

(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
9 novembre 2006 (09.11.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/117466 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2006/000966

(22) Date de dépôt international : 28 avril 2006 (28.04.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0504595 4 mai 2005 (04.05.2005) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LAB-
ORATOIRE NUXXE [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-gon-
don (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, 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, 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 :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.



WO 2006/117466 A1

(54) Title: NOVEL USE OF COCOA POLYPHENOLS FOR CELL CYCLE REGULATION

(54) Titre : NOUVELLE UTILISATION DE POLYPHENOLS DE CACAO POUR LA REGULATION DU CYCLE CELLU-
LAIRE

(57) Abstract: The invention relates to a novel use of cocoa polyphenols, in which polyphenols extracted from cocoa (Theobroma cacao) or cocoa cells are used for the preparation of a composition that is intended to regulate the cutaneous cell cycle. The invention is suitable for topical cosmetic and/or dermatological compositions which are intended to regulate the cutaneous cell cycle.

(57) Abrégé : L'invention concerne une nouvelle utilisation de polyphénols de cacao. On utilise des polyphénols extraits de cacao (Theobroma cacao) ou des cellules de cacao pour la préparation d'une composition destinée à réguler le cycle cellulaire cutané. Application aux compositions cosmétiques et/ou dermatologiques pour application topique, destinées à la régulation du cycle cellulaire cutané.

**NOUVELLE UTILISATION DE POLYPHENOLS DE CACAO
POUR LA REGULATION DU CYCLE CELLULAIRE.**

La présente invention concerne une nouvelle utilisation de polyphénols extraits de cacao en cosmétique et en dermatologie, et plus particulièrement une nouvelle utilisation de polyphénols extraits de cacao pour la régulation du cycle cellulaire.

La peau constitue un véritable organe comprenant plusieurs couches intégrées, allant de la couche superficielle, l'épiderme, jusqu'aux couches plus profondes, le derme et l'hypoderme, et chacune possède des propriétés spécifiques permettant à l'ensemble de réagir et de s'adapter aux conditions de son environnement.

L'épiderme, principalement composé de kératinocytes (90% des cellules épidermiques), de mélanocytes (2 à 3% des cellules épidermiques) et des cellules de Langerhans, a une épaisseur variable selon les différentes parties du corps.

Le derme, plus épais, se compose principalement de collagène, d'élastine et de protéoglycanes. Ces trois types de molécules sont synthétisés par les fibroblastes dermiques. Les fibres de collagène assurent la résistance mécanique et la texture de la peau, l'élastine est responsable de l'élasticité, et les protéoglycanes jouent un rôle majeur de structure et d'hydratation de la peau. D'autres cellules comme les macrophages et les leucocytes sont également présentes dans la couche du derme.

L'hypoderme, qui est la couche la plus profonde de la peau, contient les adipocytes qui produisent des lipides pour que le tissu sous-cutané fabrique une couche grasse protégeant les muscles, les os et les organes internes contre les chocs.

Le vieillissement de la peau peut être intrinsèque, ou extrinsèque c'est-à-dire provoqué par l'environnement, y compris les agressions climatiques, qui peuvent notamment contribuer à accélérer la dégradation du collagène du derme,

et en particulier l'exposition au soleil, les variations de températures et les radicaux libres. Les premiers signes du vieillissement de la peau, tels que les rides et ridules, sont généralement provoqués par le stress et les changements biologiques et physiologiques, accélérés par l'environnement extérieur ou par les modes de vie. L'apparition de marques pigmentaires, la diminution de l'épaisseur de la peau et son affaissement sont également des changements observés au cours du vieillissement. En fait, la capacité de la peau à remplacer le collagène endommagé diminue avec le temps, et des espaces et des irrégularités apparaissent dans le réseau du collagène. A l'échelle de la peau, le vieillissement provoque notamment une diminution des synthèses protéiques (collagène, élastine), une diminution de la synthèse des protéoglycanes entre autres, ainsi qu'une élévation des métalloprotéinases de type MMP3.

Dans les tissus normaux, existe un équilibre entre dégradation et synthèse tissulaire. Ainsi un excès de métalloprotéinases entraîne une dégradation de la matrice extracellulaire et de biomolécules telles que collagène, protéoglycane et gélatine, ce qui peut avoir des conséquences néfastes sur le tissu épidermique et peut aussi engendrer des maladies des cartilages, des processus inflammatoires, des mélanomes, etc.

Pour atténuer ou éliminer les signes du vieillissement de la peau, on a proposé divers traitements à base de compositions telles que crèmes et lotions contenant des alpha-hydroxyacides ou des rétinoïdes, appliquées régulièrement pour réduire progressivement le nombre de rides et ridules. On a aussi proposé des implants de collagène pour dissimuler les lignes d'expression autour des yeux ou de la bouche, la dermabrasion et les peelings chimiques pour éliminer la couche supérieure de la peau endommagée, la chirurgie esthétique, telle que la blépharoplastie (chirurgie des paupières) ou un lifting pour rajeunir une peau présentant un affaissement, ou encore une restructuration à l'aide d'un laser au dioxyde de

carbone pour éliminer les ridules. 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 la synthèse du collagène et des glycosaminoglycannes, et par conséquent la
5 régénération cutanée.

Toutefois, si tous ces produits et méthodes connus peuvent avoir un effet favorable sur les signes du vieillissement cutané, par exemple en masquant ou en réduisant les rides, ils sont généralement sans incidence sur l'évolution
10 cellulaire qui aboutit à ces signes du vieillissement.

On sait que les polyphénols d'origine végétale, extraits par exemple du raisin ou du cacao, ont des propriétés intéressantes utilisables en cosmétique. Par exemple, le brevet EP 1.289.491 enseigne que les polyphénols extraits du
15 cacao (*Theobroma cacao*) possèdent une activité anti-ride utiles pour les soins contre le vieillissement de la peau. Le brevet FR 2.838.055 décrit l'utilisation d'extrait de cacao pour lutter contre l'hypersensibilisation cutanée et moduler la réponse inflammatoire de la peau en réaction à la présence
20 de nickel.

Les polyphénols de cacao se répartissent en trois groupes qui appartiennent tous à la famille des flavonoïdes : les catéchines (flavanols, 37% env.) et notamment la (-)épi-catéchine, les procyanidines (oligomères flavanoliques, 58%)
25 et les anthocyanes (5%), notamment le cyanidine-3-L-arabinoside et le cyanidine-3-L-galactoside. Il a également été montré que des oligomères d'épicatéchine peuvent protéger les cellules et les tissus cutanés contre les effets des peroxy-nitrites qui sont des médiateurs de l'inflammation, en
30 réagissant avec les peroxy-nitrites ou avec des produits de dégradation, jouant ainsi un rôle anti-inflammatoire. Des études réalisées sur des modèles animaux ont aussi montré que certains extraits de cacao enrichis en polyphénols pouvaient inhiber la promotion de tumeurs de la peau induites par le

DMBA et le TPA, chez la souris [Osakabe et al., Am. Chem. Soc. 88-101 (1999)].

Aussi, bien que de nombreuses compositions dermatologiques et cosmétiques aient été proposées, il existe toujours
5 un besoin de pouvoir disposer de nouvelles compositions topiques alternatives permettant d'agir sur les cellules cutanées, et notamment des compositions topiques à base d'extraits végétaux appropriés provenant plus particulièrement de plantes, capables de procurer des effets bénéfiques sur la
10 peau, sans entraîner aucun effet toxique.

Malgré les progrès des techniques d'extraction végétale et de synthèse ou hémisynthèse organique permettant d'obtenir des produits identiques à ceux existant dans les plantes, l'intérêt des consommateurs pour les produits à base de
15 plantes et de substances naturelles exige la mise au point de nouvelles techniques susceptibles de garantir la qualité et l'authenticité des produits.

Les études réalisées par la demanderesse ont montré que les polyphénols extraits du cacao pouvaient aussi avoir une
20 influence sur le métabolisme cellulaire cutané et que les cellules de cacao obtenues par culture de cellules végétales de Theobroma cacao étaient particulièrement intéressantes pour la préparation de compositions cosmétiques et dermatologiques à cet effet.

25 La présente invention a donc pour objet une nouvelle utilisation de polyphénols extraits de cacao ou de cellules de cacao pour la préparation d'une composition cosmétique et/ou dermatologique destinée à réguler le cycle cellulaire cutané, et plus particulièrement à lutter contre la sénescence cellu-
30 laire et à favoriser la régénération cellulaire.

L'invention a aussi pour objet une nouvelle utilisation de polyphénols extraits du cacao ou de cellules de cacao pour la préparation d'une composition permettant de lutter contre la sénescence cellulaire et de favoriser la régénération
35 cellulaire.

L'invention a encore pour objet l'utilisation de polyphénols extraits du cacao ou de cellules de cacao pour la préparation d'une composition dermatologique permettant de lutter contre la dégénérescence cellulaire, ainsi qu'un
5 procédé cosmétique pour combattre les effets de la dégénérescence cellulaire de la peau, consistant à appliquer sur les zones de la peau concernées une composition contenant une quantité efficace de polyphénols extraits du cacao ou de cellules de cacao.

10 L'invention a encore pour objet une nouvelle composition topique à base d'extraits végétaux spécialement adaptée à une telle utilisation, comprenant un extrait de polyphénols de cacao ou des cellules de cacao en une concentration adaptée à l'effet recherché.

15 Les études effectuées ont montré l'intérêt des polyphénols de cacao, tant comme extraits de cacao (*Theobroma cacao*), éventuellement encapsulés, que comme cellules de cacao.

Ces études ont notamment montré, comme indiqué plus loin,
20 que les polyphénols de cacao suivant l'invention

- présentent une parfaite innocuité vis-à-vis des cellules endothéliales de l'épiderme, les images histologiques des épidermes traités étant similaires à celles des témoins non traités ;
- 25 • entraînent le maintien des cellules cutanées en phase de croissance exponentielle se traduisant par un tapis cellulaire confluent et homogène.

Ainsi, les compositions topiques de l'invention peuvent être utilisées avantageusement en dermatologie et en cosmétique pour assurer la régulation du cycle cellulaire chez des
30 sujets susceptibles d'être affectés par une dégénérescence cellulaire se manifestant par une diminution des fonctions vitales des cellules cutanées, par exemple dans des situations d'hyperkératinisation ou de perte d'éclat du teint de la peau,
35 indépendamment de l'âge de la personne.

Le cycle cellulaire cutané dure normalement environ 28 jours et comprend plusieurs phases successives, à savoir un intervalle entre la fin de la mitose et le début de la synthèse de l'ADN (phase G1), la phase de réplication de l'ADN (phase S), l'intervalle entre la fin de la réplication de l'ADN et le début de la mitose (phase G2) et la phase mitotique aboutissant aux deux cellules filles. En dehors de ce cycle cellulaire, les cellules peuvent se trouver en repos avec une diminution de l'activité métabolique (phase G0). La sénescence cellulaire se traduit essentiellement par un blocage des cellules dans la phase G1, sans passage à la phase de synthèse conduisant à la division cellulaire. Les cellules sénescents sont caractérisées par un métabolisme actif avec surexpression de l'enzyme β -galactosidase. L'action des extraits de polyphénols de cacao, et des cellules de cacao, de l'invention permet d'éviter cette dégénérescence cellulaire, en régulant le cycle cellulaire et en augmentant le phase de quiescence, comme indiqué plus loin.

Les compositions selon la présente invention peuvent se présenter sous toutes les formes galéniques usuelles adaptées à une application topique, et de préférence sous forme de lotion, crème, lait ou sérum.

Elles peuvent comprendre entre 0,1% et 5% en poids d'extrait de polyphénols de cacao, par rapport au poids total de la composition, de préférence entre 0,2 et 1% en poids. Dans le cas de l'utilisation de cellules de cacao, les compositions peuvent comprendre entre 0,01% et 0,5% en poids de cellules de cacao, par rapport au poids total de la composition, de préférence entre 0,02% et 0,1% en poids.

Suivant une variante de la présente invention, il peut être avantageux d'utiliser des cellules de cacao obtenues par des techniques connues de croissance ou multiplication cellulaire, en milieu liquide ou solide, de cellules d'origine végétale cultivées *in vitro* dans un environnement contrôlé, dans des conditions aseptiques en l'absence de micro-

organismes, au lieu d'utiliser des extraits de polyphénols de cacao.

La technique de la culture végétale présente l'avantage de produire des cellules cultivées dans des conditions
5 environnementales bien définies et reproductibles, en ce qui concerne notamment la température, la lumière et le milieu de culture, et de produire des cellules non différenciées se trouvant au même stade physiologique à un instant donné. Un autre avantage est la formation de métabolites secondaires en
10 un temps plus court, de l'ordre de une à trois semaines, que chez la plante où ce délai est de plusieurs mois. Ainsi, on pourra se référer aux travaux effectués sur des suspensions cellulaires de cacao tels que ceux de Gurney et Evans, Exp. Bot. 43, 769-775, (1992), Wen et Kinsella, J. Food Sc. 57, 1452-1457 (1992) et Leathers et Scragg, Plant Sc. 62, 217-228
15 (1989).

Suivant la présente invention, on peut plus particulièrement utiliser des cellules dédifférenciées lyophilisées de cacao dont les teneurs des trois principaux composants sont
20 respectivement de 1,2 mg d'anthocyanes, 136,0 mg d'oligomères procyanidoliques (OPC) et 11,2 mg d'épicatéchine, par gramme de cellules lyophilisées. La lyophilisation des cellules permet d'améliorer leur conservation et, par suite, de faciliter leur incorporation dans les compositions cosmétiques.

25 Les compositions conformes à la présente invention peuvent être présentées sous les formes classiquement utilisées pour une application topique, c'est-à-dire sous forme de lotion, gel, émulsion (en particulier crème ou lait), masque, pommade, liposomes ou encore des patches transdermiques,
30 contenant des excipients et supports usuels compatibles et pharmaceutiquement acceptables. Elles peuvent aussi se présenter sous forme de lingettes imbibées d'une solution contenant un extrait de polyphénols de cacao suivant l'invention.

Ces formes d'administration par voie topique sont
35 préparées par les techniques usuelles, et par exemple, dans le

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 n'en contenant pas du tout.

Les compositions topiques selon l'invention peuvent par exemple comprendre des excipients appropriés pour une administration topique externe, en particulier des excipients acceptables sur le plan dermatologique et cosmétologique. Ces excipients appropriés pour la formulation sont bien connus de l'homme du métier et comprennent en particulier des agents de pénétration tels que l'éthoxydiglycol, le phytantriol, l'octyl dodécanol et l'escine ; les épaississants tels que les gommes naturelles et les polymères de synthèse ; les émoullissants et les tensioactifs tels que l'octanoate de cétéaryle, le myristate d'isopropyle, l'isononanoate de cétéaryle, la diméthicone, la cyclométhicone, le 3-diisostéarate de polyglycéryle, le polyisobutène hydrogéné, l'alcool cétylique, le palmitate cétylique, le phosphate cétylique ; les émulsionnants tels qu'une lécithine ou un tensioactif à base d'inuline comme l'Inutec® de la société Orafti ; les conservateurs tels que le phénoxyéthanol, le parahydroxybenzoate de méthyle (méthylparaben), le parahydroxybenzoate d'éthyle (éthylparaben), le parahydroxybenzoate de propyle (propylparaben) et le Phenonip® associant du phénoxyéthanol et des parahydroxybenzoates de méthyle, éthyle, butyle et isobutyle ; les colorants ; les parfums ; etc.

D'autres ingrédients peuvent être utilisés dans les compositions : les agents hydratants tels que le propylène glycol, la glycérine, le butylène glycol et également les vitamines antioxydantes telles que la vitamine E, par exemple l'acétate de tocophérol ou le tocotriénol, la vitamine C, les polyphénols naturels. On peut également ajouter à la compo-

sition des agents conditionneurs de la peau tels que le nylon et le nitrure de bore.

Il peut être avantageux, suivant une variante de la présente invention, d'incorporer dans la composition une substance présentant une activité complémentaire utile, par exemple une activité anti-élastase, ou une activité favorisant la synthèse du collagène. On peut utiliser par exemple le lipopeptide disponible dans le commerce sous la marque Matrixyl® (Sederma) généralement sous forme de solution hydro-alcoolique titrée en palmitoyl-lysyl-thréonyl-thréonyl-lysyl-sérine.

Des agents de protection contre les rayons ultraviolets peuvent aussi être avantageusement incorporés dans les compositions, et par exemple des filtres solaires UV-A et UV-B hydrophiles ou lipophiles, choisis parmi la benzophénone ou un dérivé de benzophénone tel que la 2-hydroxy-4-méthoxybenzophénone (Eusolex® 4360), ou un ester d'acide cinnamique et plus particulièrement le méthoxycinnamate d'octyle (Eusolex® 2292), le méthoxycinnamate d'éthyl-2-hexyle (Parsol MCX®), ou encore un cyano- β,β -diphénylacrylate tel que l'octocrylène (Eusolex® OCR), le 4-méthylbenzylidène camphre (Eusolex 6300®), et des dérivés du dibenzoylméthane tels que le 4-isopropyl dibenzoylméthane (Eusolex 8020), le t-butyl-méthoxy dibenzoylméthane (Parsol 1789®), et le 4-méthoxydibenzoylméthane. On peut aussi utiliser des pigments formant écran anti-ultraviolet, comme par exemple le dioxyde de titane, l'oxyde de zinc, l'oxyde de zirconium ou encore l'oxyde d'aluminium.

Des exemples non limitatifs de compositions conformes à la présente invention sont donnés ci-après. Sauf indication contraire, les pourcentages et parties sont indiqués en poids.

Exemple 1

Suivant les techniques classiques, on prépare un sérum de régénération cellulaire ayant la composition pondérale suivante.

5	Eau déminéralisée	qsp	100,00
	EDTA trisodique		0,10
	Pentylène glycol		5,00
	Caprylyl glycol		3,00
	Sorbate de potassium		0,30
10	Xylityl glycoside		2,00
	Polyacrylate de sodium		1,00
	α -tocophérol		0,50
	Octyl dodécanol		2,00
	Tetra-isopalmitate d'ascorbyle		0,10
15	Matrixyl [®]		3,00
	Essence d'ylang ylang		0,10
	Palmitate de vitamine A 1M/UI		0,20
	Polyphénols extraits de cacao		0,50

L'extrait polyphénolique utilisé dans la composition ci-dessus est un extrait obtenu par broyage de fèves de cacao et séparation hydrophile/lipophile du beurre de cacao d'une part et d'un mélange de protéines et de polyphénols d'autre part. La séparation hydrophile / lipophile permet, par extraction de la graine broyée, de séparer à l'eau les corps gras surnageants de la phase polyphénols / protéines. On utilise de préférence une eau portée à une température comprise entre 80 et 100°C environ..

Le sérum ayant la composition indiquée ci-dessus est utilisé en application de préférence sur les bras et le visage, une à deux fois par jour pendant une période de 4 à 8 semaines.

Exemple 2

Suivant une technique usuelle, on prépare une crème de régénération cellulaire de la peau ayant la composition pondérale suivante.

5	Eau déminéralisée	qsp	100,00
	EDTA trisodique		0,10
	Pentylène glycol		5,00
	Caprylyl glycol		3,00
	α -tocophérol		0,70
10	Octyl dodécanol		2,00
	Palmitate de vitamine A 1M/UI		0,20
	Tetra-isopalmitate d'ascorbyle		0,10
	Huile d'onagre		3,00
	Stéarate d'octyl stéaroyle		3,00
15	Huile d'arachide hydrogénée		2,00
	Alcool béhénylique		2,50
	Palmitate de cétyle		1,50
	Hydroxyde de sodium		0,10
	Phosphate d'alkyle C20-C22		2,00
20	Beurre de Karité		2,00
	Protéines de soja hydrolysées		3,00
	Matrixyl®		3,00
	Cellules de cacao		0,05

Exemple 3

25 Evaluation de la cytotoxicité

La cytotoxicité de l'extrait de polyphénols vis-à-vis des cellules endothéliales a été évaluée comme suit.

L'extrait polyphénolique de l'invention, à la concentration de 0,5%, et un placebo (même base sans l'extrait de polyphénol) sont déposés à raison de 10 μ l/cm² sur des
30 explants de peau humaine pendant 24 heures, comparativement à des explants témoins. Cet essai sur trois lots (un suivant l'invention, un témoin et un placebo) a été conduit en duplicate.

On constate que la composition de l'invention n'induit aucune toxicité.

Les images histologiques, après coloration HES des explants traités sont similaires à celles des explants
5 témoins.

Ces résultats montrent que l'extrait de polyphénols selon l'invention ne présente aucune activité cytotoxique vis-à-vis des cellules endothéliales de l'épiderme, quelle que soit la concentration.

10

Exemple 4

Evaluation de l'effet sur la sénescence cellulaire

L'étude de l'action de la composition de l'invention sur la sénescence cellulaire de kératinocytes en culture par révélation de la β -galactosidase a été faite sur des
15 kératinocytes d'origine humaine cultivés dans un milieu défini. Elle consiste en un marquage des cellules présentant la β -galactosidase, considérée comme biomarqueur de la sénescence cellulaire.

Suivant une méthode classique, on obtient des primo-
20 cultures de kératinocytes à partir d'une biopsie de peau humaine. Les essais sont effectués sur les kératinocytes, entre le 8^{ème} et le 10^{ème} passage, afin d'assurer la présence des cellules sénescents au niveau des cellules témoins.

Sachant que les cellules sénescents surexpriment la β -galactosidase, la méthode consiste à fournir aux cellules le β -galactoside qui, après transformation, forme un précipité bleu significatif de l'activité de l'enzyme β -galactosidase.
25

Quatre lots ont été constitués :

- Lot 1 : témoin négatif ne recevant aucun produit.
- 30 • Lot 2 : traité par la composition à base de cellules de cacao à 0,02%.
- Lot 3 : traité par la composition à base de cellules de cacao à 0,05%.

- Lot 4 : traité par la composition à base de cellules de cacao à 0,10%.

L'essai est conduit en triplicate pour chaque lot.

Les kératinocytes sont ensemencés sur des lamelles dans des boîtes multipuits (6 puits) à raison de 10^5 cellules par puits dans 3 ml de milieu de culture Skinethic® supplémenté par l'EGF, l'hydrocortisone, l'insuline et la gentamycine. Ils sont ensuite maintenus en étuve sous CO₂ pendant 5 jours, en présence ou en l'absence de la composition de l'invention (cellules de cacao à différentes concentrations).

Après 5 jours d'incubation, les cellules ont été lavées avec un tampon phosphate puis fixées dans un mélange formaldéhyde (2%) - glutaraldéhyde (0,2%). Les tapis cellulaires ont été lavés trois fois avec un tampon phosphate puis mis en contact avec une solution colorante appropriée contenant du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside "X-Gal" (1 mg/ml).

Les échantillons sont conservés à 37°C en étuve pendant 6 à 12 heures. L'intensité de la coloration est évaluée sous microscope optique. Après coloration, les cellules ont été lavées à l'eau distillée puis séchées à 50°C.

Le résultat du comptage des cellules traitées aux différentes concentrations par rapport au témoin est indiqué dans le tableau ci-après.

	Nb de cellules comptées	% de cellules sénescents
Témoin négatif	98 \pm 16	24
Cellules de cacao 0,02%	105 \pm 13	ns
Cellules de cacao 0,05%	131 \pm 6	12
Cellules de cacao 0,10%	139 \pm 15	10

25

Ces résultats confirment que la composition de l'invention, notamment sous forme de cellules de cacao, diminue significativement le taux de cellules sénescents.

De plus, l'observation au microscope optique ces cellules traitées montre un maintien du taux de multiplication

30

cellulaire, avec des cellules confluentes non individualisées, par rapport aux cellules témoins qui sont moins confluentes et comportent par endroit des cellules individualisées.

REVENDICATIONS

1. L'utilisation de polyphénols extraits de cacao (Theobroma cacao) ou de cellules de cacao pour la préparation d'une composition cosmétique et/ou dermatologique destinée à réguler le cycle cellulaire cutané.

5 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est destinée à lutter contre la sénescence cellulaire.

3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est destinée à favoriser la régénération cellu-
10 laire.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la concentration en extrait de polyphénols de cacao est comprise entre 0,1% et 5% en poids par rapport au poids total de la composition.

15 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la concentration en cellules de cacao est comprise entre 0,01% et 0,5% en poids par rapport au poids total de la composition.

20 5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que la concentration en extrait de polyphénols de cacao est de 0,5% en poids.

6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que la concentration en cellules de cacao est de 0,05% en poids.

25 7. Utilisation de polyphénols extraits du cacao ou de cellules de cacao pour la préparation d'une composition permettant de lutter contre la sénescence cellulaire et de favoriser la régénération cellulaire.

30 8. Utilisation de polyphénols extraits du cacao ou de cellules de cacao pour la préparation d'une composition dermatologique permettant de lutter contre la dégénérescence cellulaire.

9. Procédé cosmétique pour combattre les effets de la
dégénérescence cellulaire de la peau, consistant à appliquer
sur les zones de la peau concernées une composition contenant
une quantité efficace de polyphénols extraits du cacao ou de
5 cellules de cacao.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2006/000966

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K8/97 A61Q19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	DATABASE KOSMET [Online] ENNAMANY R. ET AL: "Active plant cells for the prevention of senescence and matrix degradation" XP002362280 retrieved from STN Database accession no. 34820 abstract & IFSCC CONFERENCE, "WORLD WIDE WELLNESS", 19-21 SEPTEMBER 2005, FLORENCE, ITALY, PROCEEDINGS, 2005, pages 1-8,	1-9
A	FR 2 838 055 A (CEP) 10 October 2003 (2003-10-10) the whole document	1-9
A	FR 2 810 242 A (LABORATOIRE NUXE) 21 December 2001 (2001-12-21) the whole document	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 September 2006

Date of mailing of the international search report

28/09/2006

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Siatou, Evangelia

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2006/000966

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>& EP 1 289 491 A 12 March 2003 (2003-03-12) cited in the application ----- WAROQUIER-CLEROUT R ET AL: "NON-SAPONIFIABLE FRACTION OF COCOA SHELL BUTTER: EFFECT ON RAT AND HUMAN SKIN FIBROBLASTS" INTERNATIONAL JOURNAL OF COSMETIC SCIENCE, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 14, no. 1, 1992, pages 39-46, XP001031250 ISSN: 0142-5463 the whole document</p>	1-9
A	<p>R.R. LEATHERS ET AL: "The effect of different temperatures on teh growth, lipid conent and fatty acid composition of theobroma cacao cell suspension cultures" PLANT SCIENCE, vol. 62, no. 2, 1989, pages 217-227, XP002362231 cited in the application the whole document -----</p>	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/FR2006/000966

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2838055	A	10-10-2003	NONE
FR 2810242	A	21-12-2001	AU 6917201 A 24-12-2001
			CA 2408575 A1 20-12-2001
			EP 1289491 A1 12-03-2003
			WO 0195872 A1 20-12-2001
			JP 2004503481 T 05-02-2004
			US 2003170199 A1 11-09-2003
EP 1289491	A	12-03-2003	AU 6917201 A 24-12-2001
			CA 2408575 A1 20-12-2001
			FR 2810242 A1 21-12-2001
			WO 0195872 A1 20-12-2001
			JP 2004503481 T 05-02-2004
			US 2003170199 A1 11-09-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2006/000966

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61K8/97 A61Q19/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	DATABASE KOSMET [Online] ENNAMANY R. ET AL: "Active plant cells for the prevention of senescence and matrix degradation" XP002362280 extrait de STN Database accession no. 34820 abrégé & IFSCC CONFERENCE, "WORLD WIDE WELLNESS", 19-21 SEPTEMBER 2005, FLORENCE, ITALY, PROCEEDINGS, 2005, pages 1-8, -----	1-9
A	FR 2 838 055 A (CEP) 10 octobre 2003 (2003-10-10) le document en entier -----	1-9
A	FR 2 810 242 A (LABORATOIRE NUXE) 21 décembre 2001 (2001-12-21) le document en entier -----	1-9
	-/--	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 septembre 2006

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/09/2006

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Siatou, Evangelia

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>& EP 1 289 491 A 12 mars 2003 (2003-03-12) cité dans la demande</p> <p>-----</p> <p>WAROQUIER-CLEROUT R ET AL: "NON-SAPONIFIABLE FRACTION OF COCOA SHELL BUTTER: EFFECT ON RAT AND HUMAN SKIN FIBROBLASTS" INTERNATIONAL JOURNAL OF COSMETIC SCIENCE, KLWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 14, no. 1, 1992, pages 39-46, XP001031250 ISSN: 0142-5463 le document en entier</p> <p>-----</p>	1-9
A	<p>R.R. LEATHERS ET AL: "The effect of different temperatures on teh growth, lipid conent and fatty acid composition of theobroma cacao cell suspension cultures" PLANT SCIENCE, vol. 62, no. 2, 1989, pages 217-227, XP002362231 cité dans la demande le document en entier</p> <p>-----</p>	1-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2006/000966

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
FR 2838055	A	10-10-2003	AUCUN		
FR 2810242	A	21-12-2001	AU	6917201 A	24-12-2001
			CA	2408575 A1	20-12-2001
			EP	1289491 A1	12-03-2003
			WO	0195872 A1	20-12-2001
			JP	2004503481 T	05-02-2004
			US	2003170199 A1	11-09-2003
EP 1289491	A	12-03-2003	AU	6917201 A	24-12-2001
			CA	2408575 A1	20-12-2001
			FR	2810242 A1	21-12-2001
			WO	0195872 A1	20-12-2001
			JP	2004503481 T	05-02-2004
			US	2003170199 A1	11-09-2003