrière, dans des RHE stressés au SDS et PM10. Les extraits d'aneth d'Himalaya non enrichis en petits ARN  
 25 (exemples 6 et 7) ne permettent pas ce renforcement.

Exemple 20 : Evaluation des effets des extraits d'aneth de différentes origines (Chine non himalayenne, Egypte, Chine d'Himalaya) respectivement selon les exemples 3, 4 et 5 sur la fonction barrière de la peau par l'étude de la pénétration du Lucifer Yellow dans des épidermes reconstruits (RHE) stressés

Le but de cette étude est de comparer, sur le maintien de la fonction barrière d'une peau reconstruite stressée par du SDS et des particules grossières de pollution (PM10), les effets de trois extraits d'aneth obtenu selon les exemples 3, 4 et 5 ayant des origines géographiques différentes. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine non himalayenne, le deuxième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Egypte et le troisième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Himalaya.

L'étude de la pénétration du colorant fluorescent, Lucifer Yellow, est un moyen de juger de l'état de la barrière cutanée.

Protocole:

Des épidermes reconstruits de peau humaine (RHE) de 8 mm de diamètre sont maintenues en culture en présence d'un milieu spécifique sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 72h. Elles reçoivent 2 applications par jour pendant 48h d'un extrait d'aneth de différentes origines géographiques dilué au 1/100eme dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume, puis 1 application de SDS à 0,15% pendant 3h, puis 1 application de PM10 à 100 µg/ml pendant 24h. Deux conditions contrôles sont réalisées à l'aide de PBS 1X, suivi, ou non, de l'application de SDS et de PM10. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 150 µl déposée à la surface des RHE. Après les traitements le Lucifer Yellow est appliqué sur les RHE à 0,5 mg/ml pendant 1h. Les RHE sont ensuite fixés dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de 4 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées. Les RHE sont

alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de la pénétration de la fluorescence obtenue après application du Lucifer Yellow est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

## 5 Résultats:

L'application des stress SDS et PM10 induit une perméabilisation de la barrière cutanée qui laisse pénétrer le Lucifer Yellow.

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 8 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h avant stress SDS et PM10 permettent d'observer une pénétration du Lucifer Yellow moins profonde, comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X avant stress SDS et PM10 et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3 et 4 à partir de plantes provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte.

Tableau 8 :

	Pénétration du Lucifer Yellow (%)
Contrôle stressé	100
Extrait d'aneth d'Egypte selon l'exemple 4 + stress	108
Extrait d'aneth de Chine non himalayenne selon l'exemple 3 + stress	87
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5 + stress	77

## Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) permet de limiter la pénétration du Lucifer Yellow, donc de renforcer la fonction barrière, dans des RHE stressés au SDS et PM10. Les extraits d'aneth enrichi en petits ARN (exemples 3 et 4) provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte ne permettent pas ou moins ce renforcement. L'extrait d'aneth, et notamment

d'aneth provenant d'Himalaya, obtenu selon l'invention permet donc de renforcer la fonction barrière de la peau.

Exemple 21 : Evaluation des effets des extraits d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 sur le cuir chevelu

Le but de cette étude est de comparer les effets de trois extraits d'aneth d'Himalaya sur le cuir chevelu. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 5, le deuxième extrait ne contenant pas d'ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 6 et le dernier extrait obtenu après macération selon l'exemple 7.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois extraits d'aneth sur l'expression de la kératine 14 (K14) qui est exprimée dans l'épiderme et dans les cheveux. Cette protéine est remplacée par d'autres kératines avec la différenciation des cellules de l'épiderme. Dans les cheveux, elle est exprimée dans la gaine externe (Coulombe PA, Kopan R, Fuchs E. Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: insights into complex programs of differentiation. JCB 1989 109(5): 2295-312) et est un marqueur de bonne santé du cheveux.

Protocole:

Des biopsies de cuir chevelu humain de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 48h et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm sont ensuite réalisées. Le marquage de la kératine 14 est effectués après démasquage des sites spécifiques. L'immunomarquages est réalisé

à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin spécifique de la kératine 14 (Abcam, Réf. Ab51054), puis d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf. A21206). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-  
 5 fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage K14 est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

#### Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 9 ci-  
 10 après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h permettent d'observer une augmentation significative de l'expression de la kératine 14 comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé  
 15 aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 6 (absence d'ARN de petit poids moléculaire) et 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya.

Tableau 9 :

	Expression de K14 (%)
Contrôle	100
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	123
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 6	104
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 7	93

#### Conclusion:

20 L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule davantage l'expression de K14 dans la peau ex vivo humaine en comparaison des extraits d'aneth d'Himalaya non enrichis en petits ARN (exemples 6 et 7). La kératine 14 est impliquée dans la bonne santé des cheveux. L'extrait d'aneth  
 25 obtenu selon l'invention permet donc de renforcer la structure du cheveu, d'améliorer leur apparence et de favoriser leur lissage et leur résistance.

Exemple 22 : Evaluation des effets des extraits d'aneth de différentes origines (Chine non himalayenne, Egypte, Chine d'Himalaya) respectivement selon les exemples 3, 4 et 5 sur le cuir chevelu

5 Le but de cette étude est de comparer les effets sur le cuir chevelu de trois extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3, 4 et 5 ayant des origines géographiques différentes. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine non himalayenne, le deuxième  
10 extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Egypte et le troisième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Himalaya.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois  
15 extraits d'aneth sur l'expression de la kératine 14 (K14) qui est exprimée dans l'épiderme et dans les cheveux.

Protocole:

Des biopsies de cuir chevelu humain de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu  
20 spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 48h et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth de différentes origines géographiques, dilué au 1/100eme dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle  
25 est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm sont ensuite réalisées. Le marquage de la kératine 14 est effectués  
30 après démasquage des sites spécifiques. L'immunomarquages est réalisé à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin spécifique de la kératine 14 (Abcam, Réf. Ab51054), puis d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf. A21206). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-

fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage K14 est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

Résultats:

5 Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 10 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h permettent d'observer une augmentation significative de l'expression de la kératine 14 comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3 et 4 à partir de plantes provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte.

Tableau 10 :

	Expression de K14 (%)
Contrôle	100
Extrait d'aneth d'Egypte selon l'exemple 4	121
Extrait d'aneth de Chine non himalayenne selon l'exemple 3	117
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	123

15 Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule davantage l'expression de K14 dans la peau ex vivo humaine en comparaison des extraits d'aneth enrichi en petits ARN (exemples 3 et 4) provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. La kératine 14 est impliquée dans la bonne santé des cheveux. L'extrait d'aneth, et notamment provenant d'aneth d'Himalaya, obtenu selon l'invention permet donc de renforcer la structure du cheveu, d'améliorer leur apparence et de favoriser leur lissage et leur résistance.



**REVENDICATIONS**

1. Composition cosmétique caractérisée en ce qu'elle comprend, en tant qu'agent actif, dans un milieu physiologiquement acceptable, une quantité efficace d'un extrait aqueux des parties aériennes d'aneth (*Anethum graveolens*) enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides obtenu à partir d'une matière végétale suivant les étapes suivantes selon lesquelles :

10 a) on met en présence des parties aériennes d'*Anethum graveolens* avec de l'eau ;

b) on ajoute de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) tétrasodique dans le mélange obtenu en a) à un pH compris entre 10,5 et 11 ;

15 c) on ajuste ensuite le pH du mélange obtenu en b) à une valeur comprise entre 6 et 8 ;

d) on purifie le mélange obtenu en c) de manière à éliminer la matière végétale solide résiduelle et obtenir un extrait brut aqueux purifié ; et

20 e) on contrôle le pH et on le réajuste si nécessaire à une valeur comprise entre 6 et 8, préférentiellement entre 6 et 6,5.

2. Composition cosmétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrait aqueux de partie aérienne d'aneth enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides et dépourvu d'ADN, comprend en poids du poids total de l'extrait, 10 à 30 g/kg d'extrait de poids sec, 2 à 10 g/kg de fragments protéiques, 2 à 10 g/kg de sucres, 0,2 à 3 g/kg d'acides aminés, 100 à 2000 mg/kg de composés phénoliques et 10 à 100 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides et ne comprend pas d'ADN.

3. Composition cosmétique selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'extrait est dilué dans un solvant et comprend en poids du poids total de l'extrait, 5-15 g/kg

d'extrait sec, de 50 à 1000 mg/kg de polyphénols 0,5-10 g/kg de fragments protéiques, 0,5-10 g/kg de sucres, de 0,1 à 1 g/kg d'acides aminés et 10-100 mg/kg de petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

5           4. Composition cosmétique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'extrait est obtenu à partir d'aneth d'Himalaya.

10           5. Composition cosmétique selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'extrait est présent à une concentration comprise entre 0,1 et 5% en poids du poids total de la composition.

15           6. Composition cosmétique selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'extrait est présent à une concentration comprise entre 0,5 et 2,5% en poids du poids total de la composition.

7. Composition cosmétique selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est formulée pour être administrée par voie orale ou être appliquée topiquement sur la peau.

20           8. Utilisation cosmétique d'une composition selon l'une des revendications 1 à 7 pour le soin de la peau, du cuir chevelu et des phanères.

25           9. Utilisation cosmétique selon la revendication 8, pour améliorer l'hydratation de la peau et renforcer la fonction barrière.

10. Utilisation cosmétique selon la revendication 8, pour lutter contre les signes du vieillissement cutané et améliorer la fermeté et l'élasticité de la peau.

30           11. Utilisation cosmétique selon la revendication 8, pour améliorer la santé du cheveu.

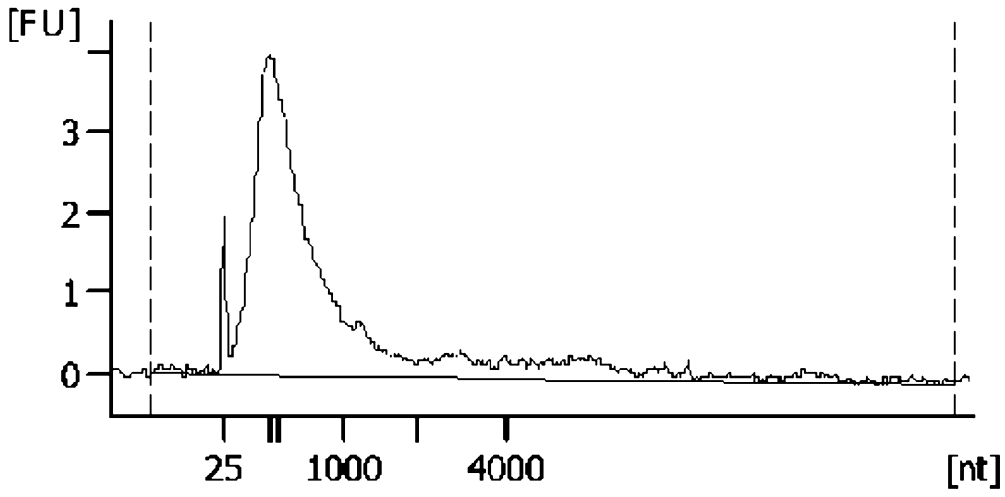


Fig. 1

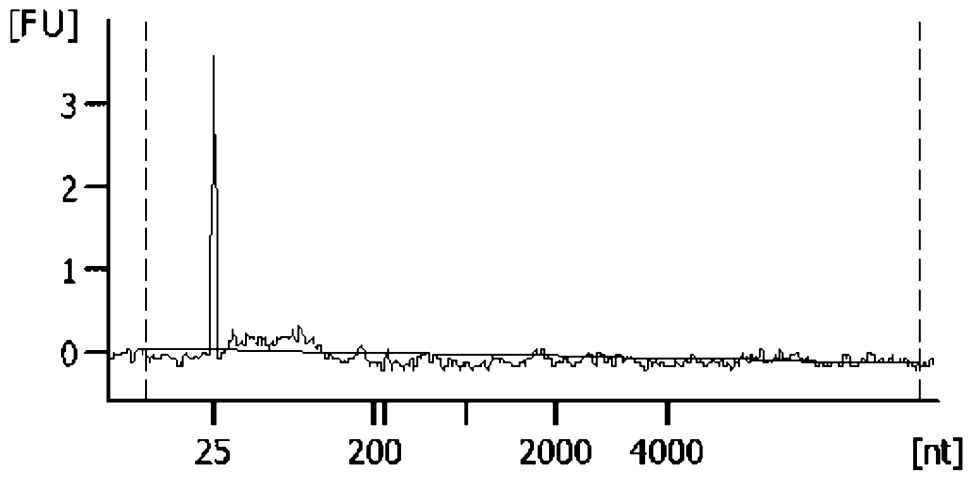


Fig. 2

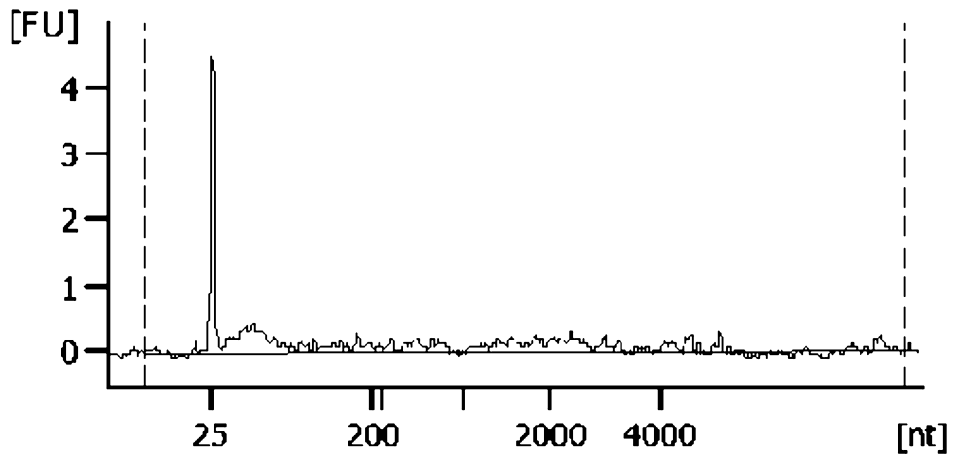


Fig. 3

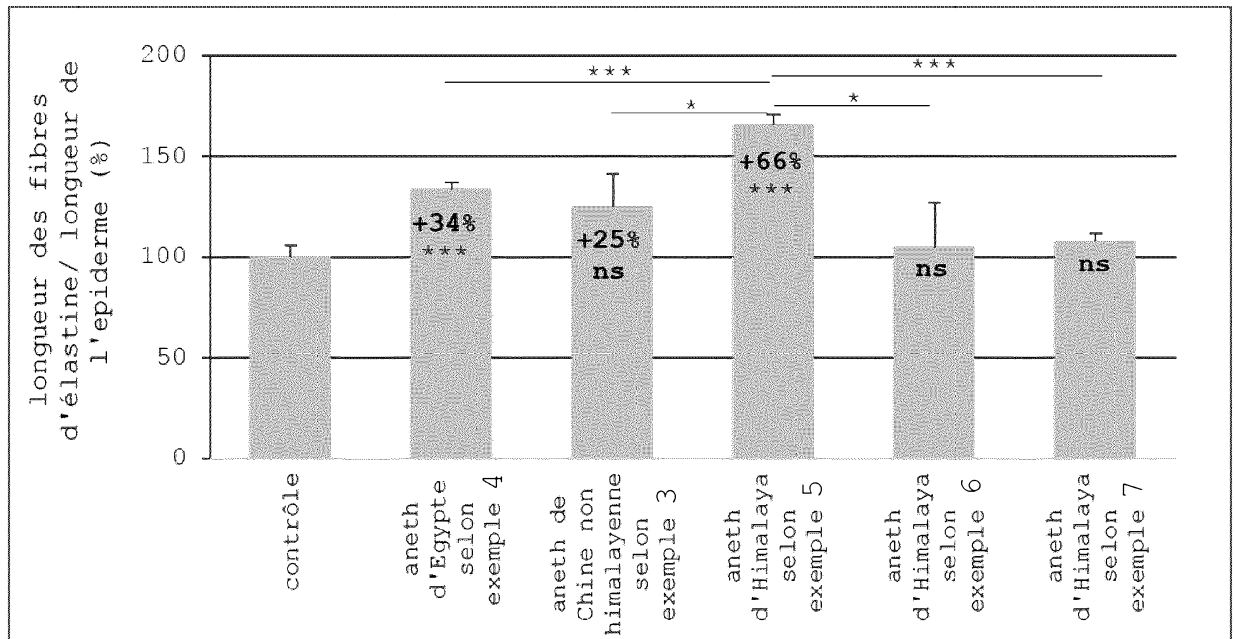


Fig. 4

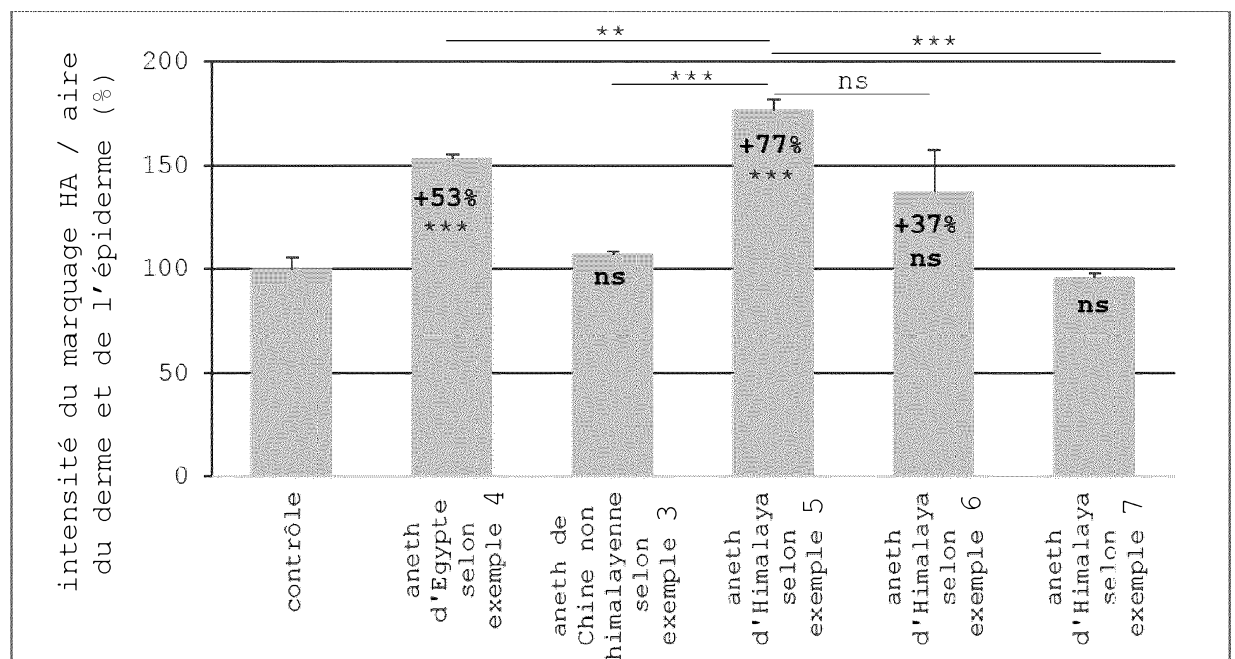


Fig. 5

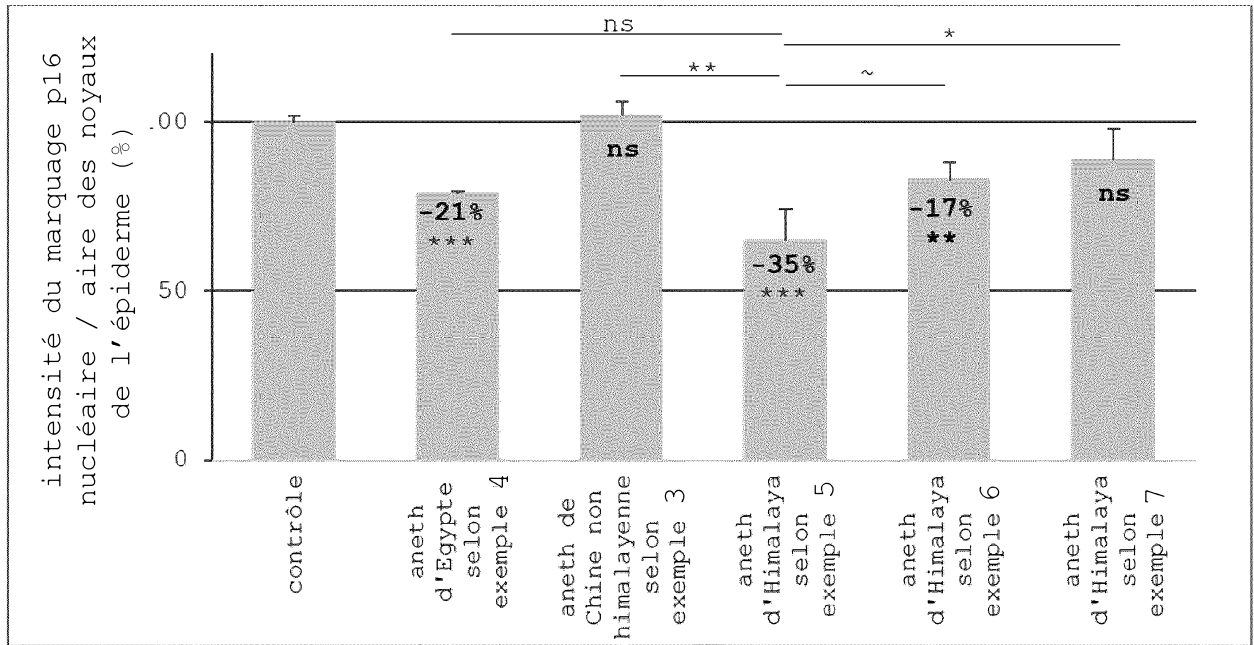


Fig. 6

# RAPPORT DE RECHERCHE

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

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

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

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

## CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

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

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

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

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

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

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

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

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

NEANT

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

DE 10 2010 027180 A1 (HENKEL AG &amp; CO KGAA [DE]) 26 mai 2011 (2011-05-26)

US 2010/215785 A1 (KIZOULIS MENAS G [US] ET AL) 26 août 2010 (2010-08-26)

US 2010/239510 A1 (HA ROBERT BAO KIM [US] ET AL) 23 septembre 2010 (2010-09-23)

US 2012/308620 A1 (ZADINI FILIBERTO P [US] ET AL) 6 décembre 2012 (2012-12-06)

Ronald J. Smernik, Ashlea L. Doolette, Sarah R. Noack: "Identification of RNA Hydrolysis Products in NaOH-EDTA extracts using <sup>31</sup>P NMR Spectroscopy", Communications in Soil Science and Plant Analysis , 12 octobre 2015 (2015-10-12), pages 2746-2756, XP002775075, DOI: 10.1080/00103624.2015.1093640 Extrait de l'Internet: URL:<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00103624.2015.1093640> [extrait le 2017-10-26]

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

NEANT