

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 143 366**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **22 13298**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 8/97 (2023.01), A 61 Q 19/00, 19/08**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 14.12.22.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.06.24 Bulletin 24/25.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : SOCIETE INDUSTRIELLE LIMOU-
SINE D'APPLICATION BIOLOGIQUE Société ano-
nyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : PAUFIQUE Jean.

⑦③ Titulaire(s) : SOCIETE INDUSTRIELLE LIMOUSINE
D'APPLICATION BIOLOGIQUE Société anonyme.

⑦④ Mandataire(s) : AQUINOV.

⑫④ Principe actif cosmétique contenant un extrait de *Aureobasidium pullulans*.

⑫⑤ La présente concerne un principe actif cosmétique ob-
tenu à partir d'une levure de l'espèce *Aureobasidium pullu-*
lans et ses utilisations cosmétiques, en particulier pour une
application anti-âge.

FR 3 143 366 - A1



Description

Titre de l'invention : Principe actif cosmétique contenant un extrait de *Aureobasidium pullulans*

Domaine technique

- [0001] L'invention concerne un principe actif cosmétique obtenu à partir d'une levure de l'espèce *Aureobasidium pullulans* et ses utilisations cosmétiques, en particulier pour une application anti-âge.
- [0002] **Etat de l'art**
- [0003] L'industrie cosmétique est toujours à la recherche de nouveaux ingrédients cosmétiques pour satisfaire les besoins des consommateurs.
- [0004] Il existe donc un besoin pour de nouveaux produits cosmétiques anti-âge permettant surtout d'améliorer l'éclat du teint et la fonction barrière, voire de diminuer les rougeurs ou encore d'atténuer les rides.
- [0005] Pour répondre à ce besoin, l'inventeur s'est intéressé à des matières premières naturelles et originales pour développer de tels ingrédients. Les levures, en particulier les levures dites adaptogènes et polyextrémotolérantes, ont la particularité de survivre dans des environnements très hostiles (températures extrêmes, milieux pauvres en nutriments ou en matières organiques, milieux secs, ou encore milieux très exposés aux UVs). Pour survivre, elles ont su développer des mécanismes d'adaptation remarquables et représentent ainsi un intérêt certain pour l'industrie cosmétique.
- [0006] Contrairement à l'art antérieur qui utilise essentiellement la levure *Aureobasidium pullulans* pour fermenter des matières organiques animales ou végétales ou produire un polysaccharide particulier, le pullulan, l'inventeur utilise la biomasse des levures pour développer de nouveaux ingrédients d'intérêt.
- [0007] Dans ce contexte, l'inventeur a, de façon très surprenante, identifié une levure appartenant à l'espèce *Aureobasidium pullulans* dans le microbiote de rosiers cultivés sur le plateau de Valensol en France.

Résumé de l'invention

- [0008] Ainsi, l'invention propose un nouveau principe actif cosmétique obtenu à partir d'une levure de l'espèce *Aureobasidium pullulans*.
- [0009] La levure *Aureobasidium pullulans*, également dénommée levure noire ou « Black yeast » est ubiquiste, polyextrémotolérante et se présente soit sous forme de champignon filamenteux, soit sous forme unicellulaire. *Aureobasidium pullulans* est bien connue comme épiphyte naturel de nombreuses espèces végétales, telles que la pomme ou le raisin. Depuis plusieurs années, elle est utilisée en biotechnologie pour la production de plusieurs enzymes ou dans la lutte contre certaines maladies du règne

végétal, telles que la maladie du pommier.

- [0010] Enfin, il est également connu, des compositions cosmétiques comprenant un surnageant de culture d'*Aureobasidium pullulans* ou des extraits de plantes fermentés par *Aureobasidium pullulans*, mais aucun enseignement ne décrit l'utilisation d'un extrait d'*Aureobasidium pullulans* contenant au moins 25% de sucres selon la présente invention pour un effet anti-âge.
- [0011] Aussi, l'invention vise un principe actif cosmétique comprenant au moins un extrait issu de la biomasse de la levure de l'espèce *Aureobasidium pullulans*, en particulier un principe actif cosmétique comprenant au moins 25% de sucres, en poids de matière sèche de l'extrait.
- [0012] Dans le contexte de l'invention, la levure *Aureobasidium pullulans* a été prélevée sur des rosiers, avantageusement cultivés sur le plateau de Valensol (France), préférentiellement la levure est prélevée sur les fleurs, et/ou les épines et/ou les racines de *Rosa sp.*
- [0013] L'invention se rapporte également à un procédé de préparation du principe actif selon l'invention, comprenant notamment une culture de la biomasse d'*Aureobasidium pullulans* dans un milieu de culture, suivie d'une solubilisation de la levure *Aureobasidium pullulans* dans l'eau, une extraction des sucres, une séparation de la phase soluble et insoluble, puis une récupération de la phase soluble, une inactivation enzymatique, une purification et éventuellement une concentration de l'extrait suivie d'une filtration stérilisante.
- [0014] Le principe actif selon l'invention est d'origine naturelle. Il présente avantageusement un effet anti-âge, permettant ainsi de répondre aux problématiques de l'art antérieur. Aussi, il peut être utilisé pour des applications cosmétiques et être ainsi intégré dans une composition cosmétique, avantageusement une composition sous une forme adaptée à une application topique. L'invention se rapporte donc également à une utilisation cosmétique d'une composition comprenant au moins 0,1% en poids du principe actif selon l'invention, en particulier pour ses effets anti-âges.
- [0015] D'autres caractéristiques et avantages ressortiront de la description détaillée de l'invention et des exemples qui vont suivre.

Description détaillée de l'invention

[0016] Définition

- [0017] Par « *Aureobasidium pullulans* » au sens de l'invention, on entend toute levure de la famille des *Dothioraceae*, du genre *Aureobasidium* et de l'espèce *Aureobasidium pullulans*. Préférentiellement, une souche de la levure *Aureobasidium pullulans* enregistrée dans une collection de levures (CIRM), sous le numéro CLIB 2138. Préférentiellement, *Aureobasidium pullulans* a été isolée à partir de rosiers (*Rosa sp.*).

- [0018] Par « principe actif cosmétique » au sens de l'invention, on entend un extrait comprenant au moins un ensemble de molécules présentant un effet cosmétique sur la peau. Préférentiellement l'effet cosmétique sur la peau est un effet anti-âge.
- [0019] Par « extrait de *Aureobasidium pullulans* » au sens de l'invention, on entend un extrait comprenant au moins un ensemble de molécules, préférentiellement un extrait de la biomasse de la levure *Aureobasidium pullulans* comprenant au moins des sucres représentant au moins 25% en poids du poids total de l'extrait, obtenu à partir de tout procédé d'extraction bien connu de l'Homme du métier, par exemple par autolyse induite, sonication, homogénéisation, hydrolyse chimique, ou hydrolyse enzymatique. De tels procédés d'extraction sont décrits dans les publications Varelas V. *et al.*, Drug Test Anal. 2016 Jan et Du L. *et al.* Molecules. 2020 Jan 23. L'extrait selon l'invention n'est pas un extrait du surnageant de culture d'*Aureobasidium pullulans*.
- [0020] Par « extrait du surnageant de culture de levure », on entend un extrait n'étant pas un extrait de la biomasse de culture d'*Aureobasidium pullulans*.
- [0021] Principe actif selon l'invention
- [0022] La présente invention a donc pour objet un principe actif cosmétique comprenant au moins un extrait de la biomasse de la levure de l'espèce *Aureobasidium pullulans*, dans lequel l'extrait est riche en sucres.
- [0023] Selon un mode de réalisation, la levure *Aureobasidium pullulans* est préférentiellement la levure *Aureobasidium pullulans* est obtenue à partir de rosiers, plus préférentiellement à partir des fleurs, et/ou des épines et/ou des racines de *Rosa sp.*
- [0024] La biomasse d'*Aureobasidium pullulans* est notamment produite à partir de la levure. Cette étape est réalisée selon le mode de culture des levures, dans un milieu adapté à leur développement, par exemple un milieu de culture adapté classique pour l'homme de métier. Une fois la biomasse obtenue, on réalise une étape d'extraction en vue d'obtenir les molécules actives, préférentiellement une extraction des sucres.
- [0025] L'extrait selon l'invention comprend au moins 25% de sucres en poids de matière sèche de l'extrait. L'extrait selon l'invention peut également comprendre des peptides et des cendres minérales.
- [0026] Ainsi, l'extrait selon l'invention comprend des sucres, ceux-ci représentent au moins 25% de l'extrait, en poids de matière sèche de l'extrait. Préférentiellement, l'extrait selon l'invention comprend au moins 30% de sucres, en poids de matière sèche de l'extrait.
- [0027] La teneur en sucres totaux dans ledit principe actif peut être déterminée par la méthode de DUBOIS (Dubois M. et al., Analytical chemistry, 28, 3, 350-356, 1956). La teneur en sucres totaux dans le principe actif selon l'invention est exprimée en pourcentage par rapport à la matière sèche.
- [0028] La taille des sucres présents dans l'extrait peut être caractérisée par chromatographie

HPLC/RI. Ils peuvent être sous forme de monosaccharides ou sous forme d'oligosaccharides, préférentiellement les oligosaccharides ont une masse molaire inférieure à 1800Da.

- [0029] De façon particulièrement préféré, les oligosaccharides sont majoritaires au sein de l'extrait selon la présente invention. Enfin, selon un mode de réalisation particulièrement préféré, les sucres de l'extrait sont composés d'au moins 80% d'oligosaccharides.
- [0030] Préférentiellement, les oligosaccharides de l'extrait sont des oligosaccharides de glucose liés par des liaisons alpha et/ou des oligosaccharides de glucose liés par des liaisons bêta.
- [0031] Les oligosaccharides de glucose liés en alpha sont des oligomères constitués de D-glucose liés par des liaisons alpha. Ces oligosaccharides présents dans le principe actif selon l'invention présentent un degré de polymérisation (DP) compris entre 2 et 10 unités, et présentent une masse molaire inférieure à 1800 Daltons. Préférentiellement, ils représentent entre 1,5 et 4 g/L.
- [0032] Les oligosaccharides de glucose liés en bêta sont des oligosaccharides, constitués de D-glucose liés par des liaisons bêta. Ces oligosaccharides présents dans le principe actif selon l'invention présentent un degré de polymérisation compris entre 2 et 10 unités, et présentent une masse molaire inférieure à 1800 Daltons. Préférentiellement, ils représentent entre 1,5 et 4 g/L.
- [0033] Aussi, le principe actif cosmétique selon l'invention comprend des sucres de structures oligosaccharidiques ayant un degré de polymérisation (DP) inférieur à 10, soit d'une masse molaire inférieure à 1800 Daltons.
- [0034] L'extrait selon l'invention comprend également des peptides. Préférentiellement, ceux-ci représentent au moins 30% en poids de matière sèche de l'extrait. La teneur en peptides peut être déterminée en mesurant la teneur en azote total selon la méthode de KJELDHAL (référence : Official method of analysis of the A.O.C., 12th ed. W Horwitz, E.D., New-York, 15-60, 1975). Les peptides ont une masse molaire inférieure à 2000Da. La répartition et la masse molaire des peptides peut être déterminée par chromatographie F.P.L.C. d'exclusion stérique (Fast Protein Liquid Chromatography), la quantité de chaque fraction peptidique est déterminée par dosage spectrophotométrique selon la méthode de Lowry (Lowry et al., Protein measurement with the Folin reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951).
- [0035] Lorsque l'extrait selon l'invention comprend des cendres minérales, le taux de cendres est préférentiellement compris entre 8 et 18% en poids par rapport à la matière sèche de l'extrait, encore plus préférentiellement compris entre 10 et 15%. La teneur en cendres brutes peut être déterminée par la pesée des résidus issus de l'incinération des échantillons à 550°C dans un four à moufle. La nature des minéraux contenus dans

les cendres peut être déterminée par spectrométrie d'émission optique (ICP / OES). Le dosage des ions chlorure contenus dans les cendres est réalisé par titration avec du nitrate d'argent. Préférentiellement, les cendres minérales contenues dans l'extrait selon l'invention comprennent du calcium, du phosphore, des ions chlorure, du magnésium, du soufre et du sodium.

- [0036] La teneur en matières sèches de l'extrait peut être déterminée par la pesée des résidus issus du séchage de l'extrait selon l'invention à 105°C dans une étuve jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Préférentiellement, l'extrait selon l'invention sous forme liquide a une teneur en matières sèches de : 10 g/L à 40 g/L, encore plus préférentiellement de 17 g/L à 26 g/L.
- [0037] Le principe actif cosmétique selon l'invention peut se présenter sous forme liquide ou sous forme solide.
- [0038] Lorsqu'il se présente sous forme liquide, le principe actif selon l'invention est préférentiellement l'extrait tel que décrit précédemment en tant que tel. Il se présente sous forme d'un liquide limpide, de couleur jaune très clair et présentant une faible odeur. Il peut toutefois être plus coloré et/ou être décoloré par tout procédé connu de l'homme du métier. Le principe actif peut également être combiné à des agents de stabilisation ou des agents de conservation.
- [0039] Lorsqu'il se présente sous forme solide le principe actif selon l'invention est préférentiellement constitué par l'extrait d'*Aureobasidium pullulans* tel que précédemment décrit et par un support choisi parmi la maltodextrine, la gomme arabique, la lécithine de soja ou l'isomalt. Selon un mode de réalisation, particulièrement adapté, l'extrait représente au moins 10% en poids du principe actif et le support au plus 90% en poids du principe actif.
- [0040] Dans le cas d'une forme solide dans laquelle le principe actif est associé à un support, les teneurs en peptides, en sucres et en cendres minérales dans le principe actif sont modifiées, le support étant généralement constitué majoritairement de sucres.
- [0041] Le principe actif selon l'invention peut éventuellement être intégré dans une composition cosmétique, notamment une composition comprenant au moins 0,1% en poids dudit principe actif. En particulier, la composition est sous une forme adaptée à une application topique tel qu'une crème ou une lotion.
- [0042] Procédé d'extraction
- [0043] L'extrait constituant ou contenu dans le principe actif selon l'invention peut être obtenu par tout procédé comprenant au moins une étape d'extraction de la biomasse de la levure d'*Aureobasidium pullulans*. Selon la présente invention, l'extraction de la biomasse de la levure ne consiste pas en la récupération du surnageant de la culture de la levure.
- [0044] Préalablement au procédé d'obtention de l'extrait en tant que tel, il convient de

produire la biomasse d'*Aureobasidium pullulans*. Cette étape est réalisée selon le mode de culture des levures dans un milieu adapté à leur développement, par exemple un milieu de culture adapté classique pour l'homme de métier. Une fois la biomasse obtenue, on réalise une étape d'extraction en vue d'obtenir les molécules actives, préférentiellement des sucres. L'étape d'extraction est réalisée par tout moyen connu de l'homme du métier, par exemple par autolyse induite, sonication, homogénéisation, lyse enzymatique, hydrolyse chimique, hydrolyse enzymatique.

[0045] Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, le principe actif selon l'invention est obtenu par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- a. culture de la biomasse d'*Aureobasidium pullulans* dans un milieu de culture, préférentiellement un milieu de culture adapté,
- b. solubilisation à raison d'au moins 50 g/L de la biomasse d'*Aureobasidium pullulans* dans l'eau,
- c. extraction, préférentiellement extraction des sucres,
- d. traitement thermique,
- e. séparation de la phase soluble et insoluble, et récupération de la phase soluble,
- f. purification par tri moléculaire, et éventuellement décoloration et désodorisation,
- g. éventuellement concentration et filtration stérilisante.

[0046] La séparation de la phase soluble et insoluble est réalisée par tout moyen connu de l'homme du métier, par exemple par centrifugation, filtration ou décantation. Préférentiellement, la séparation des phases soluble et insoluble est réalisée pour récupérer la phase soluble contenant entre autres les sucres solubles, tels que les oligosaccharides.

[0047] Eventuellement, le procédé comprend une étape de filtration après la récupération de la phase soluble pour éliminer les particules encore en suspension. Ainsi, cette étape de filtration permet la purification de la phase soluble récupérée et est réalisée afin d'éliminer les molécules de haut poids moléculaire.

[0048] Le produit obtenu à ce stade peut éventuellement être encore concentré et/ou purifié, préférentiellement par des étapes d'ultrafiltrations successives à travers des filtres de porosité différentes, en conservant les filtrats à chaque étape et/ou par une méthode de type chromatographique.

[0049] Le produit obtenu après filtration, avant ou après concentration et filtration stérilisante, est un extrait d'*Aureobasidium pullulans*, et constitue une première forme du principe actif selon l'invention, se présentant alors sous forme liquide.

[0050] L'extrait obtenu peut ensuite être séché et associé ou non à un support, pour se présenter sous forme solide. Cette phase peut être réalisée par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- un support d'atomisation, de préférence la maltodextrine, est ajouté dans

- l'extrait d'*Aureobasidium pullulans*, d'au plus 90% (en masse/volume) ;
- cette solution est ensuite concentrée sous vide ;
 - une élimination des bactéries éventuellement présentes est réalisée par traitement thermique ;
 - l'atomisation permet d'obtenir une poudre.
- [0051] Les étapes des procédés décrits ci-avant, prises individuellement sont usuelles dans le domaine des extractions d'actifs à partir de levures et l'homme du métier est à même d'en ajuster les paramètres réactionnels sur la base de ses connaissances générales.
- [0052] Utilisation cosmétique
- [0053] Le principe actif selon l'invention est particulièrement d'intérêt pour ses effets anti-âge.
- [0054] L'invention vise ainsi une utilisation cosmétique, non thérapeutique, du principe actif selon l'invention pour ses effets cosmétiques, seul pour au moins un effet cosmétique anti-âge.
- [0055] Par utilisation non thérapeutique, on entend au sens de l'invention une utilisation cosmétique du principe actif selon l'invention ou d'une composition cosmétique le comprenant, destinée à des personnes saines non malades, en particulier à des personnes présentant une peau saine.
- [0056] Préférentiellement, le principe actif selon l'invention, seul ou dans une composition, vise à être utilisé en application topique sur la peau.
- [0057] Le principe actif selon l'invention peut être introduit dans des compositions d'au moins 0,1% en poids du principe actif selon l'invention. Ces compositions comprennent, outre l'actif, un milieu physiologiquement acceptable et de préférence cosmétiquement acceptable, c'est-à-dire qui ne provoque pas de sensations d'inconfort inacceptables pour l'utilisateur telles que des rougeurs, tiraillements ou picotements.
- [0058] L'invention est à présent illustrée par des exemples non limitatifs de compositions selon l'invention et par des résultats.

Exemples

- [0059] Exemple 1 – Principe actif selon l'invention
- [0060] Le principe actif de l'exemple 1 est obtenu à partir d'une levure d'*Aureobasidium pullulans* isolée de rosiers. Le principe actif de l'exemple 1 est obtenu par le procédé suivant :
- a. Culture de *Aureobasidium pullulans* dans un milieu de culture adapté
 - b. Solubilisation de la biomasse de la levure *Aureobasidium pullulans* dans l'eau, à raison de 50g/l,
 - c. Extraction des sucres,
 - d. Traitement thermique,

- e. Séparation des phases solubles et insolubles,
- a. Purification par tri moléculaire,
- b. Concentration, et
- c. Filtration stérilisante.

[0061] Le principe actif obtenu possède les caractéristiques suivantes :

- Teneur en Matières Sèches = 20,1 g/L dont :
- Teneur en Sucres Totaux (selon la méthode de Dubois) = 6,9 g/L (34%, en poids par rapport à la matière sèche)
 - i. Dont la teneur en oligosaccharides de glucose liés en alpha = 2,5g/L
 - ii. Dont la teneur en oligosaccharides de glucose liés en bêta = 2,5g/L
- Teneur en peptides (selon la méthode KJELDHAL) = 6,6 g/L (33%, en poids par rapport à la matière sèche)
- Teneur en cendres minérales = 2,5 g/L (12%, en poids par rapport à la matière sèche)
- pH = 3,5
- Liquide limpide, jaune très clair, faible odeur

[0062] Exemple 2 – Principe actif hors invention

[0063] Le principe actif de l'exemple 2 est également obtenu à partir d'une levure d' *Aureobasidium pullulans* isolée de rosiers. Le principe actif de l'exemple 2 est obtenu par le procédé suivant :

- a. Culture de *Aureobasidium pullulans* dans un milieu de culture adapté
- b. Solubilisation de la biomasse de la levure *Aureobasidium pullulans* dans l'eau, à raison de 50g/l,
- c. Extraction des protéines,
- d. Traitement thermique,
- e. Séparation des phases solubles et insolubles,
- f. Purification par tri moléculaire,
- g. Concentration, et
- h. Filtration stérilisante.

[0064] Le principe actif obtenu possède les caractéristiques suivantes :

- Teneur en Matières Sèches = 26,8 g/L dont :
- Teneur en Sucres Totaux (selon la méthode Dubois) = 2,5 g/L (9%, en poids par rapport à la matière sèche)
- Teneur en Peptides (selon la méthode de KJELDHAL) = 12,4 g/L (46%, en poids par rapport à la matière sèche)
- Teneur en Cendres minérales = 5 g/L (19%, en poids par rapport à la matière sèche)
- pH = 3,6

- Liquide limpide, jaune très clair, odeur faible.

[0065] **Exemple 3 – Principe actif hors invention**

[0066] Le principe actif de l'exemple 3 est obtenu à partir du surnageant de culture de la biomasse de *Aureobasidium pullulans*.

- Culture de *Aureobasidium pullulans* dans un milieu de culture adapté
- Séparation physique afin de récupérer le surnageant de culture de la biomasse
- Filtration stérilisante

[0067] Le principe actif obtenu possède les caractéristiques suivantes :

- Teneur en Matières Sèches = 9,6 g/L dont :
- Teneur en Sucres Totaux (selon la méthode de Dubois) = 1,6 g/L (17%, en poids par rapport à la matière sèche)
- Teneur en Protéines (selon la méthode de Lowry) = 0,11 g/L (1%, en poids par rapport à la matière sèche)
- Teneur en Cendres minérales = 6,2 g/L (65%, en poids par rapport à la matière sèche)
- pH = 6,9
- Liquide limpide, jaune clair, odeur faible.

[0068] **Evaluation de l'effet cosmétique du principe actif selon l'invention**

[0069] **Essai 1 - Effet du principe actif selon l'invention sur le vieillissement des cellules du compartiment épidermique**

[0070] La présente étude vise à étudier l'expression de certains gènes et à déterminer le taux de certaines protéines dans des kératinocytes et traités avec les différents extraits. Les kératinocytes sont vieillis au moyen d'un stress radicalaire UVB, ou sont issus de donneurs âgés.

[0071] Le tableau 1 liste les gènes du compartiment épidermique modulés lors d'un vieillissement par stress radicalaire.

[0072] [Tableaux1]

Symbole	Nom
HSP90AA1	heat shock protein 90 alpha family class A member 1
SIRT1	sirtuin 1

[0073] Le tableau 2 liste les protéines du compartiment épidermique modulées lors d'un vieillissement par stress radicalaire.

[0074] [Tableaux2]

Nom	Symbole
Parkinson disease protein 7	DJ-1
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6	TNR6

[0075] Les résultats de l'étude sont présentés dans les tableaux 3 à 5 ci-après. Le tableau 3 représente l'expression des gènes HSP90AA1 et SIRT1 dans des kératinocytes soumis à un stress radicalaire UVB et traités avec les différents extraits.

[0076] [Tableaux3]

	HSP90AA1 (%)	Efficacité (%)	SIRT1 (%)	Efficacité (%)
Kératinocytes non vieillis, non stressés				
Témoin	100		100	
Kératinocytes vieillis par stress UVB				
Témoin	39		16	
EXEMPLE 1 0,5%	58	+ 48	33	+ 106
EXEMPLE 2 0,5%	46	+ 18	20	+ 25
EXEMPLE 3 0,5%	44	+ 13	3	0

[0077] Le principe actif selon l'invention, riche en sucres, (exemple 1) présente un meilleur effet sur l'expression des gènes HSP90AA1 et SIRT1 dans des kératinocytes vieillis par stress UVB que les extraits hors invention (exemple 2 et exemple 3).

[0078] Le tableau 4 ci-après représente les taux d'expression des protéines DJ-1 et TNR6 dans des kératinocytes vieillis par stress UVB et traités avec les différents extraits.

[0079] [Tableaux4]

	DJ-1 (%)	Efficacité (%)	TNR6 (%)	Efficacité (%)
Kératinocytes non vieillis, non stressés				
Témoin	100		100	
Kératinocytes vieillis par stress UVB				
Témoin	2496		507	
EXEMPLE 1 0,5%	2227	- 11	310	- 39
EXEMPLE 2 0,5%	2290	- 8	417	- 18
EXEMPLE 3 0,5%	2453	- 2	507	0

[0080] Le principe actif selon l'invention, riche en sucres, (exemple 1) présente un meilleur effet sur le taux de protéines DJ-1 et TNR6 dans des kératinocytes vieillis par stress UVB que les extraits hors invention (exemple 2 et exemple 3).

[0081] Le tableau 5 ci-après représente les taux d'expression de la protéine DJ-1 dans des kératinocytes issus de donneurs âgés et traités avec le principe actif selon l'invention (exemple 1).

[0082] [Tableaux5]

	DJ-1 (%)	Efficacité (%)
Kératinocytes jeunes		
Témoin	100	
Kératinocytes âgés		
Témoin	118	
EXEMPLE 1 0,5%	54	- 54

[0083] Le principe actif (exemple 1) selon l'invention, riche en sucres, présente un effet significatif sur le taux d'expression de la protéine DJ-1 dans des kératinocytes issus de donneurs âgés. Ce résultat confirme les résultats obtenus sur des kératinocytes vieillis par stress radicalaire.

[0084] Ainsi, l'extrait riche en sucres selon l'exemple 1 présente un effet sur les voies du métabolisme du vieillissement (HSP90AA1 +48%, SIRT1 +106%, DJ 1 -54%, TNR6 - 39%).

- [0085] L'extrait selon l'exemple 2, riche en protéines, a un effet beaucoup plus faible sur les voies du métabolisme du vieillissement. Aussi, il est moins efficace que l'extrait selon l'exemple 1.
- [0086] L'extrait selon l'exemple 3, extrait du surnageant, ne présente pas d'effet sur les voies du métabolisme de vieillissement dans le compartiment épidermique.
- [0087] Aussi, un extrait riche en sucres permet d'obtenir un effet amélioré sur les voies du métabolisme de vieillissement.
- [0088] Essai 2 – Effet du principe actif selon l'invention sur la migration des kératinocytes âgés
- [0089] La présente étude vise à étudier la capacité des différents extraits à augmenter la migration cellulaire de kératinocytes humains normaux. La migration cellulaire est la capacité de certaines cellules à se mouvoir, cette capacité migratoire est réduite avec l'âge.
- [0090] La présente étude est réalisée sur des kératinocytes issus de donneurs âgés (> 60 ans).
- [0091] Le tableau 6 ci-après représente la quantification de la migration des kératinocytes dans la blessure réalisée dans des cultures de kératinocytes âgés, traités avec les différents extraits.
- [0092] [Tableaux6]

	Migration / Témoin (%)	Efficacité / Témoin (%)
Témoin	100	
EXEMPLE 1 0,5%	123	+23
EXEMPLE 3 0,5%	100	0

- [0093] L'extrait selon l'exemple 3 ne présente pas d'effet sur la migration des kératinocytes âgés. A l'inverse, l'extrait selon l'exemple 1 stimule la migration des kératinocytes âgés, de 23%. Là encore, l'extrait riche en sucres selon l'invention de l'exemple 1 permet un effet amélioré dans la stimulation de la migration des kératinocytes âgés et donc une efficacité anti-âge.

Revendications

- [Revendication 1] Principe actif cosmétique comprenant au moins un extrait de la biomasse de levure de l'espèce *Aureobasidium pullulans*, caractérisé en ce que l'extrait comprend au moins 25% de sucres, en poids de matière sèche de l'extrait.
- [Revendication 2] Principe actif cosmétique selon la revendication précédente caractérisé en ce que la levure *Aureobasidium pullulans* est isolée à partir de rosiers.
- [Revendication 3] Principe actif cosmétique selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la levure est isolée à partir des fleurs, et/ou des épines et/ou des racines de *Rosa sp.*
- [Revendication 4] Principe actif cosmétique selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'extrait comprend au moins 30% de sucres, en poids de matière sèche de l'extrait.
- [Revendication 5] Principe actif cosmétique selon la revendication précédente, caractérisé en ce que les sucres de l'extrait sont composées d'au moins 80% d'oligosaccharides, en poids de matière sèche des sucres.
- [Revendication 6] Principe actif cosmétique selon la revendication précédente, caractérisé en ce que les oligosaccharides sont des oligosaccharides de glucose liés en alpha et/ou des oligosaccharides de glucose liés en bêta.
- [Revendication 7] Principe actif cosmétique selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que les oligosaccharides ont une masse molaire inférieure à 1800 Da.
- [Revendication 8] Principe actif cosmétique selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il se présente sous forme liquide ou sous forme solide.
- [Revendication 9] Principe actif cosmétique selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant les étapes suivantes :
- a. culture de la biomasse de *Aureobasidium pullulans* dans un milieu de culture
 - b. solubilisation d'au moins 50g/L de *Aureobasidium pullulans* dans l'eau,
 - c. extraction des sucres,
 - d. traitement thermique,
 - e. séparation de la phase soluble et insoluble, et récupération de la phase soluble,

- f. purification par tri moléculaire, et éventuellement décoloration et désodorisation, et
- g. éventuellement concentration et filtration stérilisante.

[Revendication 10] Procédé de préparation d'un principe actif selon l'une des revendications 1 à 9 comprenant les étapes suivantes :

- a. culture de la biomasse de *Aureobasidium pullulans* dans un milieu de culture
- b. solubilisation d'au moins 50g/L de *Aureobasidium pullulans* dans l'eau,
- c. extraction des sucres,
- d. traitement thermique,
- e. séparation de la phase soluble et insoluble, et récupération de la phase soluble,
- f. purification par tri moléculaire, et éventuellement décoloration et désodorisation, et
- g. éventuellement concentration et filtration stérilisante.

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 913545
FR 2213298

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 2008/293669 A1 (MORIYA NAOYUKI [JP] ET AL) 27 novembre 2008 (2008-11-27) * alinéas [0050], [0051] * -----	1-10	A61K 8/97 A61Q 19/00 A61Q 19/08 DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K A61Q
X	KR 2019 0032678 A (ARIBIO CO LTD [KR]) 28 mars 2019 (2019-03-28) * alinéas [0015] - [0027], [0034], [0056] - [0073]; revendications 11-17 * -----	1-10	
X	WO 2009/154320 A1 (KOREA RES INST OF BIOSCIENCE [KR]; YOON BYUNG-DAE [KR] ET AL.) 23 décembre 2009 (2009-12-23) * alinéas [0016], [0031], [0046], [0059] - [0062] * -----	1-10	
X	KR 2015 0028201 A (ARIBIO INC [KR]) 13 mars 2015 (2015-03-13) * alinéa [0044] * -----	1-10	
X	KR 2019 0104956 A (ARIBIO CO LTD [KR]) 11 septembre 2019 (2019-09-11) * le document en entier * -----	1-10	
X	CN 114 262 667 A (LG LIFE HEALTH OF JOINT STOCK AGENCY) 1 avril 2022 (2022-04-01) * le document en entier * -----	1-10	
A	JP H06 340701 A (NIPPON OIL CO LTD) 13 décembre 1994 (1994-12-13) * alinéas [0004] - [0007], [0026] * -----	1-10	
A	RO 116 212 B1 (INST DE CERCETARI CHIMICO FARMACEUTICE [RO]) 30 novembre 2000 (2000-11-30) * revendications 1-3 * -----	1-10	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 juillet 2023		Szarek, Sophie	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 913545
FR 2213298

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	CN 107 641 634 A (BEIJING AIPU XILONG BIOTECHNOLOGY CO LTD) 30 janvier 2018 (2018-01-30) * revendications 1-9 * -----	1-10	
A	SHENGJUN WU ET AL: "Effect of two-stage temperature on pullulan production by Aureobasidium pullulans", WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 26, no. 4, 8 novembre 2009 (2009-11-08), pages 737-741, XP019796262, ISSN: 1573-0972 * le document en entier * -----	1-10	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		17 juillet 2023	Szarek, Sophie
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2213298 FA 913545**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **17-07-2023**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2008293669 A1	27-11-2008	AT 511546 T	15-06-2011
		CN 101068931 A	07-11-2007
		EP 1788091 A1	23-05-2007
		HK 1109426 A1	06-06-2008
		JP 4268105 B2	27-05-2009
		JP 2006075076 A	23-03-2006
		KR 20070053734 A	25-05-2007
		KR 20080090573 A	08-10-2008
		US 2008293669 A1	27-11-2008
		WO 2006027914 A1	16-03-2006
-----	-----	-----	-----
KR 20190032678 A	28-03-2019	AUCUN	
-----	-----	-----	-----
WO 2009154320 A1	23-12-2009	KR 20090131815 A	30-12-2009
		WO 2009154320 A1	23-12-2009
-----	-----	-----	-----
KR 20150028201 A	13-03-2015	AUCUN	
-----	-----	-----	-----
KR 20190104956 A	11-09-2019	AUCUN	
-----	-----	-----	-----
CN 114262667 A	01-04-2022	CN 114262667 A	01-04-2022
		JP 2022049690 A	29-03-2022
		KR 20220036790 A	23-03-2022
-----	-----	-----	-----
JP H06340701 A	13-12-1994	JP 3444624 B2	08-09-2003
		JP H06340701 A	13-12-1994
-----	-----	-----	-----
RO 116212 B1	30-11-2000	AUCUN	
-----	-----	-----	-----
CN 107641634 A	30-01-2018	AUCUN	
-----	-----	-----	-----