

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 décembre 2007 (21.12.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/144518 A2

- (51) Classification internationale des brevets : **Non classée**
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/001000
- (22) Date de dépôt international : 15 juin 2007 (15.06.2007)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
0605397 16 juin 2006 (16.06.2006) FR
0605398 16 juin 2006 (16.06.2006) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **LABORATOIRE NUXE** [FR/FR]; 25, rue des Petits Hôtels, F-75010 Paris (FR).
- (72) Inventeur; et
- (75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : **LECLERE, Jacques** [FR/FR]; 70 Route de Sully, F-45500 Saint-Gondon (FR).
- (74) Mandataires : **L'HELGOUALCH, Jean** etc.; Cabinet Sueur & L'Helgoualch, 109, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF A MIMOSA SEED EXTRACT IN A COSMETIC COMPOSITION

(54) Titre : UTILISATION D'UN EXTRAIT DE GRAINES DE MIMOSA DANS UNE COMPOSITION COSMETIQUE

(57) Abstract: The invention relates to a novel use of a mimosa seed extract for the preparation of a cosmetic and/or dermatological composition for topical application, intended to combat the signs of skin ageing. The mimosa seed extract can be advantageously combined with an extract of marigold. The invention also relates to a cosmetic process for combating the signs of skin ageing, which consists in applying to the skin a composition containing an effective amount of mimosa seed extract.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet une nouvelle utilisation d'un extrait de graines de mimosa pour la préparation d'une composition cosmétique et/ou dermatologique pour application topique, destinée à lutter contre les signes du vieillissement cutané. L'extrait de graines de mimosa peut être avantageusement associé à un extrait de souci. L'invention concerne également un procédé cosmétique pour combattre les signes du vieillissement cutané, qui consiste à appliquer sur la peau une composition contenant une quantité efficace d'extrait de graines de mimosa.

WO 2007/144518 A2

**Utilisation d'un extrait de graines de mimosa
dans une composition cosmétique**

La présente invention concerne une nouvelle utilisation dans le domaine cosmétique et/ou dermatologique, et plus particulièrement l'utilisation d'extrait de graines de mimosa pour la préparation d'une composition utilisable en cosmétique et en dermatologie pour les soins et la protection de la peau contre les signes du vieillissement.

La peau comprend des couches superficielles, à savoir l'épiderme, et des couches plus profondes, le derme et l'hypoderme, et chacune possède des propriétés spécifiques permettant à l'ensemble de réagir et s'adapter aux conditions de son environnement. Le derme sert de support à l'épiderme et est principalement constitué de fibroblastes et d'une matrice extracellulaire essentiellement à base de collagène et d'élastine.

Les fibres de collagène contribuent à la tonicité et à l'élasticité de la peau. Avec l'âge, leur renouvellement diminue, ce qui se traduit par un amincissement de la peau, et leur perte progressive d'élasticité entraîne un durcissement de la peau. L'épiderme, qui est constitué de trois types de cellules dont les plus importantes sont les kératinocytes, constitue la couche externe, et joue un rôle fondamental pour assurer la protection et le maintien d'une bonne trophicité. C'est pourquoi de nombreuses compositions ont été mises au point afin de le protéger et d'améliorer les fonctions de la peau.

On sait que le vieillissement de la peau s'accompagne d'un certain nombre de signes et en particulier de la formation de rides plus ou moins profondes et étendues, outre une perte d'élasticité et un amincissement. L'apparition des premières rides, qui peut survenir chez des individus dès l'âge de 30 à 40 ans, est un phénomène qui peut être aggravé par des agressions physiques ou chimiques provenant de la pollution, de l'exposition aux rayonnements ultraviolets ou des modes de vie qui accélèrent le vieillissement cutané.

A l'échelle de la peau, le vieillissement provoque notamment une diminution des synthèses protéiques (collagène, élastine), ainsi qu'une élévation des métalloprotéinases de type MMP-3.

D'une manière générale, le traitement et la prévention des signes du vieillissement cutané sont l'objet de nombreux travaux et études depuis des années, notamment pour mettre au point des compositions susceptibles de favoriser la restructuration tissulaire, et en particulier la néosynthèse d'éléments constitutifs de la peau comme le collagène. Par "néosynthèse", on entend la synthèse du collagène qui se forme uniquement en cas de besoin, par exemple pour le comblement des rides.

10 Par ailleurs, on sait que, pour être acceptées par les utilisateurs, les compositions cosmétiques et/ou dermatologiques destinées au traitement et à la prévention des affections de la peau par application topique doivent être agréables à utiliser et doivent présenter de bonnes propriétés physiques, notamment de consistance et d'onctuosité, tout en garantissant une efficacité satisfaisante et en évitant les inconvénients tels que tiraillements, irritations ou démangeaisons, que peuvent occasionner certains principes actifs.

Dans l'état de la technique, par exemple le brevet 20 FR-A-2.761.607 décrit une composition dermatologique destinée au traitement des symptômes du vieillissement de la peau, comportant un dérivé de silanol méthylé et un dérivé d'une protéine végétale hydrolysée, additionnée le cas échéant d'un dérivé de vitamine C. Le brevet EP-A-662.319 décrit des 25 compositions cosmétiques et dermatologiques comprenant un céramide comme agent apaisant pour compenser l'effet irritant du principe actif anti-vieillessement. Le brevet FR-A-2.783.169 décrit l'utilisation de pentapeptides du type Lys-Thr-Thr-Lys-Ser dans des compositions topiques pour favoriser 30 la synthèse du collagène et des glycosaminoglycannes, et par conséquent la régénération cutanée.

On connaît également, du brevet FR-A-2 848 116, une composition cosmétique et/ou dermatologique à base d'inhibiteurs de métallo-protéinases matricielles, en particulier 35 d'extrait de Siegesbeckia, et de lipopeptides permettant le traitement et la prévention des signes du vieillissement cutané tels que l'apparition de rides et la perte d'élasticité de la peau.

Cependant, il existe toujours un besoin accru de trouver des compositions topiques alternatives permettant de lutter efficacement contre le vieillissement cutané, et notamment de trouver des compositions topiques à base de végétaux
5 appropriés, particulièrement provenant de plantes aisément accessibles et connues pour leurs facultés de résistance.

Suivant la présente invention, on a trouvé qu'il était possible d'agir efficacement contre les signes du vieillissement cutané en utilisant des compositions topiques à base
10 d'extraits de graines de mimosa.

La présente invention a donc pour objet une nouvelle utilisation d'un extrait de graines de mimosa, pour la préparation d'une composition topique à usage cosmétique et/ou dermatologique, permettant de lutter contre les signes
15 du vieillissement cutané tels que l'apparition de rides et la perte d'élasticité de la peau.

La présente invention a encore pour objet un procédé cosmétique pour combattre les signes du vieillissement cutané, consistant à appliquer sur les zones de la peau affectées une composition contenant une quantité efficace
20 d'extrait de graines de mimosa.

Le mimosa, et en particulier les espèces *Acacia dealbata*, *Acacia farnesiana* et *Acacia decurrens*, présente l'avantage d'être extrêmement résistant. Il est en effet
25 capable de repousser aisément, qu'il ait subi le gel ou au contraire une très forte chaleur. En outre, ses graines sont très riches en protéines et en globulines, et possèdent par conséquent un pouvoir tenseur et nutritif. Parmi ces trois espèces, l'*Acacia dealbata* est préféré, dans la mesure où ses
30 graines sont faciles à se procurer.

Dans certaines médecines traditionnelles, les fleurs de l'espèce *Acacia farnesiana* sont utilisées pour traiter les maux de tête et les indigestions, tandis que des décoctions de cosses sont employées pour traiter la dysenterie et les
35 inflammations de la peau.

L'invention a également pour objet une utilisation combinée d'extrait de graines de mimosa et d'extrait de souci pour la préparation d'une composition utilisable en cosmé-

tique et en dermatologie, pour les soins et la protection de la peau contre les signes du vieillissement, ainsi qu'une composition cosmétique utile contre les signes du vieillissement cutané, comprenant en combinaison un extrait de 5 graines de mimosa et un extrait de souci.

Le souci (*Calendula officinalis*, ou "souci des jardins" et *Calendula arvensis*, ou "souci des champs") est déjà connu pour posséder des propriétés thérapeutiques.

En particulier, il a été montré que l'espèce *Calendula officinalis* possède, en usage interne, des propriétés sudorifiques, emménagogues, antispasmodiques et cholérétiques, et, en usage externe, des propriétés vulnérinaires et anti-inflammatoires. Des propriétés ocytociques, hypotensives et vasodilatatrices ont également été mises en évidence. En 10 France, le *Calendula officinalis* est principalement utilisé en homéopathie ou en mélange dans des tisanes. Dans d'autres pays tels que l'Allemagne, les Pays-Bas et la Russie, il est utilisé dans des mélanges théiformes ou, en usage externe, contre les contusions, les ulcères, les gelures et les 15 furoncles.

Il a été montré que le souci pouvait être efficace contre l'acné, et en tant qu'agent adoucissant.

L'espèce *Calendula arvensis* possède également des propriétés emménagogues, vaso-dilatatrices et hypotensives.

25 Les études effectuées par la demanderesse ont montré de manière surprenante que l'utilisation d'une quantité efficace d'un extrait de graines de mimosa, provenant en particulier des espèces *Acacia dealbata*, *Acacia farnesiana* ou *Acacia decurrens*, éventuellement combinée avec une quantité efficace 30 d'extrait de souci (*Calendula officinalis* ou *Calendula arvensis*), avait notamment pour effet de favoriser fortement la synthèse des collagènes, ce qui entraîne un épaissement de l'épiderme et par conséquent un aplanissement des rides, d'améliorer la néosynthèse des collagènes de type I et de 35 type III et de diminuer le rapport collagène I/collagène III, et également de diminuer l'expression des métalloprotéinases III (MMP-3) aboutissant à un meilleur stockage de collagène

néoformé. Les résultats des tests in vitro mettant en évidence ces propriétés sont détaillés ci-après.

Les extraits de mimosa utilisés dans les compositions suivant l'invention sont obtenus à partir de graines de mimosa, par exemple par macération dans l'eau. A cet effet, les graines pulvérisées (10 à 20 g pour la préparation de 100 g d'extrait) sont mises à macérer dans de l'eau déminéralisée à une température comprise entre 40 et 50°C pendant 48 heures, en agitant de temps en temps. Le produit est ensuite filtré, le gâteau est exprimé, et les liqueurs sont réunies et clarifiées. La quantité est ajustée avec de l'eau, et on ajoute 50% d'eau ainsi que 0,5% de conservateur, le tout est complété à 100 et filtré par filtration stérilisante (pourcentages exprimés en poids).

Typiquement, on peut utiliser un extrait aqueux de graines de mimosa présentant la composition suivante :

- matières sèches	2 à 4%
- densité à 22°C	0,980 à 1,020
- indice de réfraction à 22°C	1,330 à 1,350
- pH	5,7 à 7,2
- teneur en protéines totale	>0,1%

(par rapport aux matières sèches)

Les compositions topiques incluent typiquement entre 0,001 et 15% en poids d'extrait de mimosa par rapport au poids total de la composition. De façon avantageuse, une telle composition comprend 2% en poids d'extrait de mimosa par rapport au poids total de la composition.

Comme indiqué ci-dessus, il est important d'utiliser comme source d'extrait les graines de mimosa à l'exclusion de toute autre partie de la plante, en raison de la composition particulière des graines, qui permet de procurer les propriétés spécifiques des compositions de la présente invention.

Lorsque l'extrait de graines de mimosa est utilisé en combinaison avec des extraits de souci, les extraits de souci sont avantageusement obtenus à partir de pétales de fleurs de souci, par exemple par macération hydro-glycolique des fleurs pulvérisées. La macération peut être réalisée dans un mélange butylène-glycol/eau. A cet effet, un mode de réalisation

consiste à faire macérer des pétales de souci pulvérisés dans de l'eau à une température comprise entre environ 45°C et 50°C pendant 48 heures, puis à filtrer et à exprimer le gâteau. Les liqueurs sont ensuite réunies et l'on ajoute 50%
5 de butylène glycol. La mise en œuvre est généralement de 10g / 100g de fleurs sèches.

Typiquement, on peut utiliser un extrait de souci présentant la composition suivante :

- eau / butylène glycol	50/50
10 - matières sèches	1,5 à 3,0%
- flavonoïdes	0,2 à 3,0%

(sur matière sèche, exprimé en rutine)

Les matières sèches comprennent notamment des caroténoïdes, des flavonoïdes, des saponosides triterpéniques
15 dérivés de l'acide oléanolique, des alcools triterpéniques et de la calendine.

Parmi les caroténoïdes, on peut citer le carotène, le lycopène, la violaxanthine, la flavoxanthine. Les flavonoïdes comprennent des hétérosides de l'isorhamnitol (tétrahydroxy-
20 3,5,7,4' méthoxy 3' flavone). Parmi les saponosides triterpéniques dérivés de l'acide oléanolique, on peut citer l'acide glycuronique, le glucose, le galactose. Des exemples d'alcools triterpéniques sont l'arnidiol, le faradiol, le taraxastérol, l' α et β -amyrine.

25 Les compositions topiques selon l'invention, lorsqu'elles comprennent de l'extrait de souci, incluent typiquement entre 0,001 et 0,5% en poids d'extrait de souci par rapport au poids total de la composition.

Le pH de la composition selon l'invention est de
30 préférence compris entre 6 et 6,5, et peut être ajusté, selon les compositions, par addition d'un acide tel que l'acide citrique ou d'une base telle que l'hydroxyde de sodium.

Il peut être avantageux, suivant une variante de la présente invention, d'incorporer dans la composition des
35 principes actifs ou ingrédients auxiliaires choisis pour leurs propriétés complémentaires, afin de renforcer les effets anti-âge de la composition. Ainsi il est particulièrement avantageux de les combiner avec des quantités

appropriées d'une ou plusieurs substances choisies parmi la Vitamine A palmitate, la Vitamine C ou ses dérivés, les protéines de graines d'amarante (*Amarantus caudatus*), les globulines de pois ou les mucilages tels que le mucilage de
5 fruits de baobab afin d'obtenir un effet tenseur de la peau, l'huile de *Calophyllum* afin de renforcer l'effet anti-rides, l'huile d'*Echium* pour son effet anti-inflammatoire, un palmitoyl pentapeptide-3 tel que le Matrixyl® ou des dérivés tels que le palmitoyl GHK (possédant la chaîne Glycyl-
10 Histidyl-Lysine) et le palmitoyl GQPR (Glycyl-Glutamyl-Prolyl-Arginine) ou le palmitoyl VGVAPG (Valyl-Glycyl-Valyl-Alanyl-Prolyl-Glycine) associé à un céramide-2, ainsi que de manière générale toute association avec un céramide, une association comprenant du Matrixyl® et un extrait de
15 *Siegesbeckia orientalis*, les polyphénols, et notamment les polyphénols de cacao, l'acide oléanolique, une anti-hyaluronidase telle que Echinacine B afin de générer un maximum d'eau liée, l'*Imperata cylindrica*, par exemple MOIST 24® de la société Sederma, afin de favoriser l'hydratation de
20 la peau par modification de la pression osmotique, un extrait de graines de lotus, de graines de coquelicot, de racine de guimauve, les peptides d'*Hibiscus* de type Myoxynol® (commercialisé par les Laboratoires Sérobiologiques), les extraits de fenouil, les peptides d'origine végétale de type
25 Argireline® (commercialisés par la société Lipotec).

Il est particulièrement avantageux d'utiliser, dans la composition de l'invention, un extrait de graines de mimosa en combinaison avec un extrait de souci et un palmitoyl pentapeptide-3 tel que le Matrixyl® pour obtenir un effet
30 antirides renforcé.

Les compositions peuvent également contenir diverses substances et excipients choisis en fonction de leurs propriétés connues et de la forme galénique envisagée. Ainsi, on peut incorporer des agents hydratants, des agents
35 calmants, des agents émulsionnants, des tensioactifs, des épaississants, des gélifiants, des agents viscosants, des conservateurs, des antioxydants, des parfums, des huiles, des lipides, un solvant spécifique ainsi que de l'eau et divers

additifs destinés à améliorer les propriétés physiques des compositions. On peut encore avantageusement incorporer des filtres ou écrans solaires choisis en fonction du degré de protection recherché.

5 L'agent hydratant peut être choisi parmi les produits connus dans la préparation de compositions utilisables en cosmétologie et en dermatologie, et par exemple on peut utiliser un polyol, la glycérine (glycérol et des dérivés de glycérol), des alkylène polyols tels que le polyéthylène
10 glycol, le sorbitol, le maltitol, le penta-érythritol, les polyacrylates et polyméthacrylates de glycéryle, les mucopolysaccharides tels que l'acide hyaluronique, des dérivés du chitosan et des dérivés de l'acide pyrrolidone carboxylique.

Les compositions suivant la présente invention peuvent
15 être présentées sous les formes classiquement utilisées pour une application topique, c'est-à-dire sous forme de gel, lotion, sérum, émulsion (en particulier crème ou lait), masque, stick, pommade ou patch, contenant les composants décrits ci-dessus, et des excipients et supports usuels
20 compatibles et pharmaceutiquement acceptables. Les formes préférées sont les sérums, les crèmes, les gels ou les patches, sous forme vectorisée ou non.

Ces formes d'administration par voie topique sont préparées par les techniques connues, et par exemple, dans le
25 cas d'une crème, par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse pour obtenir une émulsion huile dans eau, ou inversement pour préparer une émulsion eau dans huile. Dans le cas de crèmes, on préfère utiliser des émulsions à structure lamellaire contenant peu de produits éthoxylés ou
30 n'en contenant pas du tout.

Dans le cas des émulsions, la phase grasse peut représenter entre 10 et 60% environ du poids de la composition, la phase aqueuse entre 10 et 80% environ et l'agent émulsionnant entre 2 et 20%, le reste étant constitué par les composants
35 de base de la composition selon l'invention et par les autres substances mentionnées ci-dessus. Si un agent hydratant est incorporé, il est avantageusement introduit dans la phase aqueuse lors de la préparation de l'émulsion. La teneur en

agent hydratant est généralement comprise entre 0,1 et 10% en poids par rapport au poids total de la composition.

Les exemples qui suivent illustrent la présente invention, sans en limiter la portée.

5 Des exemples de formulations sont rapportés aux exemples 1 à 3. Dans ces exemples, les parties sont exprimées en poids, sauf indication contraire.

L'exemple 4 est relatif à des tests d'activité sur une co-culture d'épidermes reconstitués/fibroblastes humains, qui
10 ont permis d'évaluer l'effet régénérant d'un extrait aqueux de mimosa (*Acacia dealbata*), dénommé ci-après par le produit "extrait de mimosa".

Exemple 1

Crème anti-rides

15	Sodium heptonate	0,1
	Pentylène glycol	5,0
	Capryl glycol	3,0
	Octyl glycérol	0,3
	Caprylyl glycolle	1,5
20	Extrait de graines de Mimosa	4,0
	Extrait de fleurs de Souci	0,5
	Extrait de racine de Guimauve	5,0
	Stéaryl glucoside	3,0
	PEG-20 stéaryl glucoside	2,5
25	Alcool béhénylique	2,5
	Huile d'Inca-Inchi	3,0
	Beurre de mangue	1,5
	Huile de noyaux d'abricot	1,0
	Acide oléanolique	0,5
30	Palmitate de Vitamine A à 1 million U.I./g	0,5
	Palmitate de Vitamine C	0,15
	Tocophérol naturel	0,7
	Eau déminéralisée	10,0
	— Hyaluronate de sodium	0,1
35	Huiles essentielles naturelles	0,3
	Acide citrique et hydroxyde de sodium :	
	quantité suffisante pour atteindre pH = 6	

Gomme xanthane	0,5
Eau déminéralisée QSP	100,0

Exemple 2Crème anti-rides fluide

5	Matrixyl 3000®	3,0
	Extrait de fleurs de souci	0,5
	Extrait de graines d'Acacia dealbata	2,0
	Mucilage de fruits de Baobab	5,0
	Extrait de graines de Lotus Bleu	1,0
10	Extrait de racine de guimauve	2,5
	Escine	0,1
	Pentylène glycol	5,0
	Capryl glycol	3,0
	Octyl glycérol	0,3
15	Sodium heptonate	0,1
	Acide 10-hydroxydécanoïque	0,15
	PEG-20 sorbitan monostéarate	3,5
	Sorbitan monostéarate	2,5
	Huile d'Echium	3,0
20	Perhydrosqualène	3,0
	Huile de camélia	1,0
	Palmitate de Vitamine C	0,15
	Tocophérol	0,7
	Monostéarate de glycérol	2,0
25	Alcool cétostéarylique	0,3
	Eau déminéralisée	10,0
	Protéines d'Amande hydrolysées	5,0
	Globulines de pois	3,0
	Extrait de miel	3,0
30	Essence d'Ylang-Ylang	0,1
	Essence de Géranium	0,1
	Essence de Cyprès	0,025
	Essence d'Oranges Amères	0,05
	Essence de romarin	0,025
35	Eau déminéralisée QSP	100,0

Exemple 3

	Crème raffermissante pour l'ovale du visage	
	Pentylène glycol	5,0
	Capryl glycol	3,0
5	Octyl glycérol	0,3
	Sodium heptonate	0,1
	Lécithine de Soja hydrogénée	3,0
	Acide palmitique	0,5
10	Alcools comprenant entre 12 et 16 atomes de carbone	0,5
	Glycérine	2,0
	Extrait de graines de Mimosa	10,0
	Extrait de Barbatimao	1,5
	Sulfate de dextran	0,5
15	Escine	0,1
	Caféine	1,0
	Hyaluronate de sodium	0,1
	Extrait de Fomes officinalis	0,5
	Huile de Calophyllum Inophyllum	0,5
20	Huile d'Amandes d'Abricot	2,0
	Perhydrosqualène	1,5
	Beurre de Karité	0,5
	Alcool béhénylique	0,7
	Alcool butylique	0,5
25	Mucilage de figues	3,0
	Tocophérol	0,5
	Essence de Géranium	0,1
	Eau déminéralisée QSP	100,0

Exemple 4

30 Le but de l'étude décrite ci-dessous est d'évaluer le potentiel régénérant d'un extrait aqueux de graines de mimosa (*Acacia dealbata*) sur une co-culture d'épidermes reconstitués/fibroblastes humains. Pour cela, les dosages suivants sont réalisés :

- 35 - dosage des collagènes totaux
 - dosage du rapport collagène type I / collagène type III
 - dosage des métalloprotéinases 3 (MMP-3).

4-1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

4.1.1. Epidermes reconstitués, modèle SKINETHIC™

Des kératinocytes d'origine humaine sont ensemencés sur des filtres en polycarbonate de 0,5 cm² dans un milieu défini (MCDB 153 modifié) et supplémenté. Les cellules sont cultivées pendant 14 jours à l'interface air/liquide, le milieu de culture étant changé tous les deux jours. Les épidermes ainsi formés sont utilisés pour la réalisation de l'étude à partir du 17^e jour de la culture.

Pour évaluer la viabilité cellulaire, un essai préliminaire est effectué pour chaque produit étudié afin de déterminer les temps de contact composition/épiderme n'entraînant pas de cytotoxicité.

L'essai est conduit en duplicate à chaque temps expérimental : 6 et 24 heures.

- Lot 1 : deux épidermes témoins ne recevant pas de produit
- Lot 2 : deux épidermes traités recevant un extrait de mimosa à 0,2% (2 µl/cm²)
- Lot 3 : deux épidermes traités recevant un extrait de mimosa à 0,5% (2 µl/cm²)
- Lot 4 : deux épidermes traités recevant un extrait de mimosa à 1% (2 µl/cm²).

La viabilité cellulaire est d'abord étudiée par réaction colorimétrique au sel de tétrazonium (MTT).

Le sel de tétrazolium a la propriété d'être réduit en cristaux bleus de formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules. Cet enzyme, qui joue un rôle important dans le cycle de Krebs, catalyse la déshydrogénation du succinate en fumarate. C'est l'activité de cet enzyme, flavoprotéine très fortement liée à la membrane interne mitochondriale, qui est mesurée, par réduction du MTT. Par un dosage spectrophotométrique, il est possible de déterminer la toxicité d'une population cellulaire donnée. En effet, l'absorbance est directement liée à l'activité des succinates déshydrogénases, elle-même liée à la toxicité cellulaire.

0,15 ml de milieu de culture contenant 10% vol/vol de solution de MTT est pipeté sous chacun des filtres/support

de culture. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, la couleur des différentes cultures est observée et notée. Les cultures doivent être de couleur bleue/pourpre intense, preuve de la viabilité des cellules de l'épiderme.

5 La viabilité cellulaire est également étudiée par examen histologique. Pour cela, les épidermes fixés dans une solution contenant 10% de formaldéhyde sont inclus dans des blocs en paraffine. Les coupes verticales de 4 microns sont colorées à l'hématoxyline/éosine et photographiées sous un
10 microscope optique.

4.1.2. Fibroblastes humains en culture

On utilise la méthode de la digestion enzymatique permettant d'obtenir des primocultures de fibroblastes à partir d'une biopsie de peau humaine. Les essais sont réalisés sur
15 des fibroblastes entre le 2^e et le 4^e passage afin d'assurer une reproductibilité entre les différentes expériences.

La cytotoxicité du produit « extrait de mimosa » est évaluée par le test de réduction au bleu de Formazan (MTT) après 24 heures de traitement des cellules avec le produit
20 étudié.

L'essai est réalisé en effectuant, pour chaque lot, 5 mesures de la densité optique à 570nm.

La constitution des lots est la suivante :

- Lot 1 : témoin négatif non traité
- 25 - Lot 2 : traité par un extrait de mimosa à 0,2%
- Lot 3 : traité par un extrait de mimosa à 0,5%
- Lot 4 : traité par un extrait de mimosa à 1%.

Après 24 heures d'incubation des cellules avec les différentes concentrations du produit à l'étude, elles sont
30 mises en contact avec du MTT pendant 3 heures à 37°C, puis lysées avec du DMSO. La densité optique est déterminée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre après homogénéisation de la coloration.

4.1.3. Co-culture Epidermes reconstitués / fibroblastes humains en culture

35

Les cultures de fibroblastes sont établies à partir de peau de prépuces humains récoltés lors de circoncisions et sont amplifiées en milieu de culture RPMI 1640 supplémenté

par du sérum de veau fœtal, de la L-glutamine et de la gentamycine. Les essais sont réalisés sur des fibroblastes, entre le 2^e et le 4^e passage, afin d'assurer une reproductibilité entre les différentes expérimentations. Les fibro-

5 blastes sont ensemencés dans des plaques 24 puits à raison de 10^5 cellules par ml. Ils sont ensuite incubés à 37°C et 5% de CO₂. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont mises en contact avec les épidermes reconstitués traités avec l'extrait de mimosa à raison de 2 µl/cm².

10 4.1.3.1. Dosage de la néosynthèse des collagènes

Dosage quantitatif des collagènes totaux

L'essai est conduit en triplicate après 24 heures de traitement.

La constitution des lots est la suivante :

- 15 - Lot 1 : 2 épidermes/fibroblastes témoins ne recevant aucun produit
- Lot 2 : 2 épidermes/fibroblastes traités recevant un extrait de mimosa à 0,2% (2 µl/cm²)
- Lot 3 : 2 épidermes/fibroblastes traités recevant un
- 20 extrait de mimosa à 0,5% (2 µl/cm²)
- Lot 4 : 2 épidermes/fibroblastes traités recevant un extrait de mimosa à 1% (2 µl/cm²).

Après le temps d'incubation, les fibroblastes sont récupérés par centrifugation. Les culots sont digérés par les

25 collagénases (1 mg/culot cellulaire) dans l'acide acétique 0,5 ml/l pendant 24 heures à 4°C.

Après centrifugation à 10 000 g, les collagènes sont précipités par le chlorure de sodium (NaCl) à 1 M, le précipité est resuspendu puis dialysé.

30 Les acides aminés primaires sont dérivés par l'acide ophtaldéhyde (OPA) éliminant ainsi leur interférence. L'hydroxyproline et la proline sont alors dérivées par le NBD-Cl par couplage des groupement aminés au NBD-Cl. Le NBD-Hyp est séparé et identifié par HPLC en phase inverse.

35 Pour la mise au point de la séparation des dérivés d'acides aminés, un couplage au NBD-CL d'un standard contenant l'hydroxyproline est d'abord réalisé.

- L'hydroxyproline est dosée par mesure de la fluorescence après séparation par HPLC en phase inverse :

- o Injecteur automatique
- o Colonne Ultrasep C18 (30cm*0,18cm)
- 5 o 6 µm de porosité
- o Détecteur de fluorescence

La phase mobile est constituée d'un mélange d'acétonitrile/tampon phosphate de sodium 0,1 mol/l, pH 7,2 (9:91 v/v), le débit est réglé à 1 ml/min, l'élution est réalisée en mode
10 statique et le cycle est de 10 minutes. La phase mobile est préalablement filtrée, puis dégazée avant utilisation.

- Les solutions sont préparées de la façon suivante :

- NBD-Cl : 25 mmol dissous dans le méthanol,
- OPA = 150 mmol/l dissous dans du méthanol,
- 15 Tampon phosphate = 0,4 mmol/l, pH ajusté à 7,2.

La gamme étalon est préparée à partir d'une solution d'hydroxyproline à 50 mg/l. Les dilutions successives permettent d'obtenir des solutions allant de 0,5 à 40 mg/l.

La dérivation et l'établissement de la courbe
20 d'étalonnage sont effectués à partir de 10 µl d'une solution étalon à différentes concentrations mélangées avec 10 µl du tampon. Après addition de 5 µl d'OPA et agitation, les tubes sont gardés 5 minutes à température ambiante puis 10 µl de la solution NBD-Cl sont ajoutés. Le dérivât se fait à 60°C, au
25 bain marie, pendant 3 minutes, à l'abri de la lumière. Les tubes sont ensuite retirés et la coloration orange permet de vérifier la dérivation. Ils sont, par la suite, mis dans la glace afin d'assurer le refroidissement. 50 µl de ce mélange sont ensuite injectés dans la colonne afin d'obtenir
30 la courbe d'étalonnage qui doit être linéaire.

Les échantillons sont traités de la même façon.

Dosage qualitatif des collagènes de type I et de type III.

Calcul du rapport collagène de type I / collagène de type III

L'essai est conduit en triplicate après 24 heures de traitement.
35

La constitution des lots est la suivante :

- Lot 1 : 2 épidermes/fibroblastes témoins ne recevant aucun produit ;

- Lot 2 : 2 épidermes/fibroblastes traités recevant un extrait de mimosa à 0,2% (2 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) ;
- Lot 3 : 2 épidermes/fibroblastes traités recevant un extrait de mimosa à 0,5% (2 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$)
- 5 - Lot 4 : 2 épidermes/fibroblastes traités recevant un extrait de mimosa à 1% (2 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$).

Après le temps d'incubation, un marquage isotopique est réalisé en présence de :

- acide ascorbique : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
- 10 - glutamine : 2 mM ;
- sérum de veau fœtal : 1% v/v ;
- [^3H]-Proline (réf. TRK323, Amsterdam) : 50 $\mu\text{Ci}/\text{puits}$;
- l'extrait de mimosa aux différentes concentrations.

Un volume de chaque échantillon contenant le même taux de radioactivité (100 000 dpm) est prélevé, auquel est ajouté 15 7,5% (v/v) final de β -mercaptoéthanol (Merck), puis dénaturé pendant 3 minutes à 100°C. Les échantillons sont supplémentés par 3 μl de bleu de bromophénol. Les échantillons sont passés sur un gel (SDS PAGE) à 7,5% d'acrylamide.

20 Après décoloration du gel, les bandes correspondant aux différentes chaînes collagéniques sont découpées et placées dans des tubes à scintillation en présence de 500 μl de Soluène (Packard).

Les bandes sont dissoutes à 60°C pendant 18 heures. La 25 radioactivité est ensuite mesurée en scintillation liquide (compteur β Kontron).

4.1.3.2. Etude de l'effet du produit sur la suppression de la MMP-3 (Metalloprotéinase 3)

A la fin du temps d'incubation (24 heures), les milieux 30 de culture sont prélevés, et le dosage de la MMP-3 est réalisé conformément aux protocoles décrits dans les kits de dosage (Kit de détection de la Métalloprotéinase 3 (MMP-3) : Interchim).

4.2. RESULTATS

35 4.2.1. Evaluation de la cytotoxicité

- Epidermes reconstitués

L'évaluation de la cytotoxicité par réaction colorimétrique au sel de tétrazonium (MTT) est réalisée en fonction

des différentes concentrations du produit « extrait de mimosa », après 24 heures de contact. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

	Densité optique	%
Témoin	1,210±0,03	-
Mimosa (0,2%)	1,225±0,04	n.s.
Mimosa (0,5%)	1,202±0,05	n.s.
Mimosa (1%)	1,214±0,03	n.s.

5 *n.s.* : non significatif

Les épidermes reconstitués traités par les différentes concentrations du produit « extrait de mimosa » à raison de 2 µl/cm² montrent une couleur bleue/pourpre intense, preuve de la viabilité des cellules de l'épiderme.

10 Par examen histologique, il apparaît que le produit « extrait de mimosa » déposé à raison de 2 µl/cm² sur des épidermes reconstitués traités pendant 48 heures, comparativement à des épidermes témoins, n'induit aucune toxicité. Les images histologiques, après coloration HES, d'épidermes
15 traités par les produits sont comparables à celles des épidermes témoins et répondent aux paramètres histologiques normaux.

- Fibroblastes humains en culture

20 L'évaluation de la cytotoxicité par réaction colorimétrique au sel de tétrazonium (MTT) est réalisée en fonction des différentes concentrations du produit « extrait de mimosa », après 24 heures de contact. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

	Densité optique	%
Témoin	0,330±0,01	-
Mimosa (0,2%)	0,345±0,02	n.s.
Mimosa (0,5%)	0,355±0,01	n.s.
Mimosa (1%)	0,356±0,03	n.s.

n.s. : non significatif

Les résultats obtenus montrent que le produit « extrait de mimosa » n'entraîne aucune cytotoxicité aux différentes concentrations testées.

5 4.2.2. Evaluation de la néosynthèse des collagènes totaux

Les résultats des mesures des collagènes totaux obtenus dans la couche cellulaire et dans le milieu de culture sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

	Collagènes totaux dans la couche cellulaire en [³ H]dpm/10 ⁶ cellules	%	Collagène total dans le milieu de culture en [³ H]dpm/10 ⁶ cellules	%
Témoin	4 852 648 ± 244 025	-	6 758 622 ± 86 538	-
Mimosa (0,2%)	5 140 312 ± 122 443	+5 ns	6 912 438 ± 148 315	ns
Mimosa (0,5%)	6 012 412 ± 85 319*	+24	7 819 413 ± 82 456*	+16
Mimosa (1%)	6 512 538 ± 25 180*	+34	8 136 461 ± 68 395*	+20

10 *n.s. : non significatif*

**Significativement différent par rapport au témoin (p<0,01) (wilcoxon Rank Sum Test)*

Les résultats montrent que le produit "extrait de mimosa" aux concentrations 0,5% et 1% entraîne une induction de la néosynthèse des collagènes totaux au niveau de la couche cellulaire, respectivement de 24 et 34%. Cette induction de la néosynthèse des collagènes se traduit par une augmentation du relargage des collagènes dans le milieu de culture (+16 et +20%).

20 4.2.3. Evaluation qualitative de la synthèse du collagène : calcul du rapport collagène type I/collagène type III

Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

	Collagène type I	Collagène type III	Rapport collagène type I/collagène type III
Témoin	6302 ± 421	2080 ± 148	3,03
Mimosa (0,2%)	5945 ± 312	1988 ± 387	2,99
Mimosa (0,5%)	7348 ± 402	3126 ± 504	2,55
Mimosa (1%)	7546 ± 982	3559 ± 857	2,12

Les résultats montrent que le rapport collagène type I / collagène type III est voisin de 3 dans la couche cellulaire témoin, ce qui implique un dépôt de collagène I trois fois supérieur au collagène III. Ce rapport est très voisin de celui montré pour le derme humain in vivo. Le produit "extrait de mimosa" aux concentrations 0,5% et 1% induit une augmentation des collagènes I et III avec une diminution du rapport collagène type I/collagène type III, ce qui implique une augmentation du collagène III.

10 4.2.4. Dosage des métalloprotéinases 3 (MMP-3)

Le dosage des MMP3 a été réalisé par des kits ELISA au niveau du milieu de culture.

Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous :

	Concentration (MMP3) (pg/ml)	%
Témoin	836±33	-
Mimosa (0,2%)	670±21*	-20
Mimosa (0,5%)	605±38*	-28
Mimosa (1%)	492±30*	-41

15 *significativement différent par rapport au témoin $p < 0,01$ (wilcoxon Rank Sum Test)

Les résultats obtenus montrent que le produit "extrait de mimosa" aux concentrations 0,2%, 0,5% et 1%, diminue l'expression de la métalloprotéinase 3 respectivement de 20%, 28% et 41%.

Conclusion

Ainsi, dans les conditions expérimentales retenues et au vu des résultats obtenus, il apparaît que le produit "extrait de mimosa" présente un effet régénérant de la matrice extracellulaire des fibroblastes humains.

Cet effet se traduit par une augmentation de la néosynthèse des collagènes totaux avec une diminution du rapport collagène type I/collagène type III, ainsi que par une diminution de l'expression des métalloprotéinases 3 (MMP-3). Il est à noter que l'augmentation de synthèse des collagènes

est une augmentation du collagène de type III, qui se produit habituellement dans une peau jeune, le collagène de type I n'étant pas diminué. Il s'agit donc bien d'une néosynthèse de collagène jeune dans un rapport favorable.

5 Ces résultats démontrent l'efficacité de l'extrait de mimosa selon l'invention pour la prévention et le traitement des signes du vieillissement cutané.

Combinaison "mimosa - souci"

10 Une étude in vivo a été faite pour mesurer l'effet sur les rides faciales d'une composition suivant l'invention associant un extrait de graines de mimosa, un extrait de souci et du Matrixyl sur les rides comme dans l'Exemple 2.

Les mesures sont faites au 1^{er} jour (à 2 H), puis à 28 jours et à 56 jours, après application quotidienne de la 15 composition sur le visage, matin et soir, par 30 volontaires de sexe féminin. Les mesures sont faites par prise d'empreinte du relief cutané au niveau du coin de l'oeil, par application d'un gel Silflo® qui polymérise in situ et 20 la peau qui sont analysées sur images numérisées après éclairages des empreintes en lumière rasante.

Les résultats sont regroupés au tableau ci-après.

Variation	Surface	Nombre	L totale	Longueur Moyenne
T2H / J1	-22,4	-18,5	-24,2	-7,7
J28 / J1	-13,4	-10,8	-14,5	-13,8
J56 / J1	-29,5	-19,3	-26,0	-18,9

25 Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport à la valeur initiale.

L'analyse effectuée à T2H (2 heures) montre une diminution statistiquement significative de la surface de la peau occupée par les rides, du nombre de rides et de leur longueur, ce qui démontre un effet lissant sur la peau après 30 2 heures d'application.

L'analyse à J28 (28 jours) montre une diminution statistiquement significative de la longueur totale des rides.

L'analyse à J56 (56 jours) montre une diminution statistiquement significative de la surface occupée, du nombre de rides, de la longueur moyenne et de la longueur totale, démontrant un effet potentiel antirides après 56 jours
5 d'application quotidienne de la composition de l'invention.

Ces résultats confirment l'effet antirides amélioré de la composition de l'invention combinant l'extrait de graines de mimosa, l'extrait de souci et le palmitoyl pentapeptide-3.

Revendications

1. Utilisation d'un extrait de graines de mimosa pour la préparation d'une composition cosmétique et/ou dermatologique pour application topique, destinée à lutter contre les
5 signes du vieillissement cutané.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrait de mimosa est un extrait d'*Acacia dealbata*, d'*Acacia farnesiana* ou d'*Acacia decurrens*.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caracté-
10 risée en ce que l'extrait de graines de mimosa est obtenu par macération dans l'eau de graines de mimosa pulvérisées.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'extrait de mimosa présente les caractéristiques suivantes :

15 - matières sèches	2 à 4%
- densité à 22°C	0,980 à 1,020
- indice de réfraction à 22°C	1,330 à 1,350
- pH	5,7 à 7,2
- teneur en protéines totale	>0,1%

20 (par rapport aux matières sèches)

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition comprend entre 0,001 et 15% en poids d'extrait de mimosa.

6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée
25 en ce que la composition comprend 2% en poids d'extrait de mimosa.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition comprend en outre un extrait de souci.

30 8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'extrait de souci est un extrait de *Calendula officinalis*.

9. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'extrait de souci est un extrait de *Calendula*
35 *arvensis*.

10. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'extrait de souci est obtenu à partir de pétales de souci.

11. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'extrait de souci est obtenu par macération hydroglycolique de fleurs pulvérisées.

12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'extrait de souci est obtenu par macération de fleurs pulvérisées dans un mélange butylène glycol/eau.

13. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'extrait de souci présente les caractéristiques suivantes :

10 - eau / butylène glycol	50/50
- matières sèches	1,5 à 3,0%
- flavonoïdes	0,2 à 3,0%

(sur matière sèche, exprimé en rutine)

14. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que la composition comprend entre 0,001 et 0,5% en poids d'extrait de souci.

15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition comprend en outre des quantités appropriées d'une ou plusieurs substances choisies parmi la Vitamine A palmitate, la Vitamine C ou ses dérivés, les protéines de graines d'amarante (*Amarantus caudatus*), les globulines de pois ou des mucilages tels que le mucilage de fruits de baobab, l'huile de *Calophyllum*, l'huile d'*Echium*, un palmitoyl pentapeptide-3 ou des dérivés tels que le palmitoyl GHK et le palmitoyl GQPR ou le palmitoyl VGVAPG associé à un céramide-2, ainsi qu'un céramide, une association comprenant du palmitoyl pentapeptide-3 et un extrait de *Siegesbeckia orientalis*, les polyphénols, tels que les polyphénols de cacao, l'acide oléanolique, une antihyaluronidase telle que Echinacine B, l'*Imperata cylindrica*, un extrait de graines de lotus, de graines de coquelicot, de racine de guimauve, les peptides d'*Hibiscus* de type Myoxynol[®], les extraits de fenouil, les peptides d'origine végétale de type Argireline[®].

16. Procédé cosmétique pour combattre les signes du vieillissement cutané, consistant à appliquer sur les zones de la peau affectées une composition contenant une quantité efficace d'extrait de graines de mimosa.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la composition comprend en outre une quantité efficace d'extrait de souci.

18. Composition cosmétique utile contre les signes du
5 vieillissement cutané, caractérisée en ce qu'elle comprend en combinaison un extrait de graines de mimosa et un extrait de souci.

19 Composition selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un palmitoyl pentapeptide-3.