

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 18.09.97.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 19.03.99 Bulletin 99/11.

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 SOCIETE ANONYME —
FR.

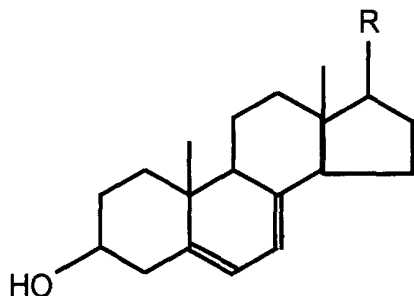
⑦② Inventeur(s) : LUBRANO CHRISTIAN, POIRIER
FREDERIQUE et ROBIN JEAN RENAUD.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤④ NOUVELLE UTILISATION DE L'ERGOSTEROL ET DE SES COMPOSES APPARENTES, EN COSMETIQUE.

⑤⑦ Cette invention concerne l'utilisation de composés de
formule I:

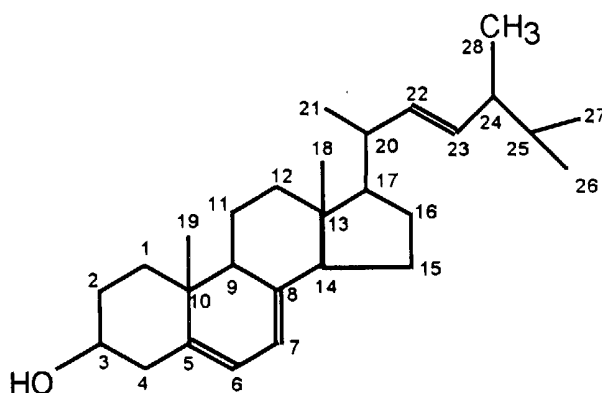


dans laquelle R représente une chaîne hydrocarbonée
en C₁-C₁₂ linéaire ou ramifiée, substituée ou non substi-
tuée, saturée ou insaturée, pour stimuler la prolifération des
cellules épidermiques et des fibroblastes.



La présente invention a trait à l'utilisation de composés de formule I, en particulier de l'ergostérol naturel ou obtenu par synthèse chimique, enzymatique, ou par voie biotechnologique, ou d'un extrait végétal, tel qu'un extrait de champignon, contenant de l'ergostérol, en particulier un extrait de *Lentinus edodes*, pour stimuler la prolifération des cellules épidermiques et des fibroblastes.

L'ergostérol, ou provitamine D2, est un composé à noyau stéroïde possédant des doubles liaisons Δ^5 et Δ^7 dans son cycle de base, présentant la formule suivante :



L'ergostérol pur est connu comme ingrédient dans des préparations cosmétiques.

Transformé en vitamine D sous l'action de la lumière, il est en particulier utilisé comme précurseur de cette vitamine dans des compositions cosmétiques dites "de jour" (FR 2 734 721).

En revanche l'action de l'ergostérol sur la prolifération des cellules épidermiques et des fibroblastes n'était jusqu'à maintenant pas connue.

L'ergostérol est naturellement présent dans le règne végétal, notamment chez les champignons. Il est ainsi présent dans les levures et est également abondant chez les champignons supérieurs tels que notamment *Lentinus edodes*, aussi appelé Shiitaké.

Il s'agit d'un champignon médicinal et alimentaire d'origine asiatique. Le nom japonais Shiitaké dérive de son association avec l'arbre "shiia", le chêne.

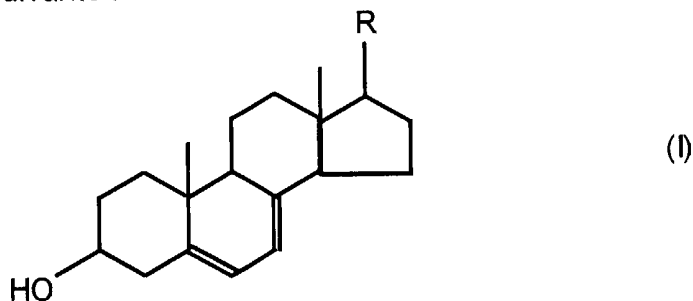
Ce champignon se trouve à l'état naturel sur des troncs d'arbres morts, notamment sur des chênes, frênes, marronniers, et est actuellement largement cultivé.

Les propriétés médicinales des champignons sont principalement
5 reliées à l'un de ses polysaccharides, le lentinane grâce à une activité immunostimulante et à l'éritadénine qui présente une activité hypocholestérolémiant.

Le Shiitaké contient également des protéines (26 % par rapport à la matière sèche), des glucides (65 % de la matière sèche), des minéraux
10 (calcium, potassium) et des vitamines, notamment les vitamines B2 et C.

D'autre part, une fraction lipidique du Shiitaké s'est révélée riche en ergostérol (Ying et al., 1987, Science Press).

Les auteurs de la présente invention se sont intéressés aux
15 propriétés biologiques des dérivés de l'ergostérol, en particulier des composés stéroïdes possédant une double liaison Δ^5 et une double liaison Δ^7 répondant à la formule I suivante :



dans laquelle R représente une chaîne hydrocarbonée en C_1 - C_{12} linéaire ou
20 ramifiée, substituée ou non substituée, saturée ou insaturée.

Par "chaîne substituée", on entend une chaîne hydrocarbonée substituée par un ou plusieurs groupements substituants, tels que notamment un groupement hydroxy ou un groupement alkoxy en C_1 - C_8 .

Par "chaîne insaturée", on entend une chaîne hydrocarbonée
25 partiellement ou totalement insaturée.

Ils ont découvert que ces composés, et en particulier l'ergostérol d'origine synthétique ou sous forme d'extrait végétal, ont une action stimulante sur les cellules épidermiques et les fibroblastes, ce qui les rend particulièrement utiles dans des compositions cosmétiques destinées à lutter contre le
30 vieillissement cutané et à améliorer la qualité structurelle de la peau.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation de composés de formule I telle que décrite précédemment pour stimuler la prolifération des cellules épidermiques et des fibroblastes.

5 Parmi ces composés de formule I, l'ergostérol, d'origine synthétique ou naturelle, est préférentiellement utilisé.

Plus particulièrement, les auteurs de la présente invention ont mis en évidence qu'un extrait végétal, tel qu'un extrait lipidique de *Lentinus edodes*, avait même, en outre, une action sur la prolifération des cellules épidermiques et des fibroblastes supérieure à l'action de l'ergostérol pur d'origine synthétique.

10 La présente invention a donc pour objet l'utilisation d'ergostérol sous la forme d'un extrait lipidique de *Lentinus edodes*, pour stimuler la prolifération des cellules épidermiques et des fibroblastes.

15 La présente invention a également pour objet une composition cosmétique comprenant, outre un véhicule à usage cosmétique, un extrait végétal, tel qu'un extrait de champignon, contenant de l'ergostérol, en particulier un extrait lipidique de *Lentinus edodes*.

20 Un tel extrait végétal peut être obtenu par extraction par un solvant apolaire ou peu polaire ou un mélange apolaire ou peu polaire de solvants notamment choisis parmi le dichlorométhane, l'hexane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol et l'acétone. Il peut être obtenu en particulier par extraction dans un mélange dichlorométhane/éthanol, mélange globalement peu polaire, dans des proportions d'environ 60/ environ 40 en volume. Cet extrait peut également être avantageusement obtenu à l'aide de dioxyde de carbone supercritique et est alors plus riche en ergostérol.

30 De manière préférentielle, les compositions selon l'invention peuvent comprendre de 0,0001 à 0,01% dudit extrait végétal exprimé en poids par rapport au poids de la composition.

35 Les compositions cosmétiques selon l'invention se présentent de préférence sous la forme d'une émulsion simple huile dans eau ou eau dans huile, ou d'une émulsion multiple, de micro-émulsion, de gel aqueux ou hydroalcoolique, de crème, d'huile, de lotion aqueuse ou hydroalcoolique, ou de bâtonnet.

La présente invention a également pour objet une méthode de traitement cosmétique consistant à appliquer sur la peau une composition cosmétique telle que décrite précédemment.

5 L'action des compositions selon l'invention intervient au niveau épidermique par augmentation de l'activité mitotique et du renouvellement des cellules épidermiques, aboutissant à un épaississement de l'épiderme. Au niveau dermique, les compositions selon l'invention agissent en stimulant les fibroblastes, ce qui accélère la maturation et le renouvellement cellulaire et qui
10 se traduit par un synthèse accrue de collagène, une augmentation de la teneur en eau, une augmentation de l'épaisseur et une amélioration de l'élasticité de la peau.

Globalement, il apparaît qu'une action trophique intéressante peut être obtenue par application d'une composition cosmétique selon l'invention, et
15 plus particulièrement un maintien ou une restauration du contenu collagénique de la peau.

Les exemples suivants illustrent la présente invention.

20

EXEMPLE 1

Préparation de l'extrait lipidique de Shiitaké

25 Le Shiitaké sec est réduit en poudre et mélangé au solvant (dichlorométhane/éthanol 60/40) dans une proportion de 10 % à 20 % par rapport au solvant et avantageusement à la teneur de 20 % (poids/volume).

La poudre est extraite sous reflux pendant deux heures.

L'extrait est ensuite filtré et le solvant est évaporé sous vide. Le
30 résidu constitue l'extrait lipidique de Shiitaké.

L'extrait peut également être réalisé par extraction par un fluide supercritique, notamment le CO₂.

Cette extraction permet d'obtenir un extrait plus riche en ergostérol, de couleur moins foncée et d'odeur moins prononcée qu'un extrait
35 réalisé à l'aide de solvants.

EXEMPLE 2

Dosage de l'ergostérol

5 Le dosage est réalisé par HPLC.

a) Matériel/réactifs nécessaires

On utilise le matériel et produits suivants :

- 10 - Colonne MERCK Lichrocart Purospher RP 18 (5 microns) et
précolonne
- acétonitrile, méthanol, chloroforme de qualité analytique
- témoin ergostérol SIGMA E6510.

15 b) préparation de la phase mobile

On effectue le mélange acétonitrile/méthanol 60/40
(volume/volume, volumes mesurés séparément).

c) préparation de l'échantillon

20 On reprend de l'extrait lipidique préparé dans l'exemple1 dans un
mélange chloroforme/méthanol 50/50 (volume/volume). L'extrait est à concentrer
ou à diluer selon les résultats obtenus.

On filtre par un filtre seringue de 0,45 µm.

25 d) mode opératoire

Conditions HPLC :

- Température du four : 43°C
- Débit : 1 ml/min
- Longueur d'onde : 260 nm
30 - Pression indicative : 70 bars

e) résultats

On réalise une droite étalon avec la substance témoin pour un
dosage. Le temps de rétention indicatif est de onze minutes environ.

35 L'extrait lipidique obtenu par solvants présente une teneur de 5 %
environ en ergostérol.

L'extrait obtenu par CO₂ supercritique présente une teneur de 9 %
environ en ergostérol.

EXEMPLE 3

Tests sur cellules

5

a) matériels et méthodes

L'efficacité de la phase lipophile de l'extrait de Shiitaké obtenu à l'aide de solvants a été testée sur des fibroblastes humains normaux (13^{ème} passage) en culture monocouche pour visualiser la prolifération des fibroblastes.

10

15

20

Les fibroblastes sont incubés pendant 24 heures à 37°C à 5 % de CO₂, dans des plaques à 24 puits, à une densité de 8000 cellules par cm². Le milieu de culture est composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium sans rouge de phénol (DMEM, Gibco, référence 11880028), 10 % de sérum de veau nouveau-né (SVNN, Gibco, référence 16010084), 100 U/ml de pénicilline (Gibco, référence 15140106), 100 µg/ml de streptomycine (Gibco, référence 15140106), 2 mM de glutamine (Gibco, référence 250030024), 0,77 ml de glucose (Gibco, référence 19004019) pour 100 ml de milieu final et 1 % d'une solution d'acides aminés non essentiels (Gibco, référence 11140035).

L'extrait à tester est mis en contact avec les cellules dans le milieu de culture appauvri en SVNN (2 %). La concentration testée est de 0,015 µg/ml (1.5.10⁻⁶ %), l'extrait étant solubilisé dans l'éthanol préchauffé à 60°C.

25

Des contrôles positifs (milieu de culture à 10 % SVNN ; β-estradiol à 6.10⁻⁴ µg/ml) et négatifs (milieu de culture à 2 % SVNN) sont réalisés en parallèle.

De la même manière on teste de l'ergostérol à 8.10⁻⁵ µg/ml (SIGMA).

30

Les mesures sont faites à J1, J2 et J3 par un dosage au MTT (Sigma, M5655) qui permet de révéler l'activité des mitochondries. La solution de MTT est incubée pendant trois heures à 37°C. Le MTT est ensuite éliminé et du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma, D 5879) est déposé dans chaque puits pendant dix minutes. Après une agitation de quelques minutes, la lecture est faite à 570 nm.

35

b) résultats

Après seulement trois jours de traitement, l'extrait testé présente une nette stimulation de la prolifération des fibroblastes. En effet, la phase lipophile du Shiitaké, à la concentration de 1,5.10⁻⁶ %, permet un gain de

croissance de 27 % environ, après trois jours de traitement, pour les fibroblastes au 13^{ème} passage. En présence d'ergostérol pur, le gain de croissance est de 11 % à J3.

Parallèlement, en présence de β -estradiol, on obtient un gain de croissance des fibroblastes de 14 % à J3

Ainsi, à une dose d'extrait lipophile de Shiitaké ou d'ergostérol pur comparable à celle du β -estradiol, on obtient une activité équivalente, voire supérieure sur la prolifération des fibroblastes humains.

EXEMPLE 4

Comparaison de l'action d'un extrait lipidique de Shiitaké obtenu par solvants (1), et par CO₂ supercritique (2)

a) matériels et méthodes

La phase lipophile d'un extrait de Shiitaké obtenu par l'extraction au CO₂ supercritique a été testée. Le protocole de cette expérience est identique à celui décrit ci-dessus. Une mesure de la prolifération fibroblastique à J7 a en outre été réalisée. L'effet des extraits obtenus de manière différente (par solvants et par CO₂ supercritique) a été comparé.

Les deux extraits ont été testés aux concentrations de 0,015 $\mu\text{g/ml}$ ($1.5 \cdot 10^{-6}$ %) et 0,0015 $\mu\text{g/ml}$ ($1.5 \cdot 10^{-7}$ %), dans des conditions strictement identiques aux précédentes. Parallèlement, le β -oestradiol et l'ergostérol ont aussi été testés, toujours dans les mêmes conditions.

b) résultats

Les meilleurs résultats sont obtenus après 7 jours de traitement avec les extraits utilisés à la concentration de 0,0015 $\mu\text{g/ml}$ ($1.5 \cdot 10^{-6}$ %), pour les deux lots de fibroblastes. Cependant, il apparaît très nettement que ce sont les fibroblastes les plus âgés (12^{ème} passage) qui répondent le mieux aux extraits et plus particulièrement à la phase lipophile de Shiitaké obtenue par l'extraction au CO₂ supercritique. En effet, à ce stade, on peut observer un gain de croissance de 18,5 % alors que ce gain de croissance n'est que de 4 % pour les fibroblastes plus jeunes (6^{ème} passage). Aussi, il est à noter que le β -oestradiol et l'ergostérol ne fournissent respectivement des gains de croissance

que de 13 % et 8 % à J7 pour les fibroblastes les plus âgés ; pour les fibroblastes les plus jeunes, nous obtenons 7 % de gain de croissance pour le β -oestradiol et 2 % pour l'ergostérol, à J7 toujours (cf tableau).

	Fibroblastes au 6 ^{ème} passage	Fibroblastes au 12 ^{ème} passage
Extrait Shiitaké 1 $1,5 \cdot 10^{-7}$ %	3 %	11 %
Extrait Shiitaké 2 $1,5 \cdot 10^{-7}$ %	4 %	18,5 %
β -oestradiol 600 pg/ml	7 %	13 %
Ergostérol $8 \cdot 10^{-5}$ μ g/ml	2 %	8 %

5

Ces résultats sont obtenus après 7 jours de traitement des fibroblastes par une phase lipophile de Shiitaké obtenue par solvant (n° 1) et une phase lipophile de Shiitaké obtenue par extraction au CO₂ supercritique (n° 2).

10

EXEMPLE 5

Formules incluant l'extrait lipidique de Shiitaké

15

a) exemple de composition sous forme d'émulsion

Eau	QSP
extrait lipidique de Shiitaké	0,0001 % à 0,01 %
conservateurs	QSP
Propylèneglycol	5,00 %
Gomme xanthane	0,30 %
Copolymère acrylique/acrylate	0,50 %
acide stéarique 100 OE**	3,00 %
25 Stéarate de sorbitan	2,00 %
Sorbitan laurate 20 OE	3,00 %
alcool cétylstéarique	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	

5

** acide stéarique avec 100 moles d'OE

b) exemple de composition sous forme de crème

10

Eau	QSP
Gomme xanthane	0,30 %
Séquestrant (par ex. EDTA)	0,05 %
Conservateurs	QSP
15 Extrait lipidique de Shiitaké	0,0001 % à 0,01 %
Acide C 18	2,50 %
Alcool C 16	2,50 %
Trilaurine	1,00 %
Beurre de karité	3,00 %
20 Acétate de tocophérol	0,05 %
β-bisabolol	0,05 %
Huile végétale (blé)	5,00 %
Diméthéticone	3,00 %
Acide polyacrylique	0,30 %
25 Eau	3,00 %
TEA (Triéthanolamine)	1,50 %
Parfum	0,10 %

30

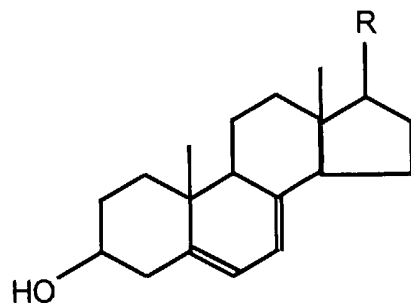
c) exemple de composition sous forme de lotion

Eau	QSP
Agent séquestrant	0,05 %
Propylèneglycol	2,00 %
Conservateurs	QSP
35 Extrait lipidique de Shiitaké	0,0001 % à 0,1 %
Alcool	5 à 50 %
Alcool oléique 20 OE	1,00 %
Parfum	0,05 %
colorants	QSP

REVENDICATIONS

5

1. Utilisation de composés de formule I :



(I)

10

dans laquelle R représente une chaîne hydrocarbonée en C₁-C₁₂ linéaire ou ramifiée, substituée ou non substituée, saturée ou insaturée, pour stimuler la prolifération des cellules épidermiques et des fibroblastes.

15

2. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle le composé de formule I est l'ergostérol d'origine synthétique ou naturelle.

3. Utilisation selon la revendication 2, dans laquelle l'ergostérol est présent sous la forme d'un extrait lipidique de *Lentinus edodes*.

20

4. Composition cosmétique comprenant, outre un véhicule à usage cosmétique, un extrait végétal, tel qu'un extrait de champignon, contenant de l'ergostérol.

5. Composition cosmétique selon la revendication 4, dans laquelle ledit extrait est un extrait lipidique de *Lentinus edodes*.

25

6. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 4 ou 5, dans laquelle l'extrait végétal est obtenu par extraction par un solvant ou un mélange de solvants choisis parmi le dichlorométhane, l'hexane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol et l'acétone.

30

7. Composition cosmétique selon la revendication 6, dans laquelle l'extrait végétal est obtenu par extraction dans un mélange dichlorométhane/éthanol dans des proportions d'environ 60/ environ 40 en volume.

8. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, dans laquelle ledit extrait végétal est obtenu par mélange de 10 à 20% en poids de *Lentinus edodes* séché dans un solvant.

5

9. Composition selon l'une quelconque des revendications 4 ou 5, dans laquelle l'extrait végétal est obtenu par extraction à l'aide de dioxyde de carbone supercritique.

10

10. Composition selon l'une quelconque des revendications 4 à 9, comprenant de 0,0001 à 0,01% en poids dudit extrait végétal par rapport au poids de la composition.

15

11. Composition cosmétique selon l'une des revendications 4 à 10, destinée à lutter contre le vieillissement cutané.

20

12. Composition cosmétique selon l'une des revendications 4 à 11, destinée à stimuler la prolifération des cellules épidermiques et des fibroblastes.

25

13. Méthode de traitement cosmétique consistant à appliquer sur la peau une composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications précédentes.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 547801
FR 9711655

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	FR 1 594 884 A (F. GOMET) 8 juin 1970 * page 1, ligne 21-23; revendications * ---	4,6,7, 9-13
D,X	FR 2 734 721 A (CLARINS) 6 décembre 1996 * page 4, ligne 1-10; revendications * ---	1,2,13
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 010, no. 112 (C-342), 25 avril 1986 & JP 60 239404 A (HITOSHI NAGAOKA), 28 novembre 1985, * abrégé * ---	4-13
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 095, no. 007, 31 août 1995 & JP 07 101835 A (POLA CHEM IND INC), 18 avril 1995, * abrégé * ---	4-13
A	US 4 338 293 A (HOLICK MICHAEL F) 6 juillet 1982 * colonne 1, ligne 22-25; revendications * -----	1-13
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
12 juin 1998		Orviz Diaz, P
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général 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		