



CONFÉDÉRATION SUISSE  
INSTITUT FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 692 902 A5

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>: A 61 K 007/48  
A 61 K 035/78

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein  
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

<p>⑳ Numéro de la demande: 02066/97</p>	<p>⑦③ Titulaire(s): LVMH RECHERCHE, 25, rue des Peupliers, 92752 Nanterre (FR)</p>
<p>㉑ Date de dépôt: 03.01.1997</p>	<p>⑦② Inventeur(s): Bonte, Frédéric, 54 ruelle Tudelle, 45100 Orléans (FR) Dumas, Marc, 47ter avenue de la Mouillère, Apt. 61, 45100 Orléans (FR)</p>
<p>③① Priorité: 03.01.1996 FR 96/00018</p>	<p>⑦④ Mandataire: Bovard AG, Patentanwälte, Optingenstrasse 16, 3000 Bern 25 (CH)</p>
<p>㉔ Brevet délivré le: 13.12.2002</p>	<p>⑧⑥ Demande internationale: PCT/FR 19/97000 (Fr)</p>
<p>④⑤ Fascicule du brevet publiée le: 13.12.2002</p>	<p>⑧⑦ Publication internationale: WO 19/97006 (Fr) 27.2.1997</p>

⑤④ Utilisation d'un extrait d'Eriobotrya japonica, notamment dans le domaine de la cosmétique, pour stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes.

⑤⑦ L'invention concerne des utilisations d'un extrait d'Eriobotrya japonica notamment dans le domaine de la cosmétique ou de la pharmacie.

Cet extrait permet de stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes, en particulier de l'acide hyaluronique, conférant ainsi aux compositions cosmétiques qui le renferment la propriété d'améliorer la fermeté et la souplesse cutanée, de lutter contre la formation des rides ou d'en atténuer la profondeur ou d'obtenir un lissage de la surface de la peau grâce à un effet tenseur, ou d'hydrater la peau.

L'invention concerne également l'utilisation des mêmes extraits pour obtenir une stimulation de la synthèse des glycosaminoglycanes à partir de milieu de culture de cellules, en particulier de fibroblastes ou de kératinocytes.



## Description

L'invention concerne une nouvelle utilisation, notamment dans le domaine de la cosmétique, d'un extrait d'Eriobotrya japonica, comme agent destiné à stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes.

5 La plante Eriobotrya japonica est un arbre de 5 à 7 m de haut, aux branches glabres, aux feuilles alternées, oblongues et épaisses, fleurissant entre les mois de septembre et février. Les feuilles sont reconnues dans la pharmacopée vietnamienne pour leurs propriétés anti-tussives et anti-spasmodiques. La décoction est aussi utilisée pour laver les plaies. Cette plante possède également des activités anti-inflammatoires, selon la littérature. Des activités cosmétiques pour les cheveux ou la peau ont également été citées.

10 Plus précisément en ce qui concerne les applications déjà connues de la plante Eriobotrya japonica dans le domaine pharmaceutique, on citera:

- la monographie concernant cette plante parue dans Chinese Herbal Medicine, page 296, dans laquelle on signale essentiellement des applications comme anti-tussif et comme agent stomacal,
- 15 – la monographie parue page 171 de Medicinal Plants in Vietnam publiée sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé de Manille et de l'Institut des matériaux médicaux de Hanoi qui cite également des applications thérapeutiques comme anti-tussif et anti-spasmodique,
- Chinese Medicine Séries 1, Chinese Materi Medica Vegetable Kingdom qui cite pages 164–165 également des applications de cette même plante comme anti-tussif et anti-vomitif,
- 20 – le brevet japonais JP 56-073 027 (TEIJIN Ltd) qui concerne des applications des feuilles de cette même plante pour la préparation d'un agent anti-phlogistique.

Plus récemment, on a décrit des applications d'extraits de cette même plante dans le domaine cosmétique, en particulier pour le soin de la peau ou des cheveux.

25 Ainsi, le brevet japonais JP 05-017 206 décrit des applications d'extraits de cette même plante comme agent destiné à prévenir ou à traiter l'exfoliation de l'épiderme dans le cas des peaux rugueuses et met en évidence l'activité de cette plante sur la reproduction des cellules de la peau.

Le brevet japonais JP 62-249 907 décrit, quant à lui, des applications des feuilles d'Eriobotrya japonica pour préparer des produits cosmétiques destinés notamment à améliorer la microcirculation sanguine.

30 Le brevet japonais JP 03-188 008 décrit des applications dans le domaine cosmétique d'une très large famille de plantes, à savoir les rosacées, ces plantes permettant d'améliorer la souplesse et l'hydratation de la peau et de traiter les papules.

Le brevet japonais JP 03-188 014 décrit également des compositions cosmétiques destinées notamment au traitement des cheveux et qui contiennent un extrait de différentes plantes d'une famille très large de rosacées. Ces extraits de plantes sont associés à deux agents tensioactifs particuliers, à savoir un agent anionique et au moins un agent contenant de l'azote.

35 Il a maintenant été découvert que les extraits de la plante Eriobotrya japonica présentent un intérêt précieux en cosmétique, en pharmacie, notamment en dermatologie, par la propriété de stimulation de la production de glycosaminoglycanes par les fibroblastes et les kératinocytes, et en particulier les fibroblastes du derme, notamment du derme humain, et les kératinocytes humains.

40 Or, l'homme de l'art sait que les glycosaminoglycanes (GAG) sont des polymères formés d'unités disaccharidiques. Dans la peau humaine, parmi les GAG les plus fréquemment rencontrés, on peut d'abord citer l'acide hyaluronique qui s'y trouve en quantité la plus abondante. On trouve également les chondroïtines-4 et -6 sulfate, le dermatane sulfate et, en faible quantité, l'héparine et l'héparane sulfate.

45 Les unités disaccharidiques des GAG sont formées d'une hexosamine (D-glucosamine ou D-galactosamine) assez souvent sulfatée alternant avec un acide uronique (D-glucuronique ou L-iduronique).

Les GAG sont généralement liés par liaisons covalentes à des protéines, pour former les protéoglycanes. Parmi les GAG connus, seul l'acide hyaluronique, cité plus haut, n'est pas synthétisé en liaison à une protéine centrale.

50 La structure des protéoglycanes est décrite dans l'ouvrage de E. D. Hay ayant pour titre «Cell Biology of Extracellular Matrix», paru chez Plénum Press, New York, en 1991 et dans la publication de J. E. Silbert, ayant pour titre «Structure and Metabolism of Proteoglycans and Glycosaminoglycans», parue dans J. Invest. Dermatol., 1982, 79, pages 31s–37s.

55 Les protéoglycanes sont présents en particulier dans tous les tissus de mammifères, y compris dans la peau et ses annexes (J. R. Couchman, J. Invest. Dermatol. 1993 Jul. 101 (1 Suppl) 60S–64S). Il est maintenant admis que les protéoglycanes contribuent, par différents processus, à la croissance, à la préservation et à la réparation des tissus. Il a été montré que certains protéoglycanes sont des médiateurs de l'adhésion cellulaire et de la communication transmembranaire, tandis que d'autres interagissent avec d'autres éléments de structure de la matrice extracellulaire. Comme cela a été dit plus haut, les protéoglycanes sont constitués d'une protéine centrale à laquelle sont liées de manière covalente une ou plusieurs chaînes glycosaminoglycanes. Ainsi, les glycosaminoglycanes sont présents au niveau dermique, participant à la composition de la matrice extracellulaire et ont été trouvés liés à certains sites des fibres de collagène, comme décrit par J. E. Scott dans Int. J. Biol. Macromol., 1991, 13, pages 157–161. Ils ont également été identifiés entre les kératinocytes au niveau de l'épiderme comme décrit par J. G. Haggerty et al. dans la revue J. Invest. Dermatol., 1992, 99, pages 374–380, 99 pages

374-380. Enfin, des glycosaminoglycanes ont été trouvés dans la matrice extracellulaire de la papille dermique du follicule pileux. Leur quantité varie en fonction du cycle pileux. Elle atteint un maximum durant la phase anagène correspondant à la croissance du cheveu. En ce qui concerne les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes des follicules pileux, on pourra se reporter en particulier à la publication de J. R. Couchman citée plus haut, et à celle de M. Taylor et al., «Glycosaminoglycan synthesis by cultured human hair follicle dermal papilla cells: comparison with non-follicular dermal fibroblasts», Brit. J. Dermatol. 1992 (May) 126 (5) 479-84. On notera qu'il a été démontré que le minoxidil, substance bien connue présentant une certaine activité sur la croissance et la repousse des cheveux, stimulait la biosynthèse des glycosaminoglycanes (Y. Mori et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1991 (Dec. 26) 642 473-5). Les observations des auteurs précédemment cités, combinées à d'autres preuves cliniques, suggèrent que les glycosaminoglycanes participent à la régulation de la croissance des cheveux.

Les GAG, par leur propriété première de s'associer fortement à des molécules d'eau et de former des gels, assurent l'hydratation du derme et de l'épiderme. Une peau bien hydratée est gage d'une bonne apparence, d'un état physiologique et fonctionnel satisfaisant, avec notamment de bonnes propriétés mécaniques. La diminution des GAG au cours du vieillissement cutané a été montrée par de nombreux auteurs (comme par exemple: Smith et al. dans J. Invest. Dermatol., 1962, 39, pages 347-350; ou Fleischmajer et al. dans Biochim. Biophys. Acta, 1972, 279, pages 265-275; ou encore par Longas et al. dans Carbohydr. Res., 1987, 159, pages 127-136).

Il est donc intéressant de stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes afin notamment de rendre à une peau présentant une déficience au niveau de ses propriétés mécaniques ou de sa barrière hydrique, telle qu'une peau déshydratée ou âgée, les qualités et les propriétés d'une peau normale et jeune, ou de prévenir ou traiter les troubles de la croissance des cheveux, ou encore de restaurer ou renforcer l'éclat et la souplesse d'une chevelure.

Ainsi, la présente invention a pour but principal de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de stimuler la production de glycosaminoglycanes par les cellules cutanées, notamment les cellules cutanées humaines, telles que les fibroblastes ou les kératinocytes, production qui est particulièrement précieuse dans le cadre de la fabrication de produits traitants cosmétiques ou pharmaceutiques et notamment dermatologiques.

L'invention est basée sur la découverte inattendue qu'un extrait de la plante *Eriobotrya japonica* stimule la production des glycosaminoglycanes par les cellules de la peau, en particulier par les fibroblastes et les kératinocytes, en étant ainsi particulièrement utile pour la fabrication de produits traitants cosmétiques ou pharmaceutiques, et notamment dermatologiques.

En particulier, il a été découvert que l'extrait d'*Eriobotrya japonica* stimulait la synthèse d'acide hyaluronique par les fibroblastes et les kératinocytes.

Ainsi, selon l'une de ses caractéristiques essentielles, l'invention concerne l'utilisation d'un extrait de la plante *Eriobotrya japonica* comme agent cosmétique destiné à stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes (GAG) par les cellules de la peau, en particulier par les fibroblastes et/ou les kératinocytes, ledit agent cosmétique étant incorporé dans un véhicule cosmétiquement acceptable.

Elle concerne tout particulièrement les applications où cet agent cosmétique est destiné à stimuler la synthèse de l'acide hyaluronique par les fibroblastes et/ou les kératinocytes, ce qui s'avère particulièrement intéressant pour favoriser l'hydratation de l'épiderme.

A titre d'exemple d'extraits d'*Eriobotrya japonica* utilisables selon l'invention, on citera des extraits commerciaux, en particulier l'extrait hydro-éthanolique de feuilles de cette plante, qui se trouve au catalogue Maruzen Pharmaceutical, Hiroshima, Japon.

Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, l'extrait de la plante est obtenu à partir des parties aériennes broyées de la plante *Eriobotrya japonica*, de préférence à partir de feuilles, fleurs, tiges, écorce de tiges ou fruits.

Selon un autre mode de réalisation préféré, l'extrait précité est un extrait de feuilles broyées de la plante *Eriobotrya japonica*.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux, l'extrait précité de la plante *Eriobotrya japonica* est un extrait obtenu par extraction par un solvant polaire ou un mélange de solvants polaires. De préférence, on utilisera un alcool tel que le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isopropanol, le propylène glycol ou le butylène glycol, ou un mélange de ces alcools ou encore un mélange hydro-alcoolique.

On choisira avantageusement comme solvant pour réaliser cette extraction le 1-3butylène glycol ou un mélange de ce solvant avec de l'eau, de préférence un mélange 50:50 en volume.

Dans ce cadre, les procédures d'extraction classiques bien connues de l'homme de l'art peuvent être utilisées. En particulier, l'extraction peut être réalisée sur le matériau broyé, de préférence sur les parties aériennes, telles que feuilles, fleurs, tiges, écorce de tige ou fruits. Avantageusement, l'extraction est réalisée à partir de feuilles. Le matériel végétal broyé est introduit dans le solvant d'extraction, de préférence constitué par le solvant ou le mélange de solvants polaires précités. L'extraction peut être renouvelée plusieurs fois jusqu'à épuisement du matériau, conformément aux procédés bien connus de l'homme de l'art. L'extraction peut être réalisée à la température ambiante, ou à chaud et notamment au reflux du solvant. La proportion en poids entre le solvant et le matériau à extraire peut varier dans de larges limites. Plus précisément, elle peut être comprise entre 1:1 et 50:1, et, de préférence, entre 5:1 et 20:1.

Il a, par ailleurs, été observé que la stimulation de la synthèse des glycosaminoglycanes entraînait un effet de léger gonflement de la peau, en particulier du derme et, en conséquence, permettait d'obtenir différents résultats cosmétiques avantageux, tels que l'amélioration de la fermeté cutanée, la prévention des rides ou leur atténuation grâce à une diminution de leur profondeur, le lissage de la surface de la peau grâce à un effet tenseur sous-jacent.

Par ailleurs, l'amélioration de la synthèse des GAG contribue à améliorer l'hydratation de la peau.

De ce fait, l'invention concerne également selon une autre caractéristique essentielle un procédé de traitement cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, permettant de stimuler la synthèse de glycosaminoglycanes (GAG), en particulier la synthèse de l'acide hyaluronique, caractérisé en ce qu'il comprend l'application d'une quantité cosmétiquement ou pharmaceutiquement, notamment dermatologiquement, efficace d'un extrait de la plante *Eriobotrya japonica*, pour obtenir la stimulation de ladite synthèse, ledit extrait étant en particulier contenu dans un excipient cosmétiquement ou pharmaceutiquement, notamment dermatologiquement acceptable. Ainsi, l'invention permet d'améliorer la fermeté et la souplesse cutanée, de lutter contre la formation des rides ou d'en atténuer la profondeur, ou d'obtenir un lissage de la surface de la peau grâce à un effet tenseur ou pour améliorer l'hydratation de la peau.

L'invention concerne également tout procédé de traitement thérapeutique de la peau par lequel on cherche à stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes, en particulier de l'acide hyaluronique.

L'invention concerne également l'utilisation d'extraits d'*Eriobotrya japonica* pour la préparation de compositions pharmaceutiques, notamment dermatologiques, destinées à traiter les sujets souffrants d'une insuffisance de la synthèse de glycosaminoglycanes, en particulier de la synthèse de l'acide hyaluronique, pour corriger les effets négatifs de ladite insuffisance, en particulier pour améliorer la fermeté et la souplesse cutanée, pour lutter contre la formation des rides ou pour en atténuer la profondeur, ou pour obtenir un lissage de la surface de la peau grâce à un effet tenseur ou pour améliorer l'hydratation de la peau.

Ces extraits et compositions peuvent être mis en œuvre dans tout procédé de traitement cosmétique ou thérapeutique où l'on cherche à stimuler la synthèse des GAG. Ces procédés consistent à appliquer une quantité cosmétiquement respectivement pharmaceutiquement efficace dudit extrait ou de la composition les renfermant sur le tissu cutané à traiter pour obtenir la stimulation de ladite synthèse, ledit extrait se trouvant, le cas échéant, inclus dans un véhicule cosmétiquement, respectivement pharmaceutiquement acceptable.

Diverses formes de formulations peuvent être réalisées. Une des formes les plus utilisées est une forme topique adaptée pour être appliquée sur le tissu cutané incluant la peau et les muqueuses externes ou internes. Les formulations topiques appropriées incluent sans limitation, des émulsions, des crèmes, des laits, des baumes, des gels, des lotions, des ovules ainsi que des compositions de maquillage traitantes telles que mascaras, rouges à lèvres, ces différents types de formulations étant bien connus de l'homme de l'art.

Ces compositions contiennent de 0,001% à 10%, et de préférence 0,01% à 5%, en poids par rapport au poids total de ladite composition dudit extrait, ledit extrait étant de préférence incorporé dans un excipient cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.

Ces compositions pourront contenir en outre différents additifs, en particulier ceux choisis parmi le groupe consistant des rétinoïdes, des agents humectants ou hydratants, des vitamines, des céramides, des substances favorisant la synthèse du collagène et des acides aminés.

Selon ces variantes, le rétinoïde précité est choisi parmi l'acide rétinoïque et ses sels et esters, le rétinaldéhyde, et le rétinol et ses esters, tels que propionate, palmitate, acétate; l'agent humectant ou hydratant précité est choisi parmi le glycérol, un polyéthylène glycol et l'acide hyaluronique; la vitamine précitée est choisie parmi la vitamine A, la vitamine C et ses dérivés, en particulier ses sels sodiques ou de magnésium, la vitamine E, la vitamine PP, et les vitamines du groupe B en particulier B<sub>6</sub> et B<sub>12</sub>; la substance favorisant la synthèse du collagène est choisie parmi un extrait de centella asiatica, le madécassoside, l'acide madécassique, l'acide asiatique et l'asiaticoside; et l'acide aminé est choisi parmi la sérine, la thréonine, l'acide aspartique, la leucine, la lysine, la proline et l'hydroxyproline.

L'extrait d'*Eriobotrya japonica* pourra également avantageusement être associé dans les compositions de l'invention à un ou plusieurs des principes actifs suivants:

- un inhibiteur de hyaluronidase, tel qu'un extrait d'*Echinacea angustifolia*,
- un inhibiteur d'élastase, tel qu'un extrait de soja ou un extrait d'algue dénommée aosaïne,
- un sucre aminé, tel que la glucosamine ou la galactosamine,
- un activateur d'adénylate cyclase favorisant la synthèse de l'AMP<sub>c</sub>, tel que la forskoline, un extrait de *Coleus forskohlii* ou un extrait de *Téphrosia*,
- l'AMP<sub>c</sub> ou un extrait en contenant, tel qu'un extrait de *Taisoh*,
- un inhibiteur de phosphodiesterase s'opposant à la dégradation de l'AMP<sub>c</sub>, tel que la caféine ou la théophylline.

Enfin, selon un dernier aspect, la présente invention concerne également un procédé de traitement de cellules, en particulier de fibroblastes ou de kératinocytes, en culture, par une concentration efficace d'un extrait d'*Eriobotrya japonica* pour obtenir une stimulation de la synthèse des glycosaminoglycanes, en particulier de l'acide hyaluronique.

Ainsi, dans le cadre par exemple de la préparation de peau artificielle, en particulier de derme artificiel, par culture de cellules, selon les techniques bien connues de l'homme de l'art, on obtient grâce au procédé de l'invention une peau ou un derme artificiel de très bonne qualité, particulièrement en ce qui concerne les propriétés biomécaniques.

5 Suivant une variante préférée de mise en œuvre du procédé précité, on traite la culture de cellule avec un extrait d'Eriobotrya japonica à une concentration comprise entre 0,3 µg/ml et 30 µg/ml de milieu de culture.

10 Suivant une autre variante avantageuse, le milieu de culture comprend, en outre, une ou plusieurs parmi les substances suivantes: glucosamine, galactosamine, L-proline et 4-hydroxy-L-proline, lesdites substances pouvant être chacune présentes à une concentration comprise entre 2 et 10 mM, ou bien encore, le milieu de culture peut contenir de l'acide ascorbique ou l'un de ses dérivés à une concentration non-cytotoxique, en particulier comprise entre 0,001 mM et 0,5 mM.

15 D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent clairement à l'homme de l'art, également à partir de la description explicative qui va suivre faite en référence à plusieurs exemples de réalisation donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient en aucun cas limiter la portée de l'invention. Dans les exemples, les pourcentages sont indiqués en poids sauf indication contraire.

## EXEMPLES

### 20 I – Préparation d'extraits de parties aériennes d'Eriobotrya

#### Exemple 1

##### Préparation d'un extrait A

25 On met en contact, après broyage, 1 kg de feuilles de la plante avec 10 litres de méthanol à reflux. L'extrait est filtré. Le résidu de plante est alors réextrait deux fois selon le même procédé. Les filtrats sont réunis et concentrés jusqu'à l'obtention d'un extrait sec dénommé A.

#### 30 Exemple 2

##### Préparation d'un extrait B

35 On procède comme dans l'exemple 1, mais en utilisant comme solvant d'extraction un mélange eau-éthanol à 50/50 v/v.

#### Exemple 3

##### Préparation d'un extrait C

40 On réalise une phase d'extraction de la manière suivante. On met en contact, après broyage, 1 kg de feuilles de la plante avec 15 litres de méthanol. On porte ensuite à reflux pendant 30 minutes, puis on filtre. Le résidu est ensuite réextrait deux fois avec 15 litres de méthanol, comme à l'exemple 1.

45 On récupère les différents filtrats. On les concentre jusqu'au minimum de solubilité. Puis, on mélange le concentrat à 5 volumes d'acétone. On lave le précipité par de l'acétone jusqu'à disparition de la coloration visuelle. Le gâteau obtenu est ensuite mis en suspension dans l'eau jusqu'à obtention d'un lait homogène que l'on lyophilise. On prépare ainsi un lyophilisat dénommé extrait C.

#### Exemple 4

##### 50 Préparation d'un extrait D

55 On extrait 1 kg de feuilles sèches de la plante préalablement broyées par 15 à 20 l d'un mélange de 1,3-butylène glycol et d'eau à 50/50 en volume à 35°C pendant 1 h sous agitation. On récupère une suspension que l'on filtre pour récupérer un extrait dénommé D.

### II – Mise en évidence de l'activité de stimulation de la production des glycosaminoglycanes

#### Exemple 5

##### 60 Mise en évidence de l'activité de stimulation de la production des glycosaminoglycanes par les fibroblastes humains avec l'extrait de l'exemple 1

65 On décrit ci-dessous le test utilisé pour mettre en évidence une activité de stimulation de la production des GAG par des fibroblastes. Ce test in vitro est, par ailleurs, reconnu fiable et significatif pour l'homme du métier.

Protocole du test

Des fibroblastes provenant d'une plastie mammaire d'une femme de 49 ans sont préparés à partir du derme microdisséqué comme décrit par R. I. Freshney, Culture of animal cells; A manual of basic technique, A. R. Liss, New York, 1983, 104-106.

10 000 fibroblastes par puits de culture d'une boîte multipuits (6 puits par boîte) sont ensemencés 24 h à 37°C dans un milieu de culture E199 C (Gibco) contenant 10% de sérum de veau foetal.

Au bout de 24 h, le milieu est retiré et remplacé par 100 microlitres de milieu E199 C sans sérum et contenant le produit à tester solubilisé dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde) ou la même quantité de DMSO dans le cas des cultures «témoins» et 4 µCi de <sup>3</sup>H-glucosamine (réf. TRK 398 Amersham). On laisse incubé 48 h à 37°C. Puis, on prélève les surnageants, on les regroupe par 2 et on les transfère dans des tubes Eppendorf à vis. Dans chacun des tubes, on ajoute 200 µl d'une solution à 0,2 mg/ml de pronase (Sigma P5 147) dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) contenant 0,02% d'azote de sodium. On laisse agir une nuit à 37°C. La pronase est alors inactivée en plongeant les tubes 5 min dans de l'eau bouillante.

Après refroidissement à température ambiante, on coprécipite les GAG radiomarqués avec une solution aqueuse d'un mélange d'acide hyaluronique, de 20 dermatan sulfate, de chondroïtine sulfate 1/1/1, à 8 mg/ml, par 40 µl d'une solution à 100 mg/ml de CPC (cétyl pyridinium) (Sigma C 9002). On agite et on laisse incubé 30 min à température ambiante. On centrifuge le précipité, on aspire le surnageant et on récupère le culot avec 400 µl d'une solution de CPC à 10 mg/ml. On agite 5 min et on reprend le culot dans 500 µl de méthanol. On agite et on transfère dans des fioles à scintillation puis on ajoute 10 ml de liquide scintillant et on compte la radioactivité.

Parallèlement, la cytotoxicité du produit à tester est évaluée par un test au XTT (sel de tétrazolium) tel que décrit par Roehm N. W. et al. dans Journal of Immunological Methods 1991, 142, 257-265. Ce test mesure la viabilité cellulaire. Les résultats d'activité ne sont donnés que pour des concentrations ne modifiant pas la viabilité cellulaire.

Résultats:

	Taux de GAG exprimé en cpm	% d'activité	Significativité
Témoin	6977 ± 771		
2,5 µg/ml	11808 ± 647	+ 69	S
10 µg/ml	12764 ± 734	+ 83	S

Le tableau ci-dessus démontre de façon claire que l'extrait testé stimule la production des GAG totaux par des fibroblastes dermiques humains.

Exemple 6Mise en évidence de l'activité de stimulation de la production des glycosaminoglycanes par des fibroblastes humains sur un extrait commercial

On réalise un essai tel que décrit dans l'exemple 5 en utilisant un extrait commercial éthanol-eau 50-50 en volume de chez Maruzen (Japon).

Cet extrait a été testé en aveugle. Cet extrait a été lyophilisé, puis repris par du DMSO pour faire une solution mère à 10 mg/ml et a été testé sur la même souche de fibroblastes que celle utilisée dans l'exemple 5 dans les mêmes conditions. On a observé qu'une solution à 10 µg/ml stimule la synthèse des GAG de plus de 22,5% exprimé en cpm.

III Exemples d'applicationsExemple 7Crème cosmétique destinée à améliorer la fermeté de la peau:

extrait alcoolique C de feuilles d'Eriobotrya selon l'exemple 3	2 g
extrait de centella asiatica	0,5 g
excipient parfumé	qsp 100 g

Cette crème est utilisée en application topique sur le visage, le cou et le buste. Cette composition améliore également la souplesse de la peau.

Exemple 8Gel destiné à procurer un effet tenseur sur la peau:

5	extrait glycolique D de feuilles d'Eriobotrya japonica obtenu à l'exemple 4	3 g
	acide ascorbique sel de magnésium phosphate	1 g
	asiaticoside	0,1 g
	excipient gélifié parfumé avec conservateurs	qsp 100 g

10 Ce gel est utilisé en application locale sur le visage.

Exemple 9Lotion pour renforcer la tonicité du derme et diminuer la profondeur des rides:

15	extrait glycolique de feuilles d'Eriobotrya japonica obtenu selon l'exemple 4	0,8 g
	extrait de panax ginseng	0,2 g
	extrait de capsicum	0,01 g
20	excipient aqueux parfumé	qsp 100 g

Cette lotion est utilisée en brumisation, à titre préventif, après la toilette.

Exemple 10Crème anti-rides:

25	extrait glycolique de feuilles d'Eriobotrya japonica selon l'exemple 4	2 g
30	AMP <sub>c</sub>	0,05g
	extrait de Taisoh	1 g
	théophylline	0,1 g
	excipient émulsionné avec parfum et conservateurs	qsp 100 g

35 Cette crème, en application quotidienne, améliore la structure du derme et redonne à la peau sa fermeté et sa tonicité.

**Revendications**

40 1. Utilisation d'un extrait de la plante Eriobotrya japonica pouvant stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes (GAG) par les cellules de la peau  
 – dans une composition cosmétique,  
 – pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes pour corriger les effets négatifs de ladite insuffisance, ou  
 45 – pour le traitement de cellules en culture.

2. Utilisation d'un extrait de la plante Eriobotrya japonica selon la revendication 1 dans une composition cosmétique, dans laquelle l'extrait comme agent cosmétique est destiné à stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes (GAG), par les cellules de la peau, en particulier par les fibroblastes et/ou les kératinocytes, et en particulier destiné à stimuler la synthèse de l'acide hyaluronique par les kératinocytes, en vue de lutter contre la formation des rides ou d'en atténuer la profondeur, d'améliorer la fermeté et la souplesse cutanée, d'obtenir un lissage de la surface de la peau grâce à un effet tenseur, ou encore d'améliorer l'hydratation de la peau, ledit agent cosmétique étant incorporé dans un véhicule cosmétiquement acceptable.

55 3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'extrait de la plante Eriobotrya japonica est un extrait des parties de la plante Eriobotrya japonica, notamment de la feuille, de la fleur, de la tige, de l'écorce de tige ou de fruit.

4. Utilisation selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que ledit extrait est obtenu par extraction par un solvant polaire tel qu'un alcool tel que le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'isopropanol, le propylène glycol ou le butylène glycol ou un mélange de ces alcools ou un mélange hydro-alcoolique.

60 5. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que ladite composition contient de 0,001% à 10%, de préférence de 0,01 à 5% en poids dudit extrait par rapport au poids total de ladite composition, dans un excipient cosmétiquement acceptable.

65 6. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisée en ce que l'extrait d'Eriobotrya japonica est associé à un ou plusieurs des principes actifs suivants:

- un rétinoïde, en particulier l'acide rétinoïque, ou l'un de ses sels ou esters, le rétinaldéhyde, ou le rétinol, ou l'un de ses esters, tels que propionate, palmitate ou acétate,
- un agent humectant ou hydratant, en particulier le glycérol, un polyéthylène glycol ou l'acide hyaluronique,
- 5 - une vitamine en particulier la vitamine A, la vitamine C, ou l'un de ses dérivés, en particulier un sel de sodium ou de magnésium, la vitamine E, la vitamine PP, ou une vitamine du groupe B en particulier B<sub>6</sub> et B<sub>12</sub>,
- un céramide,
- une substance favorisant la synthèse du collagène en particulier un extrait de centella asiatica, le madécassoside, l'acide madécassique, l'acide asiatique ou l'asiaticoside,
- 10 - un acide aminé, en particulier la serine, la thréonine, l'acide aspartique, la leucine, la lysine, la proline et l'hydroxyproline,
- un inhibiteur d'hyaluronidase, en particulier un extrait d'Echinacea angustifolia,
- un inhibiteur d'élastase, en particulier un extrait de soja ou un extrait d'algue dénommée aosaïne,
- 15 - un sucre aminé, en particulier la glucosamine ou la galactosamine,
- un activateur d'adénylate cyclase favorisant la synthèse de l'AMP<sub>c</sub>, en particulier la forskoline, un extrait de Coleus forskholii ou un extrait de Téphrosia,
- l'AMP<sub>c</sub> ou un extrait en contenant, en particulier un extrait de Taisoli,
- un inhibiteur de phosphodiesterase s'opposant à la dégradation de l'AMP<sub>c</sub>, en particulier la caféine ou la théophylline.
- 20 7. Utilisation d'un extrait de la plante Eriobotrya japonica selon la revendication 1 pour la préparation de compositions pharmaceutiques, notamment dermatologiques, destinées à stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes, en particulier la synthèse de l'acide hyaluronique, pour corriger les effets négatifs de ladite insuffisance, en particulier pour améliorer la fermeté et la souplesse cutanée, pour lutter contre la formation des rides ou pour en atténuer la profondeur, ou pour obtenir un lissage de la surface de la peau grâce à un effet tenseur ou pour améliorer l'hydratation de la peau.
- 25 8. Utilisation d'un extrait de la plante Eriobotrya japonica selon la revendication 1 pour le traitement de cellules, en particulier de fibroblastes ou de kératinocytes en culture, pour obtenir une stimulation de la synthèse des glycosaminoglycanes, en particulier de l'acide hyaluronique, caractérisé en ce qu'il consiste à introduire dans le milieu de culture une concentration efficace d'un extrait d'Eriobotrya japonica pour obtenir la stimulation de ladite synthèse.
- 30 9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que lesdites cellules sont traitées par un extrait d'Eriobotrya japonica à une concentration comprise entre 0,3 µg/ml et 30 µg/ml de milieu de culture.
- 35 10. Utilisation selon la revendication 8 ou 9, caractérisée en ce qu'on ajoute au milieu de culture au moins une substance choisie dans le groupe constitué de la glucosamine, de la galactosamine, de la L-proline et de la 4-hydroxy-L-proline à une concentration comprise entre 2 et 10 mM ainsi que de l'acide ascorbique ou de ses dérivés à une concentration non-cytotoxique, en particulier à une concentration comprise entre 0,001 mM et 0,5 mM.
- 40 11. Utilisation selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisée en ce qu'on prépare une peau ou un derme artificiel.

45

50

55

60

65