

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 33400 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 8/97; A61Q 19/08; A61K 8/92**
(43) Date de publication : **03.07.2012**

(21) N° Dépôt : **34411**

(22) Date de Dépôt : **05.12.2011**

(30) Données de Priorité : **22.06.2009 FR 0954235**

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/FR2010/051207 17.06.2010**

(71) Demandeur(s) : **PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE, 45 PLACE ABEL GANCE F-92100 BOULOGNE-BILLANCOURT (FR)**

(72) Inventeur(s) : **MANDEAU, Anne ; DUPLAN, Hélène**

(74) Mandataire : **CABINET PATENTMARK**

(54) Titre : **EXTRAIT DE GRAINES ENTIÈRES DE MORINGA SP ET SON UTILISATION DANS DES COMPOSITIONS COSMÉTIQUES ET/OU DERMATOLOGIQUES**

(57) Abrégé : LA PRÉSENTE INVENTION CONCERNE UN EXTRAIT DE GRAINES ENTIÈRES DE MORINGA SP. CONTENANT DE L'HUILE (DONT TRIGLYCÉRIDES, ACIDES GRAS ET LIPIDES POLAIRES) ET DES POLYPHÉNOLS ET SON UTILISATION DANS DES COMPOSITIONS COSMÉTIQUES ET/OU DERMATOLOGIQUES.

5

ABREGE

TITRE

10 **EXTRAIT DE GRAINES ENTIERES DE *MORINGA* SP. ET SON UTILISATION
DANS DES COMPOSITIONS COSMETIQUES ET/OU DERMATOLOGIQUES**

15

DEPOSANT

PIERRE FABRE DERMO COSMETIQUE

20

ABREGE DESCRIPTIF

La présente invention concerne un extrait de graines entières de *Moringa* sp.
contenant de l'huile (dont triglycérides, acides gras et lipides polaires) et des polyphénols
25 et son utilisation dans des compositions cosmétiques et/ou dermatologiques.

30 INVENTEURS : Anne MANDEAU, Hélène DUPLAN



03 JUL 2012

1

**EXTRAIT DE GRAINES ENTIERES DE *MORINGA* SP. ET SON UTILISATION
DANS DES COMPOSITIONS COSMETIQUES ET/OU DERMATOLOGIQUES**

La présente invention concerne un extrait de graines entières de *Moringa* sp.
5 contenant de l'huile (dont triglycérides, acides gras et lipides polaires) et des polyphénols
et son utilisation dans des compositions cosmétiques et/ou dermatologiques.

Le *Moringa* est un arbre originaire de l'Inde, mais cultivé partout dans le monde
et naturalisé dans beaucoup de milieux où il est très populaire. Il existe 13 espèces de
Moringa appartenant à la famille Moringaceae, *M. oleifera* (synonyme : *Moringa*
10 *pterygosperma*) étant la plus connue.

Le *Moringa oleifera* est un petit arbre de 4 à 8 mètres de haut, à cime claire,
étalée en parasol. Les feuilles sont caduques de 30 à 70 cm de long, les fleurs sont
blanches et très odorantes, le fruit est une capsule allongée linéaire, trigone, coriace et
pendante, atteignant 30 à 40 cm de long. Les graines sont globuleuses-trigones, de 1,2 cm
15 de long et 1 cm de large, à 3 ailes membraneuses dépassant la graine et de 2 cm de long.

Arbre sauvage ou cultivé sous climat tropical, humide ou très sec, il peut survivre
en conditions extrêmes et a une croissance rapide. Ses racines très profondes lui
permettent de se passer d'eau pendant plusieurs mois.

Il possède un grand nombre de noms vernaculaires dont l'arbre de Ben, Ben ailé,
20 neverdié, Anamambo, Horseradish-tree, Drumstick-tree ou encore l'arbre qui ne meurt
jamais ou « miracle tree ». En effet, il est connu en médecine ayurvédique pour guérir
300 maladies en plus d'une valeur nutritive très importante. Les fruits sont mangés cuits,
les feuilles sont consommées en légume et possèdent une valeur nutritive telle qu'elles
apportent une réponse à la malnutrition dans certains pays.

25 Une huile alimentaire riche en acide oléique est tirée des graines qui servent
également de flocculant pour assainir l'eau. L'huile est obtenue par pression ou par
extraction à l'hexane des graines débarrassées de leur tégument. Pour l'usage des
propriétés flocculantes, on utilise le tourteau récupéré après pressage.

Les graines peuvent être mangées comme des pois lorsqu'elles sont encore vertes.
30 Les graines mûres contiennent environ 40% d'huile. L'huile de *Moringa* sp. est une huile
de cuisson de bonne qualité (proche de l'huile d'olive) également utilisée en parfumerie,
pour la fabrication de savon et comme huile de lampe (elle est très stable à l'oxydation).

En médecine traditionnelle, l'huile est utilisée en application pour soulager la
douleur lors de crises de goutte ou de rhumatisme (The Indian Materia Medica, pp 811-

fey

816). Par voie orale, les graines sont utilisées comme antipyrétique (Hukkeri et al., Indian J. Pharm. Sci. (2006) 68, pp124-126).

L'huile issue des graines, obtenue par pressage ou par extraction très apolaire (à l'hexane notamment) est largement utilisée en cosmétique pour ses propriétés
5 nourrissantes dues aux triglycérides qu'elle contient.

L'utilisation d'un extrait aqueux de graines en cosmétique est décrite : les peptides et protéines qu'il contient auraient des propriétés anti-rides et purifiantes : les graines sont au préalable décortiquées et délipidées (brevets US 6 500 470 et US 2006/0275247). Les fractions protéiques aqueuses et délipidées, extraites des graines
10 entières ou décortiquées de *Moringa* sp., présentent des effets hydratant, réparateur et anti-rides de la peau (brevet EP 1 064 008). Ladite fraction protéique des graines peut être caractérisée comme « très polaire ».

D'après la bibliographie, les graines sont composées de stérols (campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol, clerosterol...), d'acides gras (C18:1-oléique-
15 68 à 76%, C16:0 6 à 7.8%, C18:0 4 à 7.6%, C20:0 2.8 à 4% et C22:0 5 à 6.7%), de protéines (26 à 32%), de fibres, de tocophérol (α , γ , δ : respectivement 134, 93 et 48 mg/kg d'huile).

Les graines contiennent également des glucosinolates dont le 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)-benzylglucosinolate. Il a été aussi décrit que les feuilles et
20 graines de *Moringa* sp. contiennent des cytokinines telles que la zéatine, la dihydrozéatine et l'isopentyladénine (brevet US 2006/0222682).

La demanderesse a mis en évidence l'utilisation d'un extrait spécifique de graines entières de *Moringa* sp. comprenant de l'huile (dont triglycérides, acides gras et lipides
25 polaires) et des polyphénols en tant que principe actif dans des compositions cosmétiques et/ou dermatologiques.

La présente invention a ainsi pour objet un extrait de graines entières de *Moringa* sp. contenant de l'huile (dont triglycérides, acides gras et lipides polaires) et des polyphénols. Par « graines entières », on entend au sens de la présente invention les
30 graines non débarrassées de leur tégument.

L'extrait de graines entières de *Moringa* sp. est caractérisé par (% en poids par rapport au poids de l'extrait sec):

- une teneur en huile de 5% à 50% dont (i) 2% à 10% de triglycérides et acides gras et (ii) 5% à 15% de lipides polaires ;

- et une teneur en polyphénols totaux de 0,01% à 5% (exprimés en g de pyrogallol pour 100 g d'extrait sec).

Selon une caractéristique de l'invention, ledit extrait présente une teneur en huile de 25% à 40% (% en poids par rapport au poids de l'extrait sec).

5 Selon une autre caractéristique de l'invention, l'espèce de *Moringa* est préférentiellement le *Moringa oleifera* ou le *Moringa drouhardii*.

Ledit extrait de *Moringa* sp. selon la présente invention, pour lequel des valorisations cosmétiques et dermatologiques ont été démontrées, est obtenu à partir de graines entières de *Moringa* sp., avantageusement séchées, broyées puis soumises à au
10 moins une extraction par un solvant moyennement polaire.

Par « solvant moyennement polaire », il faut entendre au sens de la présente invention un solvant choisi dans le groupe constitué d'un alcool en C1 à C4, d'acétone, d'un mélange eau / alcool et d'un mélange acétone / eau, utilisés seuls ou en mélanges.

De préférence, il s'agira d'un mélange éthanol / eau. Avantageusement, ce
15 mélange éthanol / eau sera caractérisé par diverses proportions éthanol / eau de 9/1 à 7/3 (v/v).

Encore plus avantageusement, le solvant moyennement polaire est un mélange éthanol / eau de 9/1 ou 3/1 (v/v).

L'extraction est réalisée sous agitation ou de façon statique, à reflux ou à
20 température ambiante, dans un ratio poids de plante / volume de solvant pouvant varier de 1/5 à 1/20, pendant une durée de 30 minutes à 48 heures. L'extraction peut être renouvelée 2 ou 3 fois.

Le marc est ensuite séparé de l'extrait par centrifugation ou filtration et la solution peut être plus ou moins concentrée jusqu'à l'obtention d'un extrait sec avec des
25 rendements allant de 5% à 10%. L'extrait obtenu étant peu homogène, un support peut être rajouté lors de l'étape de séchage dans des proportions massiques par rapport à la matière sèche extraite pouvant varier de 1% à 75%. Le support peut être de la maltodextrine, du lactose, de la silice ou tout autre support cosmétologiquement acceptable et solubilisant l'extrait, comme par exemple le mélange propylène glycol /
30 alcool oléique ethoxylé en diverses proportions.

L'extrait de *Moringa* sp. obtenu se caractérise par sa teneur en huile (dont triglycérides, acides gras et lipides polaires) et en polyphénols.

Un autre objet de la présente invention concerne un tel extrait de *Moringa* sp. pour son utilisation en tant que principe actif anti-âge.

Préférentiellement, ledit extrait est destiné à lutter contre l'ensemble des signes du vieillissement cutané chez les personnes ayant une peau mature. Par « peau mature », on entend au sens de la présente invention, la peau des personnes ayant typiquement plus de 55 ans et plus préférentiellement plus de 60 ans.

5 Les marques du vieillissement de la peau se traduisent notamment par une perte de fermeté et/ou d'élasticité et/ou de tonicité et/ou de souplesse de la peau et par la formation des rides et des ridules.

L'objet de la présente invention est donc de fournir un nouvel actif capable d'apporter à la fois la protection, l'hydratation et la nutrition à l'épiderme / la peau
10 mature, et par conséquent de conférer à la peau des effets lissant, anti-relâchement, restructurant.

A partir de différents types de tests, la demanderesse a évalué l'action globale anti-âge d'extraits de *Moringa sp.* selon la présente invention.

Il a été montré que ce nouvel extrait apporte les différentes activités recherchées,
15 à savoir à la fois :

- une activité anti-oxydante, anti-radicalaire pour limiter le processus d'oxydation lié au vieillissement intrinsèque et extrinsèque ;

- une activité sur la restauration de la fonction barrière de la peau (structure protéique et lipidique de l'épiderme) altérée avec l'âge : l'utilisation dudit extrait permet
20 de limiter la déshydratation cutanée et protège ainsi la peau ;

- une activité sur la matrice extra-cellulaire pour améliorer les propriétés mécaniques de la peau mature (fermeté, élasticité, tonicité).

L'extrait selon la présente invention favorise l'hydratation, le lissage, le non-relâchement, et la restructuration de la peau. L'extrait selon la présente invention permet
25 ainsi d'embellir et d'unifier le teint de peau.

Un autre objet de la présente invention concerne l'utilisation d'un extrait tel que défini pour renforcer et restaurer la fonction barrière de la peau.

Au sens de l'invention, l'expression « renforcer la fonction barrière de la peau » signifie améliorer la fonction barrière de la peau.

30 Une des fonctions fondamentales de la peau est d'assurer une barrière entre l'organisme et le milieu extérieur s'opposant dans un sens à la pénétration dans l'épiderme de champignons, bactéries et allergènes de l'environnement (« outside-in ») et dans l'autre sens à la perte en eau (« inside-out »).

L'épiderme est un épithélium pluristratifié, d'origine ectodermique, en perpétuel renouvellement. On distingue plusieurs couches de nature morphologique et de composition cellulaire différentes, de l'intérieur vers l'extérieur : la couche basale, assise cellulaire dont les

5 kératinocytes ont une capacité de prolifération très forte qui permet d'assurer l'autorenouvellement de l'épiderme, puis les couches suprabasales (les couches granuleuse, épineuse) et enfin la couche cornée (Stratum Corneum, SC). Ces stades correspondent à des niveaux de différenciation kératinocytaire de plus en plus avancés. Les kératinocytes de la couche basale perdent leur capacité de prolifération dès qu'elles
10 entrent dans un processus de migration vers la surface de l'épiderme, pendant lequel les kératinocytes vont exprimer un programme de différenciation conduisant à la cornification, processus de mort cellulaire programmée. La fonction barrière cutanée est assurée en premier lieu par la couche cornée, ensemble solide et étanche formé de deux compartiments :

- 15 - un ciment intercornéocytaire riche en lipides : les lipides, organisés en feuillets et liés aux cellules de façon covalente, limitent la pénétration des molécules à travers la couche cornée ;
- des couches de cellules cornifiées, mortes et dépourvues d'organites (cornéocytes), qui correspondent à l'étape finale de la différenciation kératinocytaire.

20 L'intégrité du ciment lipidique extracellulaire ainsi que de tous les éléments cellulaires de la couche cornée et l'équilibre entre prolifération et différenciation kératinocytaire sont capitaux pour le maintien d'une fonction barrière épidermique fonctionnelle.

25 La perturbation de la fonction barrière, chronique ou aiguë, rend l'organisme sensible aux agressions extérieures et à la déshydratation.

L'amélioration de la fonction barrière est en particulier déterminante lorsque la fonction barrière de la peau est altérée et qu'il est nécessaire de la rétablir. C'est le cas dans un certain nombre d'états physiologiques, en réponse au temps (vieillesse cutané) ou en lien avec le contexte hormonal ou des stress. La vitesse de cette
30 restauration permettant le retour à l'homéostasie est retardée. De plus, la fonction barrière cutanée est altérée dans la majorité des pathologies de la peau les plus répandues dans la population qui sont souvent accompagnées d'une composante inflammatoire (sécheresse cutanée...).

L'amélioration de la fonction barrière peut également être avantageuse lorsqu'on souhaite consolider la fonction native de la peau, afin de conférer notamment à l'organisme une meilleure résistance aux agressions extérieures vis à vis desquelles il est susceptible d'être exposé, notamment de type environnemental (UltraViolets, taux
5 d'humidité, température extérieure, pollution, brûlures). La fonction barrière de la peau comprend tous les mécanismes de défense naturelle vis à vis des agressions auxquelles elle est sujette. L'élément essentiel assurant cette fonction se situe dans la partie la plus superficielle de l'épiderme, au niveau de la couche cornée, appelée le *stratum corneum*.

Il a été montré à partir de différents tests que l'extrait tel que défini manifeste
10 avantageusement une activité de restauration de la structure lipidique et de la structure protéique de l'épiderme.

L'utilisation de l'extrait selon la présente invention s'avère tout particulièrement efficace pour le renforcement et la restauration de la fonction barrière cutanée.

Un autre objet de la présente invention concerne une composition cosmétique
15 et/ou dermatologique comprenant, à titre de principe actif, un extrait de graines entières de *Moringa* sp. selon l'invention et au moins un excipient cosmétologiquement et/ou dermatologiquement acceptable.

Ladite composition cosmétique et/ou dermatologique selon la présente invention comprend une quantité d'extrait sec de graines entières de *Moringa* sp. comprise entre
20 0,1 g et 5 g pour 100 g de ladite composition.

Avantageusement, ladite quantité d'extrait de *Moringa* sp. est comprise entre 0,25 g et 1 g pour 100 g de composition cosmétique et/ou dermatologique.

Plus particulièrement, l'invention concerne une composition cosmétique anti-âge. Préférentiellement, ladite composition cosmétique est destinée à lutter contre l'ensemble
25 des signes du vieillissement cutané chez les personnes ayant une peau mature.

La composition cosmétique anti-âge selon la présente invention peut contenir, en outre, un ou plusieurs autres principes actifs tels que des actifs destinés à la protection solaire et/ou des actifs destinés à la dépigmentation de la peau.

Les actifs destinés à la protection solaire sont choisis, en outre, parmi des
30 molécules de synthèse chimique réputées pour leur action anti UVA, pour leur action anti UVB telles que l'octocrylène et/ou la dioctyl butamido triazone et/ou la bis-ethylhexyloxyphenyl methoxyphenyl triazine

Les actifs destinés à la dépigmentation de la peau, pour éclaircir et unifier le teint, peuvent être, en outre, la niacinamide, la vitamine C et ses dérivés.

L'excipient cosmétologiquement acceptable en vue d'obtenir une composition cosmétique anti-âge est choisi pour permettre une administration topique ou orale.

Avantageusement, la forme topique est choisie parmi le groupe constitué d'un lait, d'une crème, d'un baume, d'une huile, d'une lotion, d'un gel, d'un gel moussant,
5 d'une pommade, d'un spray, etc.

Avantageusement, la forme orale est choisie parmi le groupe constitué de comprimés, gélules, pastilles, poudre, granules, solutions ou suspensions orales.

Plus particulièrement, l'invention concerne également une composition cosmétique et/ou dermatologique destinée à renforcer et restaurer la fonction barrière de
10 la peau.

L'excipient cosmétologiquement et/ou dermatologiquement acceptable en vue d'obtenir une composition cosmétique et/ou dermatologique renforçant et restaurant la fonction barrière de la peau est choisi pour permettre une administration topique.

Avantageusement, la forme topique est choisie parmi le groupe constitué d'un
15 lait, d'une crème, d'un baume, d'une huile, d'une lotion, d'un gel, d'un gel moussant, d'une pommade, d'un spray, etc.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé cosmétique pour lutter contre l'ensemble des signes du vieillissement cutané chez les personnes ayant une peau mature, caractérisé en ce qu'il implique l'utilisation par voie topique ou orale d'un
20 extrait de graines entières de *Moringa* sp. selon l'invention.

Les préparations et les compositions suivantes sont citées à titre d'exemples illustratifs et non limitatifs.

EXEMPLES DE PREPARATION DE L'EXTRAIT VEGETAL

Exemple 1

2,5 kg de graines entières de *Moringa oleifera* séchées et broyées sont extraites
 5 par 17,5 L d'éthanol 90 (proportion éthanol / eau = 9/1) par deux extractions à contre-
 courant à 80°C. Après refroidissement du milieu à 50°C, la solution extraite est récupérée
 par séparation solide / liquide. L'échantillon est séché permettant d'obtenir 243 g
 d'extrait. Cet extrait est caractérisé par une teneur en huile de 36% dont (i) 10% de
 triglycérides et acides gras et (ii) 10% de lipides polaires et une teneur en polyphénols
 10 totaux de 0.02% (exprimés en g de pyrogallol pour 100 g d'extrait sec).

Exemple 2

20 g de graines entières de *Moringa oleifera* séchées et broyées sont extraites par
 100 ml du mélange éthanol / eau 75:25 à reflux pendant 1 heure. La solution extraite est
 15 récupérée par séparation solide / liquide et séchée à l'évaporateur rotatif à 50°C. 1,66 g
 d'extrait sont ainsi obtenus sous forme de pâte marron titrant à 5% d'huile et 0,68% de
 polyphénols totaux exprimés en pyrogallol.

Exemple 3

20 g de graines entières de *Moringa drouhardii* séchées et broyées sont extraites
 par 200 ml du mélange éthanol / eau 90 :10 à reflux pendant 1 heure. La solution extraite
 est récupérée par séparation solide / liquide et séchée à l'évaporateur rotatif à 50°C. 1,29
 g d'extrait sont ainsi obtenus sous forme d'une pâte jaune-marron titrant à 35% d'huile
 (triglycérides, acides gras et lipides polaires) et 1,3% de polyphénols totaux exprimés en
 25 pyrogallol.

EXEMPLES DE COMPOSITIONS COSMETIQUES

Exemple 4 : soin pour les yeux

	<u>Composé</u>	<u>Quantité</u>
30	Extrait sec graine <i>Moringa</i> sp.	0,5 g
	Acétate tocophéryle (alpha)	0,5 g
	Dextran sulfate	0,3 g
	Diocetyl butamido triazone	1 à 10 g
35	Octocrylène	1 à 10 g

	Bis-ethylhexyloxyphenyl methoxyphenyl triazine	1 à 10 g
	Cire glucoside 202	1 à 5 g
	Stéarate GLY./PEG-100 stéarate	1 à 5 g
	Benzoate C12-C15	5 g
5	Pentanoate(neo)isodécyl	1 à 8 g
	Siloxane(cyclopenta)décaméthyl	1 à 8 g
	Glycérine 99.5%	1 à 5 g
	Hydroxyéthyl acrylate / sodium acryloyldiméthyltaurate copolymère	1 g
	Xanthane gomme TF	0,3 g
10	Capryl glycol	qs
	Sorbate potassium	qs
	Eau purifiée	qsp 100 g

Exemple 5 : crème revitalisante éclat

	<u>Composé</u>	<u>Quantité</u>
15	Extrait sec graine <i>Moringa</i> sp.	0,5 g
	Acétate tocophéryle (alpha)	0,1 g
	Niacinamide	2 g
	Methoxycinnamate(p)éthylhexyl	1 à 10 g
20	Octocrylène	1 à 10 g
	Bis-ethylhexyloxyphenyl methoxyphenyl triazine	1 à 10 g
	Behenin(tri)/PEG-20	1 à 8 g
	Cétylique alcool >95%	1 g
	Palmitate glycol	2 g
25	Siloxane(cyclopenta)décaméthyl	1 à 5 g
	Méthicone(di)200FL	1 à 5 g
	Capric caprylic/trigly.30 70	1 à 5 g
	Méthicone(cyclo)Mel.9040	1 à 5 g
	Xanthane gomme TF	0,3 g
30	Hydroxyéthyl acrylate / sodium acryloyldiméthyltaurate copolymère	0,7 g
	Glycérine 99.5%	1 à 5 g
	Capryl glycol	qs
	Acide sorbique	qs
	Butylhydroxytoluène	0,01 g
35	Oxyde titane/Al/Séricite Mel	1 à 5 g
	Hydroxyde de sodium	qs
	Eau purifiée	qsp 100 g

EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE

Test DPPH

L'activité anti-oxydante de l'extrait de graines de *Moringa oleifera* selon la
 5 présente invention a été évaluée avec le test DPPH. Ce test est basé sur la mesure de la
 capacité de piégeage des anti-oxydants du radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
 (DPPH). Ce radical stable, absorbant à 517 nm, est réduit à l'hydrazine correspondante
 lorsqu'il réagit avec un donneur d'hydrogène.

Résultats :

10 Les résultats obtenus sont exprimés en IC₅₀, correspondant à la concentration
 donnant 50% de réduction de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH à 0.06
 mM.

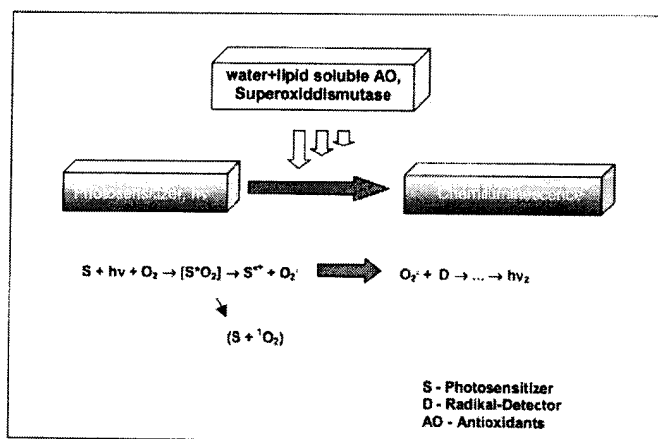
Produit testé	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait apolaire (hexane) de graines entières	> 1 000 (inactif)
Extrait de graines sans tégument par EtOH 90%	1 000 (inactif)
Extrait selon l'exemple 1	280
Extrait de tégument par EtOH 90%	30
Vitamine E (référence)	6- 10

15 L'extrait selon l'invention possède une activité anti-oxydante principalement
 apportée par les molécules présentes dans le tégument.

Chemiluminescence

20 C'est une méthode qui génère des radicaux libres (radical superoxide O₂^{•-}) par un
 signal photochimique. L'intensité de l'oxydation est 1000 fois supérieure à celle obtenue
 en conditions normales. La détection se fait par chemiluminescence et permet
 l'évaluation d'extraits ou de molécules anti-oxydants lipo- ou hydrosolubles. Les
 résultats sont exprimés respectivement en quantité équivalente de vitamine C ou de

Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid). La sensibilité est de l'ordre de la nanomole.



Résultats :

5 65 µg d'extrait selon l'exemple 1 sont nécessaires pour obtenir une activité équivalente à l'activité détectée pour 1 µg de trolox : activité équivalente au lycopène, molécule connue pour son activité anti-oxydante.

Il a été également confirmé dans ce test que l'activité anti-oxydante observée était principalement portée par les molécules du tégument : seulement 4,7 µg d'un extrait
10 EtOH 90% de tégument sont nécessaires pour 1 µg de trolox (activité équivalente à la génistéine). Ceci confirme l'importance d'utiliser selon l'invention les graines entières de *Moringa sp.*

Les radicaux libres, dont la production est accrue suite aux agressions extérieures (froid, pollution, tabac, UV) sont responsables des altérations de l'ADN des cellules
15 cutanées, mais aussi des membranes cellulaires et mitochondriales. L'activité anti-radicalaire de l'extrait préparé selon l'exemple 1 permet de lutter contre le vieillissement cutané intrinsèque et extrinsèque.

20 EVALUATION DE L'ACTIVITE SUR LA RESTAURATION DE LA FONCTION BARRIERE

L'épiderme joue un rôle protecteur majeur en procurant une barrière chimique et mécanique pour le corps. Elle assure le maintien de l'étanchéité, à savoir la fonction
25 barrière cutanée. Les cornéocytes, kératinocytes de la couche cornée, associés à une matrice lipidique, assurent en grande partie cette fonction. Néanmoins les couches plus profondes interviennent dans la mise en place des acteurs de cette fonction. La capacité de différenciation des kératinocytes de l'épiderme va garantir la mise en place d'une

[Signature]

barrière de type perméabilité sélective fonctionnelle (Elias PM. *J Invest Dermatol* 125 183-200 (2005)).

D'un point de vue protéique, la différenciation épidermique est majoritairement axée sur l'évolution de protéines de structure que sont les kératines et qui contribuent à l'intégrité architecturale de l'épiderme. Leur expression varie en fonction du degré de maturation des kératinocytes. La kératine 1 basique et la kératine 10 acide, sont des marqueurs précoces de la différenciation kératinocytaire, présents dès la couche basale de l'épiderme. L'expression d'autres marqueurs de ce processus biologique, plus tardifs, peut être suivie telle que celle des protéines de l'enveloppe cornée, comme l'involucrine, ainsi que certaines enzymes majeures à l'origine du pontage des protéines de structure entre elles et avec des lipides kératinocytaires, les transglutaminases, telles que la transglutaminase 1 (TG1) (Houben E, et al. *Skin Pharmacol Physiol.*; 20(3):122-32 (2007)).

Parallèlement, la synthèse et le transport de lipides kératinocytaires sont à l'origine du ciment lipidique intercornéocytaire indispensable à la barrière cutanée, dont la formation représente la phase ultime de la différenciation épidermique terminale. Cette matrice lipidique extra-cellulaire fournit la principale barrière aux mouvements transcutanés d'eau et d'électrolytes (Mizutani Y., et al. *FEBS Lett.* 563: 93 (2004)). Ainsi un certain nombre d'enzymes et de transporteurs lipidiques voient leur expression kératinocytaire augmenter avec la différenciation. En particulier certains membres de la famille des transporteurs ABC (Adenosine Triphosphate Binding Cassette transporter) joue un rôle majeur dans les étapes de mise en place de la barrière lipidique. Ainsi ABC G1 qui transporte spécifiquement le glycérol, et ABC A12, indispensable au transfert des précurseurs lipidiques dans les corps lamellaires, sont des marqueurs sensibles. Les céramides épidermiques jouent un rôle spécifique majeur et représentent un marqueur essentiel du niveau de fonctionnalité de la barrière cutanée. Ainsi des enzymes intervenant dans la synthèse des céramides cutanés, voient leur expression et leur activité spécifiquement augmentées lors d'une rupture de la fonction barrière épidermique et avec le niveau de différenciation épidermique. C'est le cas en particulier de la Sphingolipid C4-hydroxylase/delta-4 desaturase ou hDES2 dont l'activité dihydrocéramide hydroxylase concourt à la synthèse des phytocéramides cutanés chez l'homme (Feingold, K.R. *J Lipid Res* 48 : 2531-2546 (2007)).

Dans un premier temps, l'effet d'extraits selon l'invention a été étudié à partir d'un modèle de kératinocytes normaux humains (NHK) différenciés.

Et dans un deuxième temps, cet effet a été étudié à partir d'un modèle de sénescence kératinocytaire.

Modèle de différenciation de kératinocytes normaux humains

5 L'effet d'extraits de *Moringa* sp. sur l'expression génique de différentes protéines impliquées dans la synthèse ou le transport des lipides épidermiques, ABC G1 et hDES2, a été analysé.

Résultats :

10 Les résultats sont exprimés en pourcentage de stimulation de l'expression génique (mRNA) de différents marqueurs de la différenciation épidermique exprimés par les NHKs (par rapport aux cellules non traitées). On considère un effet positif significatif à partir de 100% de stimulation. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Traitements cellulaires	ABC G1	hDES2
Vit D3 5µM	170 %	780 %
Roziglitazone 10µM	330 %	190 %
Extrait exemple 1 (20 µg/ml)	150 %	100 %

15

Tableau 1 : effet de la vitamine D3, de la roziglitazone et de l'extrait selon l'invention à partir d'un modèle de kératinocytes normaux humains (NHK) différenciés.

20 L'extrait préparé selon l'exemple 1 à 20 µg/ml induit l'expression génique de hDES2 et ABC G1. L'extrait préparé selon l'exemple 1 permet de restaurer la différenciation épidermique lipidique à l'origine de la mise en place de la barrière hydrophobe permettant de limiter la déshydratation cutanée, notamment rencontrée chez les peaux matures.

25

Modèle de sénescence kératinocytaire

Les capacités de régénération de la barrière cutanée étant diminuées chez les sujets âgés (Tagami , Arch. Derm. Res. 2007), nous avons utilisé un modèle mimant le processus de sénescence kératinocytaire, à partir d'une lignée de kératinocytes humains HaCaT traités à l'H₂O₂. Nous avons analysé l'effet des extraits de *Moringa* sp. sur la

restauration de l'expression (ARNms) des marqueurs de différenciation protéique dont l'expression était inhibée par la sénescence des cellules, tels que : K1 et involucrine.

Résultats :

L'extrait selon l'exemple 1, à 1 et 10 µg/ml permet de restaurer l'expression de
5 K1 (11 et 35% respectivement) et de l'involucrine (15% pour 10 µg/ml).

Conclusion

Les résultats obtenus d'après les deux modèles montrent bien la complémentarité
d'action (à la fois sur la restauration de la structure lipidique et de la structure protéique
10 de l'épiderme) de l'extrait selon la présente invention.

EVALUATION DE L'ACTIVITE DE LA MATRICE EXTRA-CELLULAIRE

15 La matrice extracellulaire (MEC) est une structure dynamique ayant un rôle
structurel et régulateur pour les tissus. Elle confère à la peau sa turgescence et ses
propriétés mécaniques : fermeté, élasticité et tonicité. Au niveau de l'épiderme elle
occupe l'espace intercellulaire et joue un rôle de maintien pour l'édifice épidermique.
Elle assure également les échanges entre les cellules de l'épiderme et joue un rôle dans
20 l'activité cellulaire. La MEC de l'épiderme est constituée notamment de collagène
(protéine fibreuse) de type IV. Lorsqu'une cellule est sénescence, les composants de la
MEC sont majoritairement dégradés par des enzymes du type endopeptidases à zinc
appelés métalloprotéinases matricielles ou MMPs. Celles-ci participent activement au
processus de cicatrisation mais elles contribuent aussi au relâchement cutané et à
25 l'apparition des rides qui sont les premiers signes du vieillissement cutané. Parmi elles, la
MMP-9 est une gélatinase qui a une activité contre les molécules de collagène dénaturées
(gélatine) mais peut également cliver les molécules natives de collagène de type IV, V et
VII.

Sur une lignée de kératinocytes humains HaCaT traités à l'H₂O₂ mimant le
30 processus de sénescence cellulaire, nous avons analysé l'effet d'extraits de *Moringa* sp.
sur l'expression des ARNm de MMP-9.

Résultats :

L'extrait préparé selon l'exemple 1 inhibe l'expression génique de MMP-9 à 1, 10 et 30 $\mu\text{g/ml}$, et ceci de façon significative aux trois concentrations.

L'extrait préparé selon l'exemple 1 permet de restaurer les propriétés mécaniques de la MEC : fermeté, élasticité et tonicité de la MEC de la peau et permet également de restaurer la structure protéique de l'épiderme.



REVENDICATIONS

1. Extrait de graines entières de *Moringa* sp. présentant (% en poids par rapport au poids de l'extrait sec)
 - 5 - une teneur en huile de 5% à 50% dont (i) 2% à 10% de triglycérides et acides gras et (ii) 5% à 15% de lipides polaires ;
- et une teneur en polyphénols totaux de 0,01% à 5% (exprimés en g de pyrogallol pour 100 g d'extrait sec).
- 10 2. Extrait selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un extrait obtenu en solvant moyennement polaire.
3. Extrait de graines entières de *Moringa* sp. selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il s'agit plus particulièrement de *Moringa oleifera* ou de *Moringa drouhardii*.
- 15 4. Utilisation d'un extrait de graines entières de *Moringa* sp. selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, en tant que principe actif anti-âge.
5. Utilisation selon la revendication 4 caractérisé en ce que ledit principe actif est destiné
20 à lutter contre l'ensemble des signes du vieillissement cutané chez les personnes ayant une peau mature.
6. Utilisation d'un extrait de graines entières de *Moringa* sp. selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour renforcer et restaurer la fonction barrière de la peau.
- 25 7. Composition cosmétique et/ou dermatologique comprenant, à titre de principe actif, un extrait de graines entières de *Moringa* sp. selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et au moins un excipient cosmétologiquement et/ou dermatologiquement acceptable.
- 30 8. Composition selon la revendication 7, comprenant une quantité d'extrait sec de graines entières de *Moringa* sp. comprise entre 0,1 g et 5 g pour 100 g de ladite composition.
9. Composition selon la revendication 7, contenant en outre un ou plusieurs autres principes actifs destinés à la protection solaire et/ à la dépigmentation de la peau.



10. Procédé cosmétique pour lutter contre l'ensemble des signes du vieillissement cutané chez les personnes ayant une peau mature, caractérisé en ce qu'il implique l'utilisation par voie topique ou orale d'un extrait de graines entières de *Moringa* sp. tel que défini à
5 l'une quelconque des revendications 1 à 3.

11. Procédé de préparation d'un extrait de graines entières de *Moringa* sp. selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé par les étapes suivantes :

- broyage des graines entières ;
- 10 - au moins une extraction par un solvant moyennement polaire ;
- centrifugation ou filtration ;
- et séchage.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le solvant moyennement
15 polaire est choisi dans le groupe constitué d'un alcool en C1 à C4, d'acétone, d'un mélange alcool / eau et d'un mélange acétone / eau, utilisés seuls ou en mélanges.

13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que le solvant moyennement polaire est un mélange éthanol / eau, préférentiellement dans des
20 proportions éthanol / eau comprises entre 9/1 et 7/3 (v/v).

