



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1007320A5

NUMERO DE DEPOT : 09300855

Classif. Internat. : A61K C12N

Date de délivrance le : 16 Mai 1995

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 20 Aout 1993 à 15H05 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : L.V.M.H. RECHERCHE, Groupement d'Intérêt Economique rue de Seine 48-50, F-92703 COLOMBES CEDEX(FRANCE)

représenté(e)s par : CLAEYS Pierre, GEVERS Patents S.A., Brussels Airport Bus. Park-Holidaystr. 5-1831 DIEGEM.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : UTILISATION D'UN ECDYSTEROÏDE POUR LA PREPARATION DE COMPOSITIONS COSMETIQUES OU DERMATOLOGIQUES DESTINEES NOTAMMENT A RENFORCER LA FONCTION DE BARRIERE HYDRIQUE DE LA PEAU, OU POUR LA PREPARATION D'UN MILIEU DE CULTURE DE CELLULES DE PEAU, ET COMPOSITIONS AINSI OBTENUES.

INVENTEUR(S) : Meybeck Alain, Les Poissons, rue de Bezons 20ter, F-92400 Courbevoie (FR) Bonte Frédéric, place Charras 5, F-92400 Courbevoie (FR), Redziniak Gérard, rue des Fauvettes 101, F-45590 Saint Cyr en Val (FR)

PRIORITE(S) 25.08.92 FR FRA 9210267

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 16 Mai 1995
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L
Directeur.

Utilisation d'un ecdystéroïde pour la préparation de compositions cosmétiques ou dermatologiques destinées notamment à renforcer la fonction de barrière hydrique de la peau, ou pour la préparation d'un milieu de culture de cellules de peau, et compositions ainsi obtenues.

5

La présente invention concerne essentiellement l'utilisation d'un ecdystéroïde pour la préparation de compositions cosmétiques ou dermatologiques destinées notamment à renforcer la fonction de barrière hydrique de la peau, ou pour la préparation d'un milieu de culture de cellules de peau ainsi que les compositions ainsi obtenues.

10

Les ecdystéroïdes sont un groupe de 2,3,14-trihydroxy- Δ -7-6-kétostéroïdes. On peut citer l' α -ecdysone ou (2 β ,3 β ,14 α -22[R], 25-pentahydroxy-7-cholestène-6-one) ; la 2-déoxyecdysone ou (3 β , 14 β ,22[R],25-tétrahydroxy-5 β -7-cholestène-6-one), l'ecdystérone ou β -ecdysone ou 2 β ,3 β , 14 α ,20 β ,22,25-hexahydroxy-7-cholestène-6-one ; la β -ecdysone-22-acétate ou 20-hydroxyecdysone-22-acétate ou 7-cholestène-2 β ,3 β ,14,20,22[R],25-hexol-6-one-22-acétate; la 5-hydroxyecdystérone ou 5 β ,7-cholestène-2 β ,3 β , 5 α ,14,20,22[R]25-heptahydroxy-6-one ; la β -2-déoxyecdysone ou 3 β ,14, 20,22[R]25-pentahydroxy-5 β ,7-cholestène-6-one. Les ecdystéroïdes, et en particulier l'ecdystérone (dans certains cas appelée β -ecdysone ou encore crustecdysone), sont bien connus dans la littérature et cités dans le Merck Index, 10e édition, 1983, page 505, n° 3 470.

15

On sait que les ecdystéroïdes, et en particulier l'ecdystérone, jouent un rôle important aussi bien dans le règne animal chez les insectes que dans le règne végétal. Chez les insectes, ces hormones jouent un rôle clé dans la croissance et la reproduction. L'ecdystérone intervient en particulier dans les différentes métamorphoses jusqu'à la formation de l'insecte adulte (voir publication du CNRS : Biologie 1990, "Enjeux et Problématiques" de A. Berkaloff et al.)

20

Chez les plantes, l'activité de ces substances n'est pas totalement élucidée. Elles semblent agir sur la floraison (CIENCIA e Cultura (1980), volume 32, n° 10, pages 1384-1390).

25

30

35

Il a maintenant été découvert que les ecdystéroïdes, en particulier l'ecdystérone et ses dérivés acylés, notamment acétylés, régulent la différenciation des kératinocytes.

5 Cette différenciation se traduit en particulier, au niveau de l'épiderme, par une plus grande cohésion cellulaire, par une régulation de la transformation des kératinocytes en cornéocytes par perte du noyau et augmentation de la cornéification cellulaire, par une augmentation du nombre de couches de cornéocytes formant la couche cornée, l'ensemble de ces phénomènes contribue à donner à la peau un aspect plus lisse et plus doux, à renforcer la fonction protectrice de la peau vis-à-vis du milieu extérieur et à renforcer la
10 barrière hydrique empêchant la perte excessive d'eau par l'épiderme ; et au niveau des follicules pileux, à réguler, voire à augmenter, la synthèse par les kératinocytes de la kératine, constituant principal de la tige pilaire du cheveu.

L'homme de l'art pourra se reporter à ce sujet à l'article de Eckert et
15 Rorke publié dans la revue Environment Health Perspective, volume 30, (1989), page 109-116.

Ainsi, la présente invention a pour but principal de résoudre le problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de réguler ou favoriser la différenciation des kératinocytes et, de ce fait, destinée en particulier à traiter les désordres cutanés s'accompagnant de dérèglement de la
20 différenciation des kératinocytes, tels que psoriasis, à restaurer, préserver et/ou renforcer la fonction protectrice de l'épiderme, notamment par l'amélioration ou le renforcement de la couche cornée et la fonction de barrière hydrique, conduisant ainsi à un effet hydratant, en particulier en empêchant la perte excessive d'eau par l'épiderme, dont une application avantageuse est le traitement des peaux
25 psoriasiques, et améliorer la qualité des cheveux, en embellissant ainsi l'aspect de la chevelure.

La présente invention a encore pour but principal de résoudre le problème technique consistant en la fourniture d'une solu-
30 tion permettant de favoriser, d'accélérer et d'améliorer la

différenciation de cellules de peau, notamment de kératinocytes, lors de leur culture dans un milieu de culture.

La présente invention résout pour la première fois ces problèmes techniques de manière satisfaisante et utilisable à l'échelle industrielle pour la
5 préparation de compositions cosmétiques ou dermatologiques, ou pour la préparation de milieux de culture notamment en masse de cellules de peaux, ainsi que pour cette culture.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention concerne l'utilisation d'au moins un ecdystéroïde ou d'au moins un dérivé
10 d'ecdystéroïde ou d'au moins un extrait végétal ou animal contenant ledit ecdystéroïde ou ledit dérivé d'ecdystéroïde, pour la préparation d'une composition cosmétique ou dermatologique destinée à traiter les désordres cutanés s'accompagnant de dérèglements de la différenciation des kératinocytes, tels que le psoriasis, à restaurer, préserver et/ou renforcer
15 la fonction protectrice de la peau, notamment par l'amélioration ou le renforcement de la couche cornée et la fonction de barrière hydrique, ainsi que la cohésion des cellules de l'épiderme, ou encore améliorer la qualité constitutive des cheveux ; ou pour la préparation d'un milieu de culture de cellules ou de tissus, notamment pour la culture en masse de cellules de peau, en particulier de
20 kératinocytes.

Selon un autre mode de réalisation particulier, on utilise une combinaison de plusieurs ecdystéroïdes ou dérivés d'ecdystéroïdes, ou bien une combinaison d'au moins un ecdystéroïde et d'un extrait végétal ou animal en contenant.

25 Selon un mode de réalisation particulier, l'ecdystéroïde précité est l'ecdystérone, ou un dérivé d'ecdystérone, notamment un dérivé acylé, hydroxylé ou déoxylé de celle-ci.

Selon une variante de réalisation préférée, le dérivé acylé précité est un mono- ou un multiacétate d'ecdystérone.

30 Selon un mode particulièrement avantageux de l'invention, le dérivé de l'ecdystérone est choisi parmi le groupe consistant du bêta-ecdysone-2-acétate, le bêta-ecdystone-3-acétate, le bêta-ecdysone-2,3-diacétate, le bêta-ecdysone-2,3,22-triacétate, le

bêta-ecdysone-2,3,22,25-tétraacétate; la 5-hydroxyecdystérone et la 2-déoxyecdystérone.

Selon une autre caractéristique particulière de l'invention, l'extrait précité végétal ou animal contenant l'ecdystéroïde, de préférence l'ecdystérone, est
5 un extrait d'*Achyranthes bidentata*, de *Paris axialis*, de *Paris fargesii*, de *Paris dunniana*, de *Paris vietnamensis*, de *Paris polyphylla*, de *Polypodium vulgare*, de *Cyanotis arachnoidea*, d'*Ajuga decumbens*, de *Pfaffia paniculata*, de *Pfaffia iresinoides*, de *Vitex glabrata*, d'*Achyranthes aspera*, de *Sesuvium portulacastrum*, de *Serratula sogdiana*, de *Rhaponticum integrifolium*, de
10 *Rhaponticum* (ou *Leuzea*) *carthamoides*, de *Silene tatarica*, de *Silene otites*, de *Silene scabrifolia*, de *Silene nutans*, de *Silene brahuica*, de *Silene traemixta*, de *Silene dioica*, de *Lychnis flos-cuculi*, d'*Ajuga iva*, de *Serratula tinctoria*, de *Cyathula officinalis*, de *Cyathula capitata*, ou de *Bombyx mori*.

15 Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, les extraits de plantes préférés sont les extraits de *Polypodium vulgare*, d'*Ajuga decumbens*, *Cyanotis arachnoidea*, d'*Achyranthes bidentata* et de *Rhaponticum* (ou *Leuzea*) *carthamoides*.

20 Selon une autre variante de réalisation avantageuse, on utilise une combinaison consistant de l'ecdystérone, et d'au moins l'un de ses mono- ou multiacétates, en particulier le 2- ou le 3-acétate, ou un extrait végétal contenant une telle combinaison. On a en effet observé que les dérivés acétate d'ecdystéroïde en combinaison avec l'ecdystérone renforcent les activités précitées de l'invention. Cette activité est encore renforcée avec la combinaison
25 complémentaire avec l'ajugastérone C éventuellement sous sa forme 2- ou 3-monoacétate.

Selon une autre caractéristique particulière de l'invention, l'ecdystéroïde ou son dérivé, ou l'extrait végétal ou animal en contenant, peut être incorporé au moins en partie dans des liposomes.

30 Il est à noter que par l'expression "incorporé au moins en partie dans des liposomes", on entend que l'ecdystéroïde ou son dérivé, ou l'extrait végétal ou animal en contenant, est combiné à des liposomes quelle que soit la forme de cette combinaison.

Autrement dit, dans le cadre de l'invention, l'ecdystéroïde ou ses dérivés ou l'extrait végétal ou animal en contenant, peut être totalement encapsulé, partiellement encapsulé, ou être à l'extérieur simplement en présence des liposomes.

05 La préparation des liposomes contenant au moins en partie au moins un ecdystéroïde selon l'invention peut être réalisée selon l'un des procédés connus pour incorporer des substances actives, notamment des stéroïdes, dans des liposomes.

10 Selon un mode de réalisation préféré, selon la présente invention, on utilise un procédé d'atomisation des constituants de la phase lipidique, permettant d'obtenir une poudre lipidique facilement dispersible dans une solution aqueuse pour former des liposomes par exemple selon le procédé décrit dans le document US-A-4 508 703. La suspension de liposomes ainsi obtenue peut être
15 homogénéisée au moyen d'ultrasons, ou dans le cas d'une production de masse, au moyen d'une homogénéisation sous pression, conformément au procédé décrit dans US-A-4 621 023.

20 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'ecdystéroïde ou son dérivé ou un extrait végétal ou animal en contenant est incorporé dans la phase lipidique des liposomes. On dissout ainsi l'ecdystéroïde ou son dérivé, ou un extrait le contenant, avec les constituants de la phase lipidique, avant atomisation, dans une solution organique contenant au moins un lipide amphiphile, tel que la lécithine de soja, et éventuellement
25 un composé hydrophobe lipophile tel que le cholestérol ou le β -sitostérol. De préférence, le solvant est choisi parmi le dichlorométhane, le chloroforme ou le méthanol, ou l'un de leurs mélanges.

30 La solution organique peut avantageusement contenir un agent anti-oxydant tel que l' α -tocophérol.

 La poudre lipidique obtenue est dispersée dans un milieu aqueux convenable, par exemple une solution tampon PBS, une solution de glucose ou une solution de chlorure de sodium. On obtient ainsi une suspension de liposomes.

35 Selon un mode de réalisation avantageux, surtout dans le cas d'une composition de liposomes, après avoir éventuellement

homogénéisé la composition obtenue, les compositions de liposomes sont gélifiées par mélange avec un gel, tel qu'un gel de polymère vinylique, en particulier commercialisé sous la dénomination commerciale Carbopol® 940. Cette procédure de gélification est également décrite dans US-A-4 508 703, en
5 particulier dans les exemples.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la concentration de l'ecdystéroïde est comprise entre 0,001 et 30 % en poids, et de préférence entre 0,01 et 10 % en poids, de la phase lipidique desdits liposomes.

10 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, l'ecdystéroïde ou son dérivé ou un extrait végétal ou animal en contenant est au moins partiellement inclus dans de la cyclodextrine. Pour ce faire, on pourra procéder de manière bien connue à l'homme de l'art. Par exemple, on solubilise la cyclodextrine dans un tampon aqueux, par exemple du type
15 PBS. On ajoute ensuite, sous agitation à la température ambiante un ecdystéroïde ou son dérivé ou un extrait végétal ou animal en contenant, en quantité équimoléculaire. On poursuit l'agitation jusqu'à obtention d'une solution limpide. On utilise ensuite cette solution pour la préparation d'une composition cosmétique ou dermatologique selon l'invention. On procède de même dans le
20 cas d'une combinaison comme précédemment décrit. Grâce à cette inclusion dans la cyclodextrine, on améliore de manière inattendue considérablement l'activité de l'ecdystéroïde ou de son dérivé, ou d'un extrait végétal ou animal en contenant. La proportion de cyclodextrine et d'ecdystéroïde ou son dérivé ou un extrait végétal ou animal en contenant, dans la solution de solubilisation peut
25 varier dans de larges limites. De préférence, cette concentration sera comprise, pour la cyclodextrine entre 0,1 % et 5 % en poids, et pour l'ecdystéroïde entre 0,01 % et 2 % en poids.

Les ecdystéroïdes ou leurs dérivés, de préférence l'ecdystérone ou ses dérivés, sont obtenus sous forme isolée, ou sous forme d'un extrait à partir
30 de toutes sources naturelles disponibles, ou encore par un procédé de synthèse chimique. Les principales sources naturelles d'ecdystéroïdes sont les insectes

et surtout un grand nombre de plantes, telles que les plantes précitées. Egalement, un certain nombre de procédés de synthèse ont été mis au point.

Extraction à partir d'insectes

5 La quantité d'ecdystéroïde, en particulier d' α ou β -ecdysone, présente dans les insectes est extrêmement faible. Chez le papillon *Bombyx mori*, elle est par exemple de 5.10^{-6} % en poids d'insecte (voir A. Butenandt et al., Z. Naturforsch. B., 9, 389, (1954)).

10 L'extraction d'ecdystéroïde à partir d'insectes ne peut donc généralement pas constituer un procédé d'obtention industriel.

Cependant, dans le document Hunger-Ricci CH-A-478 565, on décrit l'extraction d'ecdystérone à partir de nymphes ou de chrysalides, destinée à la préparation de composition cosmétiques.

15 Extraction à partir de plantes

La concentration en ecdystéroïdes, en particulier en ecdystérones, varie d'une variété à l'autre. Par exemple, la concentration en ecdystérone est de 0,025 % dans les graines d'*Achyranthes aspera* et de 0,35 % dans la plante *Sesuvium portulacastrum*. Les pourcentages sont des pourcentages en poids de matière sèche.

20 Parmi les plantes pouvant être utilisées pour l'extraction des ecdystéroïdes, en particulier de l'ecdystérone, on peut citer : *Serratula sogdiana* et *Rhaponticum integrifolium*, qui présentent l'avantage de pouvoir être cultivées (voir Horticultural Abs. 0C051-01546 en référence à Rastitel'nye Resursy, (1980),
25 volume 16, n° 2, pages 193-198 (en Russe)).

On peut citer également les extractions à partir de :

- *Serratula tinctoria* (HUT-029 390) ;
- *Serratula inermis* (SU-1 146 050) ;
- 30 - *Achyranthes fauriei*, (FR-1 525 385) ;
- *Cyathula* (FR-1 525 385) ;
- *Polypodium vulgare* (US Patent n° 3 527 777) ;

- Cyanotis arachnoidea (C.A. 89 176 352, de référence à la publication de Nien Schui Lin et al. acta chimica sinica, 1978, volume 36, N° 2, pages 137-141).
- Ajuga decumbens (JP-46-014 665) ;
- 5 - Pfaffia iresinoides (Derwent 88-045806 ou JP-63 002 928) ;
- Pfaffia paniculata (Derwent 84-052423 ou JP-59-010 600) ;
- Graine de Kaladana (DE-2 201 991) ;
- Ipomea petaloidea (DE-2 834 703) ;
- Silenes (HUT 029 390 et SU 924 051).

10

Ces sources d'ecdystéroïdes sont données sans caractère limitatif et ne sont pas exhaustives.

Certains extraits peuvent contenir, outre l'ecdystérone, également des dérivés acétylés (C.A. 89-176352).

15

On peut également obtenir les ecdystéroïdes selon l'invention par synthèse chimique (voir par exemple US-A-3 354 152, US-3 354 154, US-3 378 549, US-3 455 905, FR-1 494 371 ; US-3 440 241 ; FR-1 524 924 ; US-3 378 549 et FR-A-1 498 237).

20

Un exemple de procédé général d'extraction d'ecdystéroïde, de préférence d'ecdystérone, à partir de plantes est décrit dans Chem. Pharm. Bull. (1969) 17 (2) 340-2 par S. Imai et al.

25

On fait macérer la plante fraîche dans 5 fois son poids de méthanol, on homogénéise et on filtre. On recommence une deuxième fois cette opération. On concentre les extraits, on ajoute de l'eau jusqu'à former une solution à 30 % de méthanol-eau.

30

Cette solution est extraite à l'hexane. La fraction méthanolique à 30 % est concentrée à nouveau et extraite à l'acétate d'éthyle. La fraction aqueuse est extraite au n-butanol. L'extrait butanolique est alors concentré par évaporation, puis traité par chromatographie sur gel de silice par un mélange chloroforme-méthanol. On obtient ainsi l'ecdystérone, après recristallisation dans un mélange éthanol-acétate d'éthyle sous forme d'aiguilles incolores.

Il est possible également d'obtenir des dérivés mono-acétylés d'ecdystéroïdes par des voies chimiques bien connues de

l'homme de l'art. Par exemple, l'ecdystéroïde est mis en présence d'un mélange 1 : 5 en poids d'acide acétique et de pyridine, à température ambiante. On laisse réagir généralement pendant une durée de 30 min à 1 h. La réaction est alors arrêtée par addition
05 de méthanol. On obtient ainsi un mélange de différents monoacétates de l'ecdystéroïde, que l'on peut ensuite séparer de manière classique par chromatographie. Par ce procédé, il est par exemple possible de préparer des monoacétates d'ecdystérone, respectivement en position 2, 3, 22 et 25.

10 Par ailleurs, un certain nombre d'ecdystéroïdes sont disponibles dans le commerce. Par exemple l'ecdystérone, la 5-hydroxyecdystérone, la 2-déoxyecdystérone, l'ecdystérone 22-acétate, l' α -ecdysone et la 2-déoxy- α -ecdysone sont disponibles chez SIGMA sous les références SIGMA H 5142, SIGMA P 9531, SIGMA
15 D 7775, SIGMA H 5267, SIGMA E 9004, SIGMA D 7900.

Les compositions selon l'invention précédemment décrites, contenant un ecdystéroïde, de préférence l'ecdystérone, ou ses dérivés, éventuellement sous forme au moins en partie incorporée dans des phases lamellaires lipidiques hydratées ou dans des
20 liposomes peuvent se présenter sous différentes formes utilisables en cosmétique ou en dermatologie. Par exemple, ces compositions peuvent être des gels, des crèmes, des laits ou des lotions.

Ces compositions, appliquées sur les zones à traiter de la peau, ont pour effet de réguler la différenciation des
25 kératinocytes, favorisant ainsi la formation ou la restauration d'un épiderme de bonne qualité, notamment au niveau de la couche cornée, en particulier en ce qui concerne sa composition et son organisation structurale. Ceci permet à l'épiderme, d'une part, notamment par une cohésion cellulaire renforcée, de posséder des
30 propriétés de protection optimale vis-à-vis des milieux environnants, et d'autre part de traiter les désordres de l'épiderme s'accompagnant d'un dérèglement de la différenciation des kératinocytes.

Ainsi, les compositions selon l'invention permettent en
35 particulier de restaurer, de préserver et de renforcer la fonction de barrière cutanée protectrice de l'épiderme, en particulier de

barrière hydrique, et d'obtenir ainsi notamment un effet hydratant en empêchant la perte excessive d'eau par l'épiderme. Les compositions selon l'invention peuvent donc avantageusement être utilisées pour le traitement des peaux sèches, quel que soit le degré de sécheresse, y compris les peaux ichtyosiques, et le traitement des peaux psoriasiques.

Selon un deuxième aspect, l'invention concerne aussi une composition cosmétique ou dermatologique destinée à traiter les désordres cutanés s'accompagnant de dérèglements de la différenciation des kératinocytes, tels que le psoriasis, à restaurer, préserver et/ou renforcer la fonction protectrice de la peau, notamment le renforcement ou l'amélioration de la couche cornée et la fonction de barrière hydrique, ainsi que la cohésion des cellules de l'épiderme, ou encore à améliorer la qualité constitutive des cheveux, caractérisée en ce qu'elle contient, à titre d'agent actif, un ecdystéroïde ou un dérivé d'ecdystéroïde, ou un extrait végétal ou animal contenant ledit ecdystéroïde ou ledit dérivé d'ecdystéroïde, tel que défini précédemment.

Selon un autre mode de réalisation particulier, la composition cosmétique ou dermatologique selon l'invention présente un pouvoir hydratant, notamment en empêchant une perte excessive d'eau par l'épiderme, et peut être destinée au traitement des peaux sèches, notamment des peaux ichtyosiques.

Selon un autre mode de réalisation particulier, la composition cosmétique ou dermatologique selon l'invention permet de restaurer la différenciation normale des kératinocytes, et peut être destinée au traitement des peaux psoriasiques.

Dans ce cadre, habituellement l'ecdystéroïde ou le dérivé d'ecdystéroïde est incorporé dans un excipient cosmétiquement ou dermatologiquement acceptable. Egalement, l'ecdystéroïde ou le dérivé d'ecdystéroïde précité, ou un extrait de plante contenant, peut être incorporé dans des phases lamellaires lipidiques hydratées ou des liposomes, comme cela a été décrit pour le premier aspect précédent.

Selon un troisième aspect, l'invention concerne encore un milieu de culture de cellules ou de tissus, notamment pour la

05 culture en masse de cellules de peau, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité efficace pour favoriser, accélérer ou améliorer la différenciation des cellules de peau, en particulier des kératinocytes, d'au moins un ecdystéroïde ou d'au moins un dérivé d'ecdystéroïde ou d'au moins un extrait végétal ou animal en contenant.

10 Selon un quatrième aspect, l'invention concerne encore un procédé pour favoriser, accélérer ou améliorer la différenciation des cellules de peau, en particulier des kératinocytes, notamment dans le cadre d'une culture en masse de cellules de peau, pour la production de peau artificielle ou pour la préparation de modèles de peau reconstituée, caractérisé en ce que l'on utilise un milieu de culture tel que défini dans le cadre d'une utilisation précédente, ou dans la description suivante prise dans son ensemble.

15 Ce procédé selon l'invention dit de différenciation cellulaire présente notamment un grand intérêt industriel. On citera par exemple :

20 - La production de médiateurs biochimiques par traitement de culture en masse de kératinocytes dans des bioréacteurs.

25 - La préparation de peau artificielle en vue de réaliser des greffes de peau, le procédé de l'invention étant particulièrement avantageux dans le cas d'auto-greffes de grands brûlés, grâce au gain de temps qu'il procure dans la préparation d'une peau artificielle. En particulier, l'accélération et l'amélioration de la différenciation des kératinocytes se traduit par la formation plus rapide d'une couche cornée, de bonne qualité.

30 - La réalisation de modèles de peau comprenant de la peau reconstituée, destinée par exemple à évaluer la pénétration cutanée ou la toxicité de substances ou compositions appliquées par voie topique, lorsqu'elles sont destinées en particulier à un traitement local ou à un traitement systémique (transderm, notamment).

35 Selon une variante de réalisation particulière, ce procédé de culture comprendra généralement la préparation d'un milieu de culture pour la croissance de kératinocytes humains comprenant un milieu de base nutritif DMEM (Gibco®), un facteur de

croissance épidermique ("EGF"), 10 % de sérum de veau foetal, de l'isoprotérénol et/ou de la forskoline, ainsi que de l'hydrocortisone. Dans le cadre de l'invention, ce milieu comprend aussi un ecdystéroïde ou un dérivé d'ecdystéroïde ou un extrait végétal ou animal en contenant tel que décrit dans la description précédente ou suivante, par exemple la β -ecdysone, ou l'un de ses dérivés, en particulier acétate, généralement à une concentration de 0,01 à 0,5 % en poids.

Dans ce procédé, on réalise une culture en masse de cellules de peau en inoculant des kératinocytes afin de les immobiliser sur des supports tels que fibres creuses, des microbilles, ou des matrices microporeuses et cela à l'aide du milieu de culture ci-dessus. On peut assurer une perfusion du milieu afin d'avoir un apport suffisant à la croissance et la différenciation même lorsque la biomasse est importante.

Le milieu de culture selon l'invention peut avantageusement être utilisé pour la culture en masse de cellules de peau, en particulier de kératinocytes, pour la production de peau artificielle ou pour la préparation de modèles de peau reconstituée.

Dans le cadre de l'utilisation dans un milieu de culture, selon une variante de réalisation particulière, on peut utiliser de 0,01 à 0,5 % en poids d'ecdystéroïde, de dérivé d'ecdystéroïde ou d'extrait de plantes en contenant, par rapport au poids total du milieu de culture final.

D'autre part, selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, on peut introduire dans la composition cosmétique ou dermatologique un principe actif complémentaire, en particulier un principe actif à effet hydratant tel que l'acide hyaluronique.

Selon encore un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de traitement cosmétique pour restaurer, préserver et/ou renforcer la fonction protectrice de la peau incluant la fonction de barrière hydrique, pour restaurer, préserver et/ou renforcer la couche cornée, et pour améliorer la qualité constitutive des cheveux, caractérisé en ce qu'on applique sur des zones concernées de la peau ou du cuir chevelu d'une personne concernée, une quantité cosmétiquement efficace d'une

composition contenant au moins un ecdystéroïde, ou au moins un dérivé d'ecdystéroïde, ou au moins un extrait végétal ou animal en contenant, en particulier à une concentration comprise entre 0,0001 et 5 %, de préférence entre 0,01 et 1 %, en poids par rapport au poids total de la composition.

De préférence, dans les différents aspects précédents de l'invention, la concentration en poids d'ecdystéroïde, de dérivés d'ecdystéroïde ou d'un extrait de plante en contenant dans la composition cosmétique ou dermatologique finale, est comprise entre 0,0001 et 5 %, de préférence encore entre 0,01 et 1 % en poids par rapport au poids total de la composition.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lumière de la description explicative qui va suivre faite en référence à plusieurs exemples de réalisation de l'invention donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention.

Dans les exemples, les pourcentages sont donnés en poids, sauf indication contraire.

20 EXEMPLE 1

Test d'activité sur la différenciation des kératinocytes

Pour la présente étude, on utilise un prélèvement de peau effectué lors d'une opération de chirurgie esthétique de type "lifting" sur le visage d'une femme de 42 ans.

25 Au jour J = -2, on ensemence six boîtes de Petri avec 10^5 cellules de kératinocytes isolées à partir de ce prélèvement dans un milieu de culture classique pour la culture des kératinocytes, bien connu de l'homme de l'art.

30 Au jour J = 0 et au jour J = 7, le milieu de culture est renouvelé par un milieu identique sur trois des six boîtes qui constituent des boîtes témoins non traitées, et, sur les trois boîtes restantes, qui constituent les boîtes traitées, on renouvelle avec un milieu identique, mais dans lequel on a dissous 250 µg/ml d'ecdystérone.

Au jour J = 12, on réalise une numération cellulaire ainsi qu'une inclusion des cellules en résine époxy après fixation et marquage des structures cellulaires à l'acétate d'uranyle.

05 On réalise une coupe de chacun des blocs de résine ainsi obtenus sous forme de coupes ultrafines, par exemple à l'aide d'un dispositif connu sous le nom de microtome et que l'on observe au microscope électronique à transmission.

10 On a répertorié au tableau I suivant cette observation pour chacune des trois zones de la culture témoin, d'une part, et de la culture traitée par l'ecdystérone, d'autre part.

TABLEAU I

	Témoin	Ecdystérone
15	Zone supérieure	Signes de dégénérescence Pas d'enveloppe cornée autour des cellules des couches supérieures cellulaires les plus différenciées Pas de grains de kératohyaline
20		Couche cornée plus importante Nombreux cornéocytes avec une enveloppe cornée épaisse Desmosomes différenciés Granules de kératohyaline Moins d'organelles
25	Zone intermédiaire	Quelques tonofilaments Grands espaces intercellulaires Quelques desmosomes
		Filaments de kératine Beaucoup de tonofilaments Espaces intercellulaires réduits
	Zone basale	Quelques hémidesmosomes
		Filaments de cytokératine Nombreux hémidesmosomes

30 On constate du tableau I ci-dessus qu'avec l'utilisation d'ecdystérone, selon la présente invention, on obtient une culture constituée de nombreuses couches de kératinocytes très différenciés, ce qui démontre l'effet régulateur d'un ecdystéroïde tel que l'ecdystérone sur la différenciation des kératinocytes, de façon

35 hautement significative.

Egalement, en raison de l'effet de normalisation de la différenciation des kératinocytes, les compositions selon l'invention contenant un ecdystéroïde, tel que précédemment défini, permettent de maintenir un bon état de l'épiderme de la peau "normale", notamment par le maintien de sa souplesse et de son rôle fonctionnel, en particulier son rôle de barrière de protection.

Les compositions de l'invention peuvent ainsi être utilisées avantageusement pour l'hydratation de la peau, pour la prévention et le traitement des peaux sèches présentant différents degrés de sécheresse, y compris les peaux ichtyosiques, ou pour le traitement des peaux psoriasiques.

Il est à noter en effet que le phénomène des peaux sèches ou du psoriasis est accompagné d'un trouble de différenciation des kératinocytes. En particulier, les kératinocytes psoriasiques sont pauvrement développés et immatures, le nombre et la taille des tonofilaments sont altérés, certaines cellules de la couche cornée contiennent encore des organelles, voire un noyau, ce qui montre que la différenciation ne s'est pas faite correctement. On observe également, dans le cas de ces affections, d'importants espaces intercellulaires.

Dans le cas des peaux sèches, en particulier de l'ichtyose, la différenciation des kératinocytes est imparfaite, s'accompagnant de malformation des grains de kératohyaline et des desmosomes. L'épiderme présente une kératinisation anormale, ce qui entraîne une perturbation des propriétés de barrière, notamment de barrière hydrique, et une perte d'élasticité.

On donne maintenant divers exemples de compositions cosmétiques ou dermatologiques industriellement utilisables.

30 EXEMPLE 2

Composition dermatologique pour la restauration de la barrière hydrique de l'épiderme

	- Ecdystérone.....	0,5 g
35	- Cremophor RH40 [®]	1 g
	- Carbomer 980 [®]	0,2 g

	- Triéthanolamine.....	0,18 g
	- PEG 6-32 stéarate.....	7 g
	- Cétyl alcool.....	2 g
	- Huiles végétales.....	25 g
05	- Excipient aqueux parfumé.....q.s.p.	100 g

On mélange les composants ci-dessus de manière classique pour obtenir une émulsion traitante appliquée matin et soir en massant légèrement les zones à traiter. Cette émulsion s'utilise
10 comme crème de jour et/ou de nuit.

EXEMPLE 3

Composition dermatologique pour le traitement de peaux psoriasiques

15	- Ecdystérone-2-acétate.....	0,3 g
	- Gel de Carbopol 980 [®] à 2 %.....	35 g
	- Excipient aqueux parfumé.....q.s.p.	100 g

On introduit l'ecdystérone-2-acétate dans l'excipient aqueux pour le dissoudre, puis on ajoute le gel de Carbopol de
20 manière à obtenir une composition gélifiée que l'on applique localement sur les lésions pendant 6 semaines.

EXEMPLE 4

Composition cosmétique pour maintenir un état d'hydratation satisfaisant de l'épiderme

	- Ecdystérone.....	0,18 g
	- α -bisabolol.....	0,1 g
30	- Acide hyaluronique.....	1 g
	- Urée.....	3 g
	- Excipient cosmétiquement acceptable sous forme d'un lait pour le corps.....q.s.p.	100 g

35 Appliquer le lait sur les zones à traiter, en particulier sur les jambes après l'épilation. Cette composition permet en

particulier de renforcer la fonction de barrière hydrique cutanée de l'épiderme par l'amélioration de la cohésion intercellulaire épidermique. Elle permet ainsi à la peau de conserver un état d'hydratation satisfaisant.

05

EXEMPLE 5

Composition cosmétique liposomale pour rééquilibrer la desquamation de la couche cornée de l'épiderme, et redonner un épiderme lisse

10	- Ecdystérone.....	0,1 g
	- Lécithine de soja.....	2 g
	- β -sitostérol.....	0,2 g
	- Emulsion crème cosmétique à base de squalane de type huile dans eau, q.s.p.....	100 g

15

Dans une première étape, on prépare une suspension aqueuse de liposomes encapsulant l'ecdystérone dans la phase lipidique desdits liposomes. Pour cela, on procède de la manière suivante.

20 On dissout 0,1 g d'ecdystérone du commerce, 2 g de lécithine de soja et 0,2 g de β -sitostérol dans 50 ml d'un mélange 4:1 de dichlorométhane et de méthanol. Cette solution est évaporée sous pression réduite (200 mm de mercure environ) dans un ballon rotatif porté à 45°C. Le film lipidique obtenu est repris par 25 ml
25 d'une solution aqueuse de phosphate monopotassique à 0,2 g/l et de phosphate disodique à 1,44 g/l, sous agitation pendant 1 h.

On obtient ainsi environ 25 ml d'une suspension de liposomes encapsulant l'ecdystérone que l'on soumet ensuite à une homogénéisation aux ultrasons (15 min, 150 W, 4°C).

30 Dans une deuxième étape, on incorpore de manière classique la suspension de liposomes obtenue à l'excipient émulsionné, pour obtenir la crème selon l'invention.

On peut appliquer quotidiennement la crème sur le visage en cas de peau rugueuse ou desquamant par écailles.

Cette composition renforce la cohésion de la couche cornée, régularise le détachement des cellules mortes, en leur donnant ainsi l'aspect d'un épiderme plus lisse.

05 EXEMPLE 6

Préparation d'un extrait de la plante Rhaponticum carthamoides

On réduit en poudre 250 g de racines sèches de la plante Rhaponticum carthamoides, que l'on extrait avec 2,5 l de méthanol pendant 2 h à l'ébullition au reflux.

10 Après une filtration soignée pour éliminer toute particule solide, on évapore le solvant jusqu'à l'obtention d'un produit sec dénommé "extrait de la plante Rhaponticum carthamoides selon l'invention", à l'état dit sec.

15 Cet extrait brut peut être employé dans la préparation des formulations cosmétiques et/ou pharmaceutiques ainsi que pour la préparation d'un milieu de culture.

EXEMPLE 7

Préparation d'un extrait de la plante Achyranthes bidentata

20 On procède comme décrit à l'exemple 6, si ce n'est que l'on utilise des racines sèches de la plante Achyranthes bidentata.

Le produit obtenu est dénommé "extrait de la plante Achyranthes bidentata selon l'invention", à l'état sec.

25 Cet extrait brut peut être employé dans la préparation des formulations cosmétiques et/ou pharmaceutiques ainsi que pour la préparation de milieux de culture.

EXEMPLE 8

30 Composition cosmétique contenant un extrait de plante Rhaponticum carthamoides, destinée au traitement préventif des peaux sèches.

- Extrait de Rhaponticum carthamoides obtenu à l'exemple 6... 0,5 g
- Excipient émulsion crème de type huile dans eau, qsp..... 100 g

On incorpore de manière classique l'extrait de *Rhaponticum carthamoides* dans l'excipient émulsion crème, pour obtenir la crème selon l'invention.

5 On peut appliquer quotidiennement la crème sur les parties du corps que l'on souhaite traiter.

EXEMPLE 9

Composition cosmétique contenant un extrait de plante *Achyranthes bidentata*, destinée au traitement des peaux ichtyosiques.

10

- Glycérol 3 g
- Acide hyaluronique 1 g,
- Extrait d'*Achyranthes bidentata* obtenu à l'exemple 7 0,2 g
- Excipient émulsion crème de type huile dans eau, q.s.p. 100 g

15

On incorpore de manière classique l'extrait d'*Achyranthes bidentata* ainsi que le glycérol et l'acide hyaluronique, à l'excipient émulsion crème pour obtenir la crème selon l'invention.

20 On applique quotidiennement cette crème sur les zones souhaitées de la peau, jusqu'à obtention d'une peau beaucoup plus lisse grâce à une action sur les cornéocytes conduisant à un renforcement de leur enveloppe cornée et à une meilleure cohésion entre eux.

EXEMPLE 10

25 Composition cosmétique pour rééquilibrer l'état de la peau, contenant une combinaison d'ecdystéroïde

Au préalable, on prépare la combinaison d'ecdystéroïde suivante :

- environ 85 % d'ecdystérone ;
- 30 - environ 13 % d'un mélange racémique contenant le 2- et 3-mono-acétate d'ecdystérone ;
- environ 2 % d'ajugastérone C.

L'ecdystérone est disponible dans le commerce. Ses dérivés 2- ou 3-acétate peuvent être préparés par voie chimique, suivant un procédé classique d'acétylation ménagée, en présence d'un mélange acide acétique-pyridine, comme cela a été décrit plus haut. L'ajugastérone C peut être obtenue par extraction à partir de plante, en particulier de l'espèce Ajuga, par exemple suivant le procédé décrit dans le document JP 71-028038 à partir de la plante Ajuga decumbens.

Ces produits sont solubilisés dans un mélange hydro-alcoolique à 50 %. La solution est ensuite évaporée à sec pour donner la combinaison précitée sous forme de poudre.

Ensuite, cette combinaison est introduite dans un excipient émulsion crème de type huile-dans-eau, cosmétiquement acceptable par exemple en quantité suffisante pour obtenir une concentration de 0,05 % en ecdystéroïde, par rapport au poids total de la composition cosmétique ainsi préparée.

EXEMPLE 11

Composition cosmétique à effet hydratant et régénérant contenant une combinaison d'ecdystéroïde et de cyclodextrine

Les ecdystéroïdes de la combinaison préparée à l'exemple 10 sont dispersés à la concentration de 1 % dans une solution aqueuse contenant 2,5 % de cyclodextrine, sous agitation jusqu'à obtention d'une solution limpide. Les ecdystéroïdes sont de cette manière inclus dans les molécules de cyclodextrine. Cette solution de cyclodextrine incluant les ecdystéroïdes est ajoutée à un excipient émulsion crème de type huile-dans-eau en quantité suffisante pour former une émulsion contenant 0,1 % en poids d'ecdystéroïde.

Cette composition peut être appliquée quotidiennement sur les zones souhaitées de la peau pour renforcer son état d'hydratation et obtenir une peau beaucoup plus lisse.

EXEMPLE 12Préparation d'un milieu de culture et son utilisation pour la culture en masse de cellules de peau

Pour la préparation de ce milieu de culture ainsi que
05 pour son utilisation pour la culture en masse de cellules de peau,
l'homme de l'art pourra se reporter notamment à l'article de
Philip C. Familletti et al. dans *Biotechnology*, volume 6,
janvier 1988, pages 41 à 44 ainsi qu'aux références citées dans cet
article, en particulier Arathoon et al. dans la revue *Science*
10 (1986), 232, pages 1390 et suivantes ; l'article de Ku, K. et al.
dans la revue *Biotechnology Bioeng.* (1981), 23, pages 79 et
suivantes.

Ainsi, on prépare un milieu de culture optimal pour la
croissance de kératinocytes humains comprenant un milieu de base
15 nutritif DMEM (Gibco), du facteur de croissance EGF, 10 % de sérum
de veau foetal, de l'isoprotérénol et/ou de la forskoline, ainsi
que de l'hydrocortisone.

Ce milieu comprendra avantageusement de la 20-hydroxy-
ecdysone ou l'un de ses dérivés à la concentration de 0,001 à
20 0,1 %.

On réalise une culture en masse de cellules de peau en
inoculant des kératinocytes afin de les immobiliser sur des
supports tels que fibres creuses, des microbilles, ou des matrices
microporeuses et cela à l'aide du milieu de culture décrit précé-
25 demment. Une perfusion en milieu dans un système à perfusion du
type de celui décrit par Sylvie Guichard-Balestrini dans la revue
Biofutur, le supplément n° 56, avril 1987, pages 2 à 14, sera
assuré afin d'avoir un apport suffisant à la croissance et la diffé-
renciation même lorsque la biomasse est importante.

30 En fin de culture, on récupère les substances secrétées
par les cellules de kératinocytes contenant principalement des
lipides, des sources de matières premières pour la formulation de
compositions cosmétiques ou pharmaceutiques à application topique
sur l'épiderme ou le cuir chevelu.

35 Grâce au produit de l'invention, il est possible de
traiter des cultures de peau reconstituées, en particulier des

cultures de kératinocytes ou de cellules épidermiques cultivées sur un support approprié, tel qu'un support collagénique (contenant ou non des fibroblastes), par exemple décrit dans le document. La Recherche, (1987), 185, p. 149-159 et dans Br J Dermatol 1986, 114, 91-101, ou un support constitué par du derme excisé.

5 Grâce à l'utilisation de la composition selon l'invention, on obtiendra une épidermisation plus rapide et plus complète. Ceci permettra dans des délais plus courts de fournir une sorte de pansement biologique au médecin pour les autogreffes, par exemple dans le cas de brûlures étendues. L'invention permettra également de réaliser de façon industrielle et concurrentielle des peaux
10 reconstituées de bonne qualité pour réaliser des tests de pénétration ou de tolérance.

Naturellement, l'invention comprendra tous les moyens constituant des équivalents techniques des moyens décrits ainsi que leurs diverses combinaisons.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un ecdystéroïde ou d'au moins un dérivé d'ecdystéroïde ou d'au moins un extrait végétal ou animal contenant ledit
5 ecdystéroïde ou ledit dérivé d'ecdystéroïde pour la préparation d'une composition cosmétique ou dermatologique destinée à traiter les désordres cutanés s'accompagnant de dérèglements de la différenciation des kératinocytes, tels que le psoriasis, à restaurer, préserver et/ou renforcer la fonction protectrice de la peau, notamment par l'amélioration ou le renforcement de la couche cornée et la fonction
10 de barrière hydrique, ainsi que la cohésion des cellules de l'épiderme ou encore améliorer la qualité constitutive des cheveux ; ou pour la préparation d'un milieu de culture de cellules de tissus, notamment par la culture en masse de cellules de peau, en particulier de kératinocytes.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'on utilise
15 une combinaison de plusieurs ecdystéroïdes ou dérivés d'ecdystéroïdes, ou bien une combinaison d'au moins un ecdystéroïde et d'un extrait végétal ou animal en contenant.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'ecdystéroïde précité est l'ecdystérone, ou un dérivé d'ecdystérone, notamment un
20 dérivé acylé, hydroxylé ou désoxylé de celle-ci.
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le dérivé acylé d'ecdystéroïde précité est un mono- ou un multiacétate d'ecdystérone.
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce
25 que l'ecdystéroïde précité est un dérivé d'ecdystérone choisi parmi le bêta-ecdysone-2-acétate, le bêta-ecdysone-3-acétate, le bêta-ecdysone-2,3-diacétate, le bêta-ecdysone-2,3,22-triacétate, le bêta-ecdysone-2,3,22,25-tétraacétate, la 5-hydroxy-ecdystérone et la 2-désoxyecdystérone.
6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée
30 en ce que l'extrait précité contenant l'ecdystéroïde, de préférence l'ecdystérone, ou le dérivé d'ecdystéroïde est un

5 extrait d'*Achyranthes bidentata*, de *Paris axialis*, de *Paris fargesii*, de *Pari dunniana*, de *Paris vietnamensis*, de *Paris polyphylla*, de *Polypodium vulgare*, de *Cyanotis arachnoidea*, d'*Ajuga decumbens*, de *Pfaffia paniculata*, de *Pfaffia iresinoides*, de *Vitex glabrata*, d'*Achyranthes aspera*, de
10 *Sesuvium portulacastrum*, de *Serratula sogdiana*, de *Rhaponticum integrifolium*, de *Rhaponticum* (ou *Leuzea*) *carthamoides*, de *Silene tatarica*, de *Silene otites*, de *Silene scabrifolia*, de *Silene nutans*, de *Silene brahuica*, de *Silene traemixta*, de *Silene dioica*, de *Lychnis flos-cuculi*, d'*Ajuga iva*, de *Serratula tinctoria*, de *Cyathula officinalis*, de *Cyathula capitata*, ou de *Bombyx mori*.

15 7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'extrait précité contenant l'ecdystéroïde, de préférence l'ecdystérone, ou le dérivé d'ecdystéroïde est un extrait de *Polypodium vulgare*, d'*Ajuga decumbens*, de *Cyanotis arachnoidea*, d'*Achyranthes bidentata* et de *Rhaponticum* (ou *Leuzea*) *carthamoides*.

8. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'on utilise une combinaison consistant d'ecdystérone, et d'au moins l'un de ses mono- ou multiacétates, en particulier le 2- ou le 3-acétate, ou un extrait végétal contenant ladite combinaison.

20 9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que la combinaison précitée d'ecdystéroïde comprend en outre de l'ajugastérone C ou son 2- ou 3-monoacétate.

25 10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que l'ecdystéroïde précité ou le dérivé de celui-ci ou l'extrait végétal ou animal le contenant est incorporé, au moins en partie, dans des liposomes.

11. Utilisation selon une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que l'ecdystéroïde précité ou le dérivé de celui-ci ou l'extrait végétal ou animal le contenant est inclus au moins en partie dans de la cyclodextrine.

30 12. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que la concentration en poids de l'ecdystéroïde, du dérivé d'ecdystéroïde ou de l'extrait végétal ou animal en

contenant, est comprise entre 0,0001 et 5 % en poids, de préférence entre 0,01 et 1 %, par rapport au poids total de la composition finale.

5 13. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un principe actif complémentaire, en particulier un principe actif à effet hydratant, tel que l'acide hyaluronique.

10 14. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que la composition cosmétique ou dermatologique précitée est destinée au traitement des peaux sèches, des peaux ichtyosiques, ou au traitement des peaux psoriasiques ; ou améliorer la qualité constitutive des cheveux.

15 15. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que le milieu de culture est utilisé pour favoriser la différenciation de kératinocytes, dans le cadre d'une culture en masse de cellules de peau, notamment pour la production de peaux artificielles ou de modèles de peaux reconstituées.

20 16. Composition cosmétique ou dermatologique destinée à traiter les désordres cutanés s'accompagnant de dérèglements de la différenciation des kératinocytes, tels que le psoriasis, à restaurer, préserver et/ou renforcer la fonction protectrice de la peau, notamment le renforcement ou l'amélioration de la couche cornée et la fonction de barrière hydrique, ainsi que la cohésion des cellules de l'épiderme, ou encore améliorer la qualité constitutive des cheveux, caractérisée en ce qu'elle contient, à titre d'ingrédient actif, un ecdystéroïde ou un dérivé d'ecdystéroïde, ou un extrait végétal ou animal contenant ledit ecdystéroïde ou ledit dérivé d'ecdystéroïde, éventuellement incorporé dans un excipient cosmétiquement ou dermatologiquement acceptable.

25 30 17. Composition selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition cosmétique ou dermatologique présentant un pouvoir hydratant, notamment en empêchant une perte excessive d'eau par l'épiderme, et pouvant être destinée au traitement des peaux sèches, notamment des peaux ichtiosiques, ou pour

restaurer la différenciation normale des kératinocytes, et pouvant être destinée au traitement des peaux psoriasiques.

5 18. Composition selon une des revendications 16 et 17, caractérisée en ce que la composition est telle que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 15.

10 19. Milieu de culture de cellules ou de tissus, pour la culture en masse de cellules de peau, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité efficace pour favoriser, accélérer ou améliorer la différenciation des cellules de peau, en particulier des kératinocytes, d'au moins un ecdystéroïde ou d'au moins un dérivé d'ecdystéroïde ou d'au moins un extrait végétal ou animal en contenant.

20. Milieu de culture selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend de 0,01 à 0,5 % en poids d'ecdystéroïde ou d'un dérivé d'ecdystéroïde ou d'extrait végétal ou animal en contenant, par rapport au poids final dudit milieu de culture.

15 21. Milieu de culture selon la revendication 19 ou 20, caractérisé en ce qu'il est préparé à partir d'une composition telle que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 12.

20 22. Procédé pour favoriser, accélérer ou améliorer la différenciation des cellules de peau, en particulier des kératinocytes, notamment dans le cadre d'une culture en masse de cellules de peau, pour la production de peau artificielle ou pour la préparation de modèles de peau reconstituée, caractérisé en ce que l'on utilise un milieu de culture tel que défini à l'une des revendications 19 à 21.

25 23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'on utilise une concentration en poids d'ecdystéroïde, de dérivés d'ecdystéroïde ou de l'extrait végétal ou animal en contenant, compris entre 0,01 et 0,5 % en poids, par rapport au poids total du milieu de culture final.

30 24. Procédé de traitement cosmétique pour restaurer, préserver et/ou renforcer la fonction protectrice de la peau incluant la fonction de barrière hydrique, pour restaurer, préserver et/ou renforcer la couche cornée, et pour améliorer la qualité constitutive des cheveux, caractérisé en ce qu'on applique

09300855

sur des zones concernées de la peau ou du cuir chevelu d'une personne concernée, une quantité cosmétiquement efficace d'une composition contenant au moins un ecdystéroïde, ou au moins un dérivé d'ecdystéroïde, ou au moins un extrait végétal ou animal en contenant, en particulier à une concentration comprise entre 0,0001 et 5 5 %, de préférence entre 0,01 et 1 %, en poids par rapport au poids total de la composition.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BO 4633
BE 9300855

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.5)
X	WO-A-90 03778 (LVMH RECHERCHE) * le document en entier * ---	1-18,24	A61K7/48 C12N5/00
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 111, no. 26, 25 Décembre 1989, Columbus, Ohio, US; abstract no. 239323, * abrégé * & CN-A-86 106 791 (LIN, NIERIU ET AL.) ---	1,3,4, 16-18,24	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 102, no. 15, 15 Avril 1985, Columbus, Ohio, US; abstract no. 128363, * abrégé * & SU-A-1 130 605 (E.V. POLUEKTOVA ET AL.) -----	1,19-21	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
			A61K C12N
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		23 Juin 1994	Willekens, G <i>Willekens</i>
CATEGORIE 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 antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1
EPO FORM 1500 03.82 (P04C.48)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 4633
BE 9300855

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

23-06-1994

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9003778	19-04-90	FR-A- 2637182	06-04-90
		DE-T- 68905816	14-10-93
		EP-A,B 0436650	17-07-91
		JP-T- 4501410	12-03-92
		US-A- 5198225	30-03-93

CN-A-86106791		AUCUN	

SU-A-1130605	23-12-84	AUCUN	
