

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 12.09.01.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 14.03.03 Bulletin 03/11.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : LABORATOIRES DE BIOLOGIE
VEGETALE YVES ROCHER Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : SANTIGNY GAELLE, PHILIPPE
ELODIE, LUBRANO CHRISTIAN et ROBIN JEAN
RENAUD.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : BREESE MAJEROWICZ SIMONNOT.

⑤④ UTILISATION D'UN EXTRAIT DE SHIITAKE DANS DES COMPOSITIONS COSMETIQUES POUR LE SOIN DE
LA PEAU.

⑤⑦ La présente invention concerne l'utilisation dans une
composition cosmétique ou pour la fabrication d'une com-
position cosmétique d'un extrait lipidique de shitakée conte-
nant de l'ergostérol pour renforcer la fonction barrière de la
peau. Avantageusement l'extrait de shiitaké contient de 3 à
50%, de préférence de 15 à 25% et tout préférentiellement
de l'ordre de 20% en poids d'ergostérol.

FR 2 829 390 - A1



UTILISATION D'UN EXTRAIT DE SHIITAKÉ DANS DES
COMPOSITIONS COSMÉTIQUES POUR LE SOIN DE LA PEAU.

La présente invention concerne l'utilisation
dans une composition cosmétique ou par la préparation de
celle-ci, d'une quantité efficace d'un extrait de shiitaké
contenant de l'ergostérol pour renforcer la fonction
barrière cutanée de la peau.

D'une manière générale, peu d'actifs ont été
décrits comme agissant d'une part sur la prolifération et
d'autre part sur la différenciation des kératinocytes
humains normaux. En effet, ces actifs sont :

- soit inducteurs de la prolifération
cellulaire, et favorisent alors l'expression de marqueurs
de prolifération au niveau de l'épiderme ou la synthèse
d'ADN,

- soit inducteurs de la différenciation
cellulaire, et favorisent alors l'expression de marqueurs
de différenciation.

Ainsi, jusqu'à présent, les actifs cosmétiques
anti-âge revendiquent un effet sur l'augmentation du
renouvellement cellulaire et un épaissement épidermique
grâce à la présence d'actifs inducteurs de prolifération.
C'est le cas des AHAs qui en induisant une desquamation
mécanique de surface entraînent une augmentation du
renouvellement cellulaire de l'épiderme. Les rétinoïdes,
largement utilisés en tant qu'actifs anti-âge, sont
également connus pour leur efficacité sur l'augmentation du
pouvoir prolifératif des cellules.

En agissant sur la prolifération des
kératinocytes, ces actifs produisent un déséquilibre
homéostatique de l'épiderme qui s'exerce au détriment d'une
fonction barrière de la peau qui est altérée. Cela se
traduit par une diminution de la fonction barrière de la
peau pouvant entraîner des réactions irritatives.

Ainsi aujourd'hui, les AHAs connaissent beaucoup moins de succès du fait de leur action irritative sur la peau. La famille des rétinoïdes quant à elle connaît des limites dans son utilisation en cosmétique du fait des effets secondaires tératogènes bien connus de ces molécules.

Il est connu de la demande de brevet français No. 9711655, qu'un extrait de shiitaké contenant de l'ergostérol est capable d'agir sur l'augmentation de la prolifération de kératinocytes en culture. Plus particulièrement, cet extrait agit sur le renouvellement des cellules épidermiques par augmentation de leur activité mitotique, aboutissant à un épaississement de l'épiderme. Le shiitaké, aussi désigné sous le nom de *Lentinus enodes*, est un champignon d'origine asiatique connu pour ses propriétés médicinales et alimentaires, dont une fraction lipidique s'est révélée riche en ergostérol.

La Demanderesse a maintenant mis en évidence qu'un extrait de shiitaké contenant de l'ergostérol est capable de stimuler l'expression de marqueurs de différenciation et trouve ainsi une nouvelle utilité cosmétique pour renforcer la fonction barrière de la peau.

Ainsi, cet actif déjà connu pour stimuler la prolifération des kératinocytes de l'épiderme et donc augmenter le renouvellement cellulaire, permet également de façon inattendue de maintenir une barrière cutanée qui aurait tendance à être altérée au cours du vieillissement.

Un actif possédant cette double activité est profitable à la peau, car il lui procure une apparence plus jeune avec une diminution des rides tout en lui assurant une hydratation et une protection vis-à-vis d'agents extérieurs.

Peu d'actif offre cette double activité. On peut cependant citer le tricholine citrate dont on a rapporté l'efficacité pour stimuler la croissance de kératinocytes et la synthèse de phospholipides dans ces cellules.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation dans une composition cosmétique ou pour la fabrication d'une composition cosmétique d'un extrait lipidique de végétal, de levure ou de champignon contenant de l'ergostérol pour renforcer la fonction barrière de la peau. L'invention concerne tout spécialement un extrait de shiitaké.

Un tel extrait est donc remarquable car non seulement il favorise la prolifération des cellules épidermiques (renouvellement épidermique) mais en outre il montre en plus une activité pro-différenciante (renfort de la fonction barrière de la peau). Ces deux activités ont été démontrés grâce à des tests sur cellules et sur un modèle de peau :

- L'augmentation de la prolifération des cellules épidermiques est mise en évidence sur des cellules épidermiques cultivées pendant 6 jours et révélée par un test au MTT d'une part. Par ailleurs, cette activité est vérifiée sur un second protocole dans lequel les cellules épidermiques sont comptées après 48H de culture.

- La mise en évidence d'une activité pro différenciante est évaluée par comptage des enveloppes cornées formées après 48H de culture cellulaire ainsi que par dosage d'un marqueur de différenciation kératinocytaire, la transglutaminase membranaire après 5 jours de culture cellulaire.

- Ces résultats sont confirmés sur un modèle de peau reconstruite "Skinetic" dans lequel est étudié l'effet de l'extrait sur l'expression de gènes codant pour des

protéines d'intérêt potentiel en physiologie cutanée telles que des protéines marqueurs d'un état prolifératif et des protéines marqueurs d'un état pro différenciant.

5 L'extrait lipidique de shiitaké utilisé dans les compositions cosmétiques de l'invention peut être obtenu à partir de champignon broyé par exemple dans une installation de type supercritique en présence de CO₂,
comme décrit dans le brevet français No. 9711655. Après
10 extraction, la concentration en ergostérol peut être ajustée, et l'on préfère pour l'utilisation selon l'invention, un extrait de shiitaké contenant de 3 à 50%, de préférence de 15 à 25% et tout préférentiellement de l'ordre de 20% en poids d'ergostérol. Un extrait de
15 shiitaké selon l'invention comprend de préférence les composés suivants, dont les quantités sont exprimées en poids par rapport au poids de l'extrait :

- ergostérol : 3 à 50%
- triglycérides : 5 à 95 %
- 20 - acides gras libres : 0 à 30%
- tocophérol : 0,1 à 2%
- Eau : 1 à 30 %

Un exemple d'extrait de shiitaké selon l'invention comprend :

- 25 - 22 % d'ergostérol
- 40 % de triglycérides
- 25 % d'eau
- 15 % acides gras libres
- 0,5 % de tocophérol

30 Un tel extrait lipidique de shiitaké comprenant de l'ordre de 20% d'ergostérol n'a jamais encore été décrit dans l'art antérieur. Cet extrait peut être obtenu par extraction au CO₂ supercritique à partir de champignon broyé dans les conditions suivantes :

- 35 - dioxyde de carbone supercritique pur

- pression = 500 bar
- température = 50 °C
- flux de gaz = 30 kg de CO₂ par kg de matière première.

5 L'invention a donc aussi pour objet un extrait de shiitaké comprenant de l'ordre de 20% en poids d'ergostérol ainsi que les compositions, notamment cosmétique, le contenant.

10 La composition cosmétique selon l'invention comprend une quantité efficace de l'extrait lipidique contenant de l'ergostérol pour renforcer la fonction barrière de la peau. Cette quantité représente de 0,001 à 1 % du poids total de la composition et de préférence de 0,005 à 0,01 du poids total de la composition.

15 La composition cosmétique selon l'invention peut comprendre d'autres actifs comme par exemple à titre non limitatif : des agents antiradicalaires tels que des extraits de plantes riches en flavonoïdes ou des
20 flavonoïdes purs, des extraits de plantes riches en nutriments et oligoéléments favorisant la croissance des cellules cutanées.

La composition comprend aussi un ou plusieurs agents de formulation, comme des antioxydants, des
25 surfactants, des conservateurs, des huiles, des glycols, des parfums etc.

Une composition selon l'invention peut se présenter sous toute forme connue de l'homme du métier dans le domaine de la cosmétique, comme par exemple, une crème,
30 un lait, une lotion, un gel, un masque, sans aucune restriction galénique particulière autre que celles pour l'application sur la peau.

D'autres avantages et caractéristiques de
35 l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent concernant la préparation et l'activité de

l'extrait de shiitaké selon l'invention, et où il sera fait référence aux dessins en annexe dans lesquels :

- La figure 1 représente la prolifération des kératinocytes humains normaux en présence de l'extrait de shiitaké à 20% d'ergostérol.

- La figure 2 représente le gain de croissance de kératinocytes par rapport au témoin négatif après 6 jours de culture

- La figure 3 représente l'effet du shiitaké à 20% d'ergostérol sur la prolifération cellulaire après 48H de culture.

- La figure 4 représente l'effet du shiitaké à 20% d'ergostérol sur la cornification cellulaire 48H de culture.

- La figure 5 représente l'effet du shiitaké à 20% d'ergostérol sur la prolifération cellulaire après 5 jours de culture.

- La figure 6 représente l'effet du shiitaké à 20% d'ergostérol sur l'expression de la transglutaminase après 5 jours de culture.

EXEMPLE 1 : Préparation de l'extrait de shiitaké à 20% d'ergostérol.

Comme indiqué précédemment, l'extrait lipidique de shiitaké est préparé à partir de champignon broyé dans une installation de type supercritique en présence de CO₂. Après extraction, la concentration en ergostérol peut être ajustée, idéalement à la teneur de 20% environ .

1) Conditions d'extraction :

- dioxyde de carbone supercritique pur
- pression = 500 bar
- température = 50 °C
- flux de gaz = 30 kg de CO₂ par kg de matière

première.

2) Séparation en deux étages afin de séparer un maximum de la partie huileuse :

120 et 60 bar/30 °C

5 3) Séparation de l'eau :

- par décantation
- centrifugation
- distillation sous vide

10 Obtention d'un extrait contenant entre 35 et 45 % d'ergostérol et moins de 3 % d'eau.

La présence d'eau est possible et l'extrait présente alors un aspect émulsionné

15 4) Composition de l'extrait :

- ergostérol : 3 à 50%
- triglycérides : 5 à 95 %
- acides gras libres : 0 à 30%
- tocophérol : 0,1 à 2%
- 1 à 30 %

20 Présence de composés aromatiques et colorants quantitativement non déterminés

5) Caractérisation des classes de composés présents dans l'extrait de champignon :

25 La chromatographie en couche mince permet d'obtenir un profil de composition global. CCM des différentes classes de lipides :

- Phase mobile : hexane/ether ethylique / acide acétique (80/20/1) .

30 - Plaque CCM : Si 60 0,25mm.

- Réactif de révelation : Acide phosphomolybdique à 5 % dans l'éthanol.

- Bien saturer la cuve.

35 - 0,1 g d'extrait sont mis en suspension dans 1 ml d'hexane.

- Dépôt 10 à 20 µl sur 1,5 cm. Faire migrer sur 16 -17 cm

- Pulvériser le réactif après séchage et chauffer à 110-120°C jusqu'à apparition optimale des taches.

- Résultats :

. Caroténoïdes, Rf=1

. Triglycérides -tocophérols : 0,60 env

. Acides gras libres : 0,22

10 . Alcools triterpéniques : 0,12

. Stérols : 0,07

. Xanthophylles : 0

15 6) Calcul du pourcentage des fractions relatives :

- % d'acides gras libres calculé à partir de l'indice d'acide (selon Norme AFNOR T60-204).

- % H₂O: méthode Karl fischer selon norme NF T 60-225.

20

7) Pourcentage de tocophérols : Méthode HPLC :

L'insaponifiable est isolé selon la norme NF T60-205-1. Celui ci est repris dans 100 ml de chloroforme pour analyse HPLC. Conditions chromatographiques :

25 - Phase mobile méthanol /acétonitrile/eau (60/37/3).

- Débit phase mobile : 1ml/min.

- Colonne lichrospher RP 18 5µm.

- Detection UV : 290 nm.

30 - Témoins : utiliser des standards des isomères α,β,δ. Diluer Mg de chaque isomère dans 100 ml de chloroforme.

Temps de rétention approximatifs :

Tr alpha tocophérol : 17 min env.

35 Tr bêta tocophérol : 19 min env.

Tr gamma tocophérol : 22 min env.

S = surface du pic de chaque tocophérol isomère témoin.

S1= surface du pic de chaque tocophérol isomère inconnu.

% de chaque tocophérol isomère dans l'insaponifiable: $S1/S * m/M$

La teneur en Triglycérides est calculée par déduction approximative

8) Composition de l'extrait utilisé dans les exemples d'évaluation ci-après :

- 22 % d'ergostérol
- 40 % de triglycérides
- 25 % d'eau
- 15 % acides gras libres
- 0,5 % de tocophérol

EXEMPLE 2 : Détermination de l'effet de l'extrait de shiitaké à 20% en ergostérol sur la prolifération de cellules épidermiques cultivées pendant 6 jours.

Les cellules utilisées dans les exemples 2 à 4 sont des kératinocytes humain néonataux achetés à la société Biowhittaker. Ils sont cultivés en milieu défini (Biowhittaker) de la décongélation jusqu'à la fin du test. Pour permettre la croissance cellulaire, ce milieu de base à 0,15 mM de calcium est supplémenté avec Hydrocortisone (0,5 µg/ml), Insuline (5 µg/ml), EGF (10 ng/ml), Extrait Pituitaire Bovin (30 mg/ml), Pénicilline-streptomycine (100 µg/ml) et Fungizone (0,5 µg/ml).

1) Protocole.

- Culture cellulaire.

A pré confluence, les kératinocytes sont trypsinés puis ensemencés en plaques 24 puits, à raison de

15 000 cellules/puit.dans le milieu de culture ci-dessus
auquel on a ôté l'EGF.

Après 24H de culture, les cellules sont traités
avec l'extrait de shiitaké (1.5ng/ml).(J0)

5 En parallèle sont testés un témoin négatif
interne (milieu e culture sans EGF) et un témoin interne
positif (milieu de culture + 5 ng/ml d'EGF).

- Evaluation de la prolifération cellulaire.

10 La prolifération des kératinocytes est évaluée
à J1, J2, J3 et J6 après traitement par quantification de
l'activité métabolique des cellules (déshydrogénases
mitochondriales) par mesure d'hydrolyse du MTT.

2) Résultats.

15 Les résultats concernant l'effet du shiitaké
20% sur la prolifération cellulaire pendant 6 jours sont
représentés sur le graphe de la figure 1 en annexe. Les
gains de croissance cellulaire obtenus après 6 jours de
culture apparaissent sur l'histogramme de la figure 2 en
20 annexe.

Pendant 6 jours de culture cellulaire,
l'extrait de shiitaké entraîne une augmentation progressive
et continue de la prolifération des kératinocytes. Après 6
jours de culture, l'extrait de shiitaké augmente de 28% la
25 croissance des cellules par rapport au témoin de base.

L'ergostérol (Sigma E6510) testé à même
quantité que celle présente dans l'extrait de shiitaké
augmente de 43% la croissance des cellules par rapport au
témoin de base (non montré).

30

EXEMPLE 3 : Détermination de l'effet de
l'extrait de Shitaké à 20% en ergostérol sur la
prolifération et la différenciation cellulaire : Evaluation
par comptage cellulaire et dosage des enveloppes cornées.

Les enveloppes cornées sont des structures qui apparaissent très tardivement au cours du phénomène de différenciation et qui participent à l'effet barrière de la couche cornée. C'est cette propriété qui est mise en évidence dans ce test.

1) Protocole.

- Culture cellulaire.

Lorsque les cellules ont atteint la pré confluence, une trypsination est réalisée et les cellules sontensemencées en plaque 12 puits, à raison de 12 200 cellules/puit.

A pré confluence, les cellules sont mises en contact avec l'extrait de Shitaké à 20% en ergostérol à la concentration de 1,5 ng/ml dans le milieu de culture. Deux références internes sont intégrées au test: un témoin de base (cellules maintenue dans le milieu de prolifération à 0,15 mM de calcium) et un témoin positif de différenciation (cellules cultivées dans un milieu induisant la différenciation contenant 1,5 mM de calcium et 1 mM de butyrate de sodium).

- Comptage des cellules épidermiques.

Après 48 heures de traitement, les cellules contenues dans chaque puit sont récupérées par trypsination. Afin d'évaluer la prolifération cellulaire, les cellules sont diluées au demi dans du bleu trypan, un colorant qui pénètre dans les cellules mortes, et les cellules vivantes sont comptées sur cellule de Malassez.

- Comptage des enveloppes cornées à partir des cellules épidermiques différenciées.

Pour mettre en évidence la différenciation cellulaire, les culots cellulaires sont soumis à un traitement drastique à base de Dithiothreitol (20 mM) et de Sodium Dodecyl Sulfate (1% en PBS) et sont placés à 90°C pendant 10 minutes. Après traitement, les enveloppes

cornées, très résistantes, peuvent alors être comptées sur cellule de Malassez.

2) Résultats.

5 Les résultats concernant l'effet du Shitaké 20% en ergostérol sur la prolifération sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous et dans le graphe de la figure 3 en annexe.

10 Les résultats concernant l'effet du Shitaké 20% en ergostérol sur la différenciation sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous et dans le graphe 2 de la figure 4 en annexe. Chaque essai a été répété trois fois.

Tableau 1

Nombre de cellules	Témoin de base	Shitaké 20%	Témoin de différenciation
Essai 1	620 000	690 000	530 000
Essai 2	680 000	850 000	440 000
Essai 3	580 000	720 000	480 000
Moyenne	626 667	753 334	483 334
Ecart-type	41 096	69 442	36 817
Gain de croissance	100 %	120,21%	77,13%

15

Tableau 2

Nombre d'enveloppes cornées/100 cellules	Témoin de base	Shitaké 20%	Contrôle positif de différenciation
Essai 1	0,16129	0,07246	0,37736
Essai 2	0,07353	0,23529	0,795454
Essai 3	0,08620	0,347222	0,8334
Moyenne	0,1064	0,22123	0,6551
Ecart-type	0,0387	0,1128	0,20666
Gain de différenciation/ Témoin	0%	107,96%	515,86%

Le nombre d'enveloppes cornées comptées est ramené au nombre de cellules afin d'obtenir un nombre d'enveloppes cornées pour 100 cellules également appelé pourcentage de cornification.

5 Dans les résultats indiqués ci-dessous, le témoin de base est considéré comme induisant 100% de prolifération et 0% de cornification. En effet, ce témoin de base correspond au milieu de culture optimal pour induire la prolifération mais les facteurs nécessaires à
10 l'induction d'une différenciation cellulaire ne sont pas présents dans ce milieu de culture.

Après 48 heures de traitement, l'extrait de Shitaké montre une stimulation de la prolifération des
15 kératinocytes. En effet, testé à la concentration de 1,5 ng/ml, le Shitaké permet un gain de croissance de 20% par rapport au témoin de base.

Les résultats obtenus par cette technique montrent que le Shiitaké agit de façon relativement importante sur la formation des enveloppes cornées. Cela se
20 traduit par une augmentation de 107% de la cornification par rapport au contrôle négatif (0%).

L'ergostérol (Sigma E6510) testé en parallèle (non montré) semble agir sur la prolifération des
25 kératinocytes mais ne semble pas intervenir sur leur différenciation.

EXEMPLE 4 : Détermination de l'effet de l'extrait de Shitaké à 20% en ergostérol sur la prolifération et la différenciation cellulaire : évaluation
30 par un test MTT et un test Elisa-Transglutaminase.

Au cours de la différenciation, une enzyme intervient dans la formation des enveloppes cornées, la transglutaminase 1. Cette enzyme qui est un marqueur tardif de différenciation permet d'évaluer le degré de

différenciation des cellules dans les différentes conditions de cultures réalisées.

1) Protocole.

5 - Culture cellulaire.

Lorsque les cellules ont atteint la pré confluence, une trypsination est réalisée et les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits, à raison de 6000 cellules/puit (J0). Les traitements des cultures cellulaires (actifs, témoins de base et de différenciation) sont effectués à J3 et à J5. Le Shiitaké est testé sur ce modèle à la concentration de 1,5 ng/ml.

 - Test MTT.

15 Ce test permet d'évaluer la prolifération cellulaire à travers l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate deshydrogénase. Dans notre protocole, ce test est réalisé après 6 jours de culture. Les cellules sont alors mises en contact avec une solution de MTT à 1mg/ml dans du DMEM pendant 3 heure à 37°C. Puis 2 cycles de congélation/décongélation sont réalisés et les cristaux formés par le MTT sont ensuite dissout dans un mélange éthanol-acétone (60/40 p/p). La coloration ainsi obtenue est lue 540 nm en enlevant le bruit de fond à 650 nm.

25 - Test Elisa-transglutaminase.

Le niveau d'expression cellulaire de la transglutaminase 1 est évalué en utilisant un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre cette protéine (Tebu, Harbor Bio-products). La fixation de cet anticorps est révélée par un second anticorps, le reconnaissant et couplé à une enzyme, la peroxydase (Beckman Coulter, Jackson ImmunoResearch).

35 Les réactions de fixation aspécifique des plaques sont tout d'abord bloquées avec une solution de PBS-BSA 4% pendant 1 heure à 37°C. Puis les cellules sont

incubées avec le premier anticorps au 1/2000^{ième} pendant 1 heure à 37°C. Après trois rinçages au PBS-tween 0,05%, les cellules sont incubées avec le second anticorps au 1/5000^{ième} pendant 1 heure à 37°C. Trois rinçages au PBS-tween 0,05% sont à nouveau effectués puis les cellules sont mises en contact pendant 30 min à l'obscurité avec le substrat de la peroxydase : l'O-phenylenediamine. La réaction colorimétrique est stabilisée avec une solution d'acide sulfurique 2N. La lecture des plaques est effectuée à 490 nm (une contre-lecture est effectuée à 650 nm afin d'éliminer les bruits de fond).

2) Résultats.

Les résultats concernant l'effet du Shitaké 20% en ergostérol sur la prolifération cellulaire sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous dans le graphe de la figure 5 en annexe. Les résultats concernant l'effet du Shitaké 20% en ergostérol sur la différenciation cellulaire sont présentés dans le tableau 4 ci-dessous et dans le graphe de la figure 6 en annexe.

Un coefficient de différenciation CD est calculé en divisant les résultats de Densité Optique obtenus par le test Elisa par ceux obtenus avec le test MTT.

Dans les résultats indiqués ci-dessous, le témoin de base est considéré comme induisant 100% de prolifération et 0% de cornification. En effet, ce témoin de base correspond au milieu de culture optimal pour induire la prolifération mais les facteurs nécessaires à l'induction d'une différenciation cellulaire ne sont pas présents dans ce milieu de culture.

Tableau 3

DO	Témoin de base	Shitaké 20%	Témoin de différenciation
Essai 1	0,65098	0,80804	0,37747
Essai 2	0,74613	*	0,42925
Essai 3	0,5913	0,92305	0,23941
Essai 4	0,7115	0,65775	0,51967
Moyenne	0,675	0,79628	0,39144
Ecart-type	0,06823	0,08133	0,11716
Gain de croissance	100%	118%	58%

• Résultat non représentatif

Tableau 4

DO Elisa/DO MTT	Témoin de base	Shitaké 20%	Témoin positif de différenciation
Essai 1	0,054754	0,091	0,19223
Essai 2	0,08414	0,153	0,4272
Essai 3	0,02374	0,146	*
Essai 4	0,083782	0,26582	0,438388
Moyenne	0,0616	0,1639	0,3505
Ecart-type	0,02875	0,07339	0,1373
Gain de différenciation/ Témoin	0%	166%	468%

* Résultat non représentatif

Au vu des résultats, il apparaît que le Shitaké stimule la prolifération des kératinocytes. En effet, pour les puits traités, on observe une augmentation de prolifération de 18% par rapport au témoin de base.

Le Shitaké agit de façon relativement importante sur l'expression de la transglutaminase. Cela se traduit par une augmentation de 166% de l'expression de cette enzyme par rapport au contrôle négatif (0%).

EXEMPLE 5 : EFFET DU SHIITAKÉ 20% ERGOSTEROL SUR L'EXPRESSION DE GÈNES CODANT DES PROTÉINES STRUCTURALES ET RÉGULATRICES.

1) Protocole.

Dans cet exemple, la technique des "cDNA macroarrays" est utilisée pour étudier les effets du Shiitaké 20% sur l'expression des gènes codant pour 475 protéines structurales et régulatrices dont les protéines marqueurs d'un état prolifératif et les protéines représentées dans la différenciation kératinocytaire.

Le modèle utilisé ici pour l'étude est un modèle d'épiderme reconstruit (SkinEthic) mis en contact ou pas avec le shiitaké 20% pendant une durée de 18H.

On regarde alors l'expression des gènes significativement réprimés ou surexprimés en présence de l'actif par rapport au contrôle.

La méthodologie utilisée est celle recommandée par Clontech (Palo Alto, USA) sauf l'extraction/purification de l'ARN total (protocole au Tri-Reagent, Sigma).

2) Résultat.

Parmi tous les résultats obtenus, l'étude a montré dans ce modèle d'épiderme reconstruit en contact avec l'actif :

- Une surexpression des gènes codant pour la calgranuline A.

- Une surexpression moins significative des gènes codant pour la calgranuline B.

Ces 2 protéines sont représentatives d'un état prolifératif de l'épiderme.

- Une surexpression des gènes codant pour la kératine K1, marqueur tardif de différenciation kératinocytaire.

- Une surexpression moins significative des gènes codant pour la transglutaminase 1, marqueur de différenciation.

Les résultats obtenus permettent de confirmer au niveau génétique sur un modèle d'épiderme reconstruit, les résultats décrits dans les exemples 2, 3 et 4 au niveau cellulaire sur des cultures de kératinocytes.

5 Si l'on compare les résultats obtenus dans ce modèle d'étude avec ceux obtenus dans ce même modèle en présence d'acide rétinoïque (10^{-6} M), on peut constater :

10 - Un effet pro-prolifératif en présence du shiitaké mais moindre que celui décrit en présence d'acide rétinoïque.

15 - Un effet pro-différenciant important en présence de shiitaké alors que le résultat inverse est décrit en ce qui concerne l'acide rétinoïque (diminution de l'expression de marqueurs de différenciations kératinocytaires).

EXEMPLE 6 : FORMULES INCLUANT L'EXTRAIT CO₂ DE SHIITAKÉ À ENVIRON 20% D'ERGOSTEROL.

20 1) Exemple de composition sous forme d'émulsion

Eau	QSP
Extrait CO ₂ de Shiitake à env.20%d'ergostérol	0,001% à 0,1%
Mélange de Conservateurs	1,5%
Propylèneglycol	5,00%
Gomme xanthane	0,30%
Copolymère acrylique/acrylate	0,50%
Acide stéarique 100 OE**	3,00%
Stéarate de sorbitan	2,00%
Sorbitan laurate 20 OE	3,00%
Alcool Cétylestéarique	1,50%
Cire d'abeille	1,00%
Huile de germe de blé	5,00%
Diméthicone	2,00%
Cyclométhicone	5,00%
Gel de polyacrylamide	2,00%

Parfum 0,10%

** acide stéarique avec 100 moles d'OE

2) Exemple de composition sous forme de crème

Eau	QSP
Extrait CO ₂ de Shiitake à env.20%d'ergostérol	0,001% à 0,1%
Gomme xanthane	0,30%
Séquestrant (par ex. EDTA)	0,05%
Conservateurs	1,50%
Acide C18	2,50%
Acide C16	2,50%
Trilaurine	1,00%
Beurre de Karité	3,00%
Acétate de topophérol	0,05%
β-bisabolol	0,05%
Huile végétale (germe de blé)	5,00%
Diméthéticone	3,00%
Acide polyacrilique	0,30%
TEA (Triéthanolamine)	1,50%
Parfum	0,10%

3) Exemple de composition sous forme de lotion

Extrait CO ₂ de Shiitake à env.20%d'ergostérol	0,001 à 0,1%
Eau	QSP
Agent séquestrant	0,05%
Propylèneglycol	2,00%
Mélange Conservateurs	1,5%
Alcool	5 à 50%
Alcool oléique 20 OE	1,00%
Parfum	0,05%

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bittiner B., Bleehen S.S. and Macneil S.
1991. $1\alpha, 25$ (OH) D_3 vitamin D_3 increases intracellular
5 calcium in human keratinocytes. *British Journal of*
Dermatology. 124, 230-235.

- Denning M.F., Guy S.G., Ellerbroek S.M.,
Norvell S.M., Kowalczyk A.P. and Green K.J. 1998. The
expression of desmoglein isoforms in cultured human
10 keratinocytes is regulated by calcium, serum and protein
kinase C. *Experimental cell research*. 239, 50-59.

- Iwatsuki K. Harada H., Zhang J.Z., Maruyama
K. and Kaneko F. 1994. Regulation of pemphigus and
desmosomal antigen expression by keratinocyte
15 differentiation. *Dermatology*. 189, 67-71.

- Lubrano C., Poirier F. et Robin J. R.1997:
Nouvelle utilisation de l'ergostérol et de ses composés
apparentés, en cosmétique. *Brevet n° 97 11655*.

- Michel S. 1995. Transglutaminases et
protéines précurseurs de l'enveloppe cornée. *Biologie de la*
20 *peau*. 25-32.

- Michel S., Courseaux A., Miquel C., Bernardon
J.M., Schmidt R., Shroot B., Thacher S.M. and Reichert U.
1991. Determination of retinoid activity by an enzyme-
25 linked immunosorbent assay. *Anal. Biochem*. 192, 232-236.

- Saintigny G., Schmidt R., Shroot B., Juhlin
L., Reichert U. and Michel S. 1992. Differential expression
of calgranulin A and B in various epithelial cell lines and
reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol*. 99, 639-644.

30
- Swendsen M.L., Daneels G., Geysen J.,
Binderup L. and Kragballe K. 1997. Proliferation and
differentiation of cultured human keratinocytes is
modulated by $1,25$ (OH) D_3 and synthetic vitamin D_3

analogues in a cell density-, calcium- and serum-dependent manner. *Pharmacology & Toxicology*. 80, 49-56.

REVENDEICATIONS

1) Utilisation dans une composition cosmétique ou pour la fabrication d'une composition cosmétique d'un extrait lipidique de végétal, de levure ou de champignon contenant de l'ergostérol pour renforcer la fonction barrière de la peau.

2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrait lipidique de champignon contenant de l'ergostérol est un extrait de shitakée.

3) Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'extrait de shiitaké contient de 3 à 50%, de préférence de 15 à 25% et tout préférentiellement de l'ordre de 20% en poids d'ergostérol.

4) Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'extrait de shiitaké comprend les composés suivants, dont les quantités sont exprimées en poids par rapport au poids de l'extrait :

- ergostérol : 3 à 50%
- triglycérides : 5 à 95 %
- acides gras libres : 0 à 30%
- tocophérol : 0,1 à 2%
- Eau : 1 à 30 %

5) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'extrait de shiitaké comprend les composés suivants, dont les quantités sont exprimées en poids par rapport au poids de l'extrait :

- 22 % d'ergostérol
- 40 % de triglycérides
- 25 % d'eau
- 15 % acides gras libres

- 0,5 % de tocophérol

5 6) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que dans la composition cosmétique l'extrait lipidique contenant de l'ergostérol représente de 0,001 à 1% du poids total de la composition et de préférence de 0,05 à 0,1 du poids total de la composition.

10 7) Un extrait de shiitaké caractérisé en ce qu'il contient de l'ordre de 20% en poids d'ergostérol.

15 8) Un extrait de shiitaké selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend les composés suivants, dont les quantités sont exprimées en poids par rapport au poids de l'extrait :

- 22 % d'ergostérol
- 40 % de triglycérides
- 25 % d'eau
- 20 - 15 % acides gras libres
- 0,5 % de tocophérol

9) Une composition cosmétique comprenant un extrait de shiitaké selon l'une des revendications 7 ou 8.

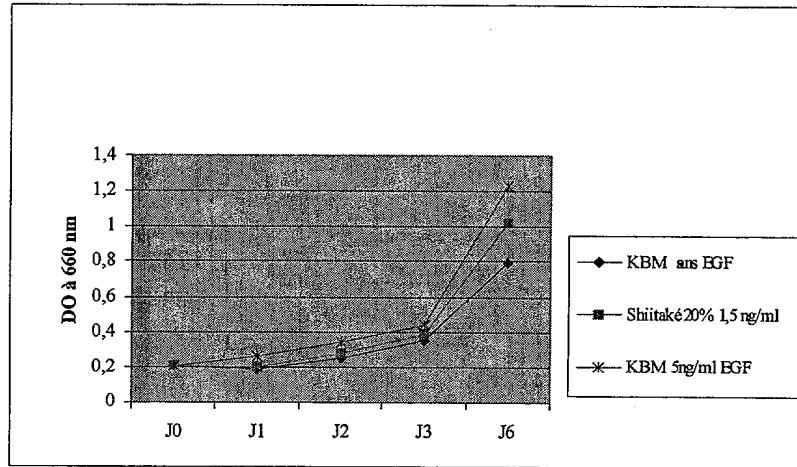
Figure 1

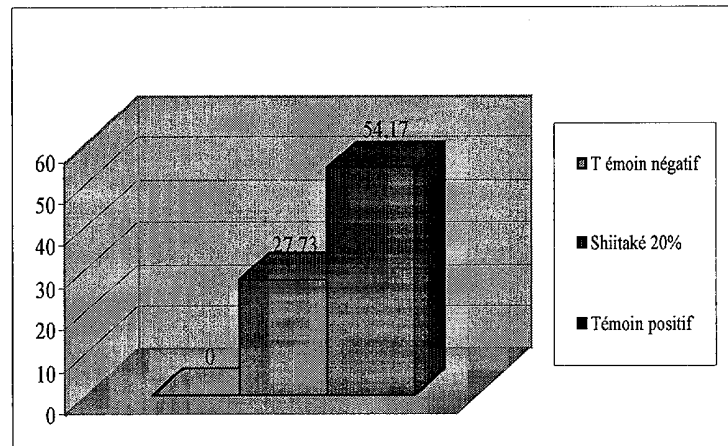
Figure 2

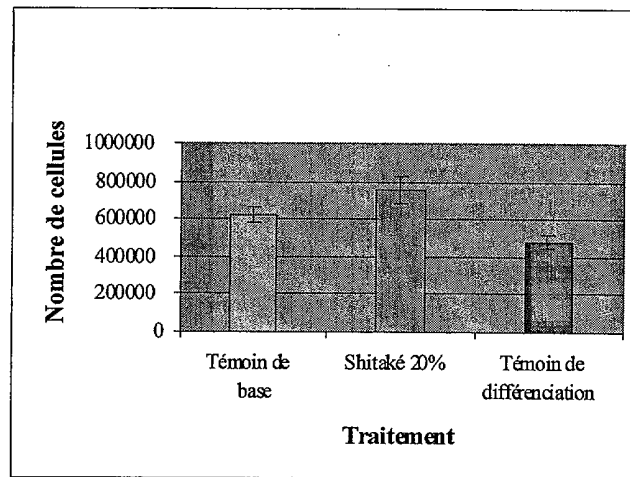
Figure 3

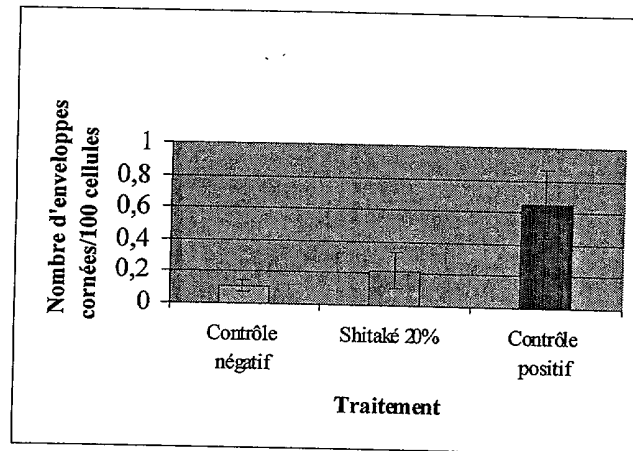
Figure 4

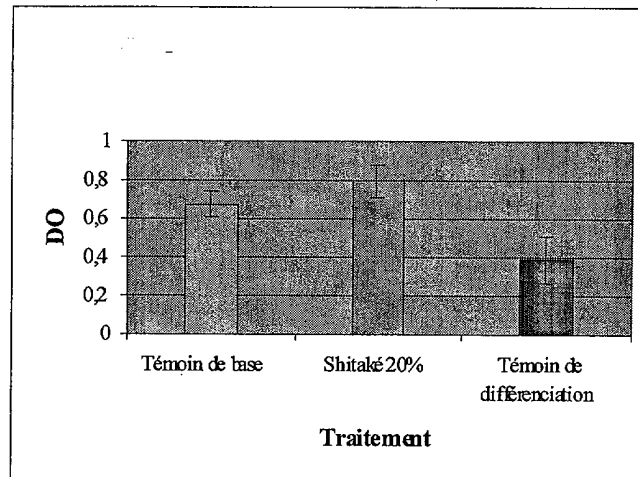
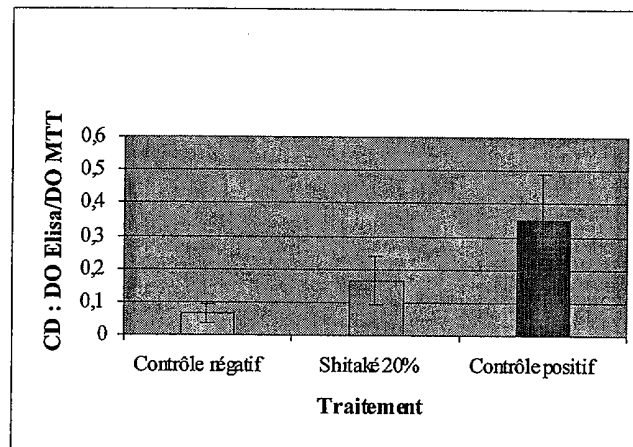
Figure 5

Figure 6



RAPPORT DE RECHERCHE 2829390

PRÉLIMINAIRE PARTIEL

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

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 609321
FR 0111803

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X,D	FR 2 768 340 A (LABORATOIRES DE BIOLOGIE VEGETALE YVES ROCHER) 19 mars 1999 (1999-03-19) * le document en entier * ---	1-4,6,7, 9	A61K7/48
X	FR 2 734 721 A (CLARINS) 6 décembre 1996 (1996-12-06) * le document en entier * ---	1	
X	FR 1 282 505 A (HELENA RUBINSTEIN) 27 janvier 1962 (1962-01-27) * le document en entier * ---	1	
X	EP 0 716 848 A (UNILEVER) 19 juin 1996 (1996-06-19) * le document en entier * ---	1	
X	WO 94 28868 A (UNILEVER) 22 décembre 1994 (1994-12-22) * le document en entier * ---	1	
X	DATABASE CAPLUS 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; retrieved from STN Database accession no. 2001:568344 XP002198658 * abrégé * & JP 2001 213778 A (POLA CHEMICAL INDUSTRIES) 7 août 2001 (2001-08-07) ---	1	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) A61K
X	WO 00 64407 A (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE) 2 novembre 2000 (2000-11-02) * le document en entier * ---	1	
-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 mai 2002		Fischer, J.P.	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 609321
FR 0111803

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche ou ont fait l'objet d'une recherche incomplète, à savoir:

Revendications ayant fait
l'objet de recherches complètes:
1

Revendications ayant fait
l'objet de recherches incomplètes:
2-9

Raison:

la revendication 1 a trait à l'utilisation d'une très grande variété de compositions. En effet l'expression "extrait lipidique de végétal, de levure ou de champignon contenant de l'ergastérol" représente un nombre important d'extraits différents pouvant contenir de l'ergastérol. De plus la matière revendiquée n'est pas suffisamment supportée par la description et les exemples ou il n'est question que d'un extrait de Shiitake.

Par conséquent la recherche a été effectuée pour les parties des revendications dont l'objet apparait être clair, fondé et suffisamment exposé à savoir les exemples et dans l'esprit général de l'invention.

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0111803 FA 609321**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 13-05-2002
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2768340	A	19-03-1999	FR 2768340 A1	19-03-1999
			EP 1014935 A1	05-07-2000
			WO 9913858 A1	25-03-1999
			US 6294524 B1	25-09-2001
FR 2734721	A	06-12-1996	FR 2734721 A1	06-12-1996
FR 1282505	A	27-01-1962	AUCUN	
EP 716848	A	19-06-1996	CA 2161388 A1	03-06-1996
			EP 0716848 A2	19-06-1996
			JP 8208420 A	13-08-1996
			ZA 9509203 A	30-04-1997
WO 9428868	A	22-12-1994	US 5310556 A	10-05-1994
			AU 7183694 A	03-01-1995
			CA 2159606 A1	22-12-1994
			DE 69413969 D1	19-11-1998
			DE 69413969 T2	01-04-1999
			WO 9428868 A1	22-12-1994
			EP 0702548 A1	27-03-1996
			ES 2123800 T3	16-01-1999
			JP 8511013 T	19-11-1996
			ZA 9404062 A	11-12-1995
JP 2001213778	A	07-08-2001	AUCUN	
WO 0064407	A	02-11-2000	AU 4489600 A	10-11-2000
			BR 0009348 A	05-02-2002
			DE 10084458 T0	25-04-2002
			GB 2366203 A	06-03-2002
			WO 0064407 A1	02-11-2000
JP 60239404	A	28-11-1985	JP 1802384 C	26-11-1993
			JP 5008166 B	01-02-1993