

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 980 698**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **11 02948**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 8/97 (2013.01), A 61 K 36/03, A 61 Q 19/00,
A 61 P 17/00**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫2 Date de dépôt : 29.09.11.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 05.04.13 Bulletin 13/14.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : GELYMA Société à responsabilité limi-
tée — FR.

⑦2 Inventeur(s) : PELLEGRINI LILIANE, TILIAÇOS
CHRISTOPHE, PELLEGRINI MAX et GREGORI
GERALD.

⑦3 Titulaire(s) : GELYMA Société à responsabilité limi-
tée.

⑦4 Mandataire(s) : GELYMA Société à responsabilité
limitée.

⑤4 **UTILISATION D'UNE ASSOCIATION D'EXTRAITS D'ALGUES DESTINEES A LIMITER LES DESORDRES
CUTANES DE LA PEAU A TENDANCE GRASSE ET/OU ACNEIQUE.**

⑤7 La présente invention a pour objet l'utilisation d'une
association d'un extrait de la macroalgue *Fucus spiralis* et
d'un extrait de la microalgue *Tetraselmis chui* issu d'une
culture enrichie en oligoéléments, notamment en zinc pour
les domaines cosmétiques et /ou dermocosmétiques afin de
réguler la production de sébum et limiter les phénomènes
d'irritation, désordres cutanés liés à la peau à tendance
grasse et/ ou acnéique.

FR 2 980 698 - A1



- 1 -

UTILISATION D'UNE ASSOCIATION D'EXTRAITS D'ALGUES
DESTINEE A LIMITER LES DESORDRES CUTANES DE LA PEAU A
TENDANCE GRASSE ET/OU ACNEIQUE

5

La présente invention concerne le domaine des produits cosmétiques et/ou dermocosmétiques, plus particulièrement destinés à limiter les désordres cutanés liés à la peau à tendance grasse et/ou acnéique.

10

La peau grasse se caractérise par une sécrétion et une excrétion exagérées de sébum. Elle apparaît épaisse et luisante. Elle présente des orifices folliculaires dilatés. Elle est facilement irritable et sujette à des complications inflammatoires conduisant à une tendance acnéique. Ces complications peuvent être déclenchées par de nombreux facteurs, notamment par la prolifération des bactéries à la surface

15 de la peau et par la présence d'acides gras libres qui subissent des oxydations et des peroxydations provoquant la formation de radicaux libres, générateurs de phénomènes inflammatoires.

La peau grasse à tendance acnéique se caractérise par des imperfections

20 cutanées, des rougeurs, des pores dilatés, l'apparition de comédons et de microkystes ainsi que le développement de boutons enflammés et de pustules dû à la prolifération de certaines bactéries dans les microkystes. En fait l'acné est une affection due à trois principaux évènements : une augmentation de la sécrétion de la glande sébacée, elle-même sous la dépendance androgénique, une rétention du

25 sébum et une inflammation résultant de la colonisation bactérienne libérant des médiateurs inflammatoires dans le follicule puis dans le derme.

Il n'existe pas de principe actif capable d'agir seul sur tous ces facteurs et les éléments combinés surtout à des antibiotiques sont des molécules

30 thérapeutiques réservées aux traitements médicamenteux et interdites dans les produits d'hygiène et les cosmétiques.

- 2 -

Le traitement cosmétique de ce type de peau à tendance grasse et/ou à tendance acnéique implique en général l'application topique sur la peau de composés capables de diminuer l'activité sécrétrice de sébum, et/ou de limiter l'excrétion de sébum en surface, et/ou de supprimer la prolifération microbienne et
5 /ou de limiter l'irritation cutanée.

Plusieurs composés susceptibles d'offrir une solution à certains facteurs ont été proposés dans l'art antérieur, notamment

- des extraits de plantes diverses, notamment la Reine des prés (FR 2 897 778),
10 l'Olivier (FR 2 830 195), *Commiphora myrrha* (FR 2 781 372), *Spiraea ulmaria* (FR 2 835 184), *Lens culinaris* ou *Lens esculenta* (FR 2 945 209),
- des extraits de Champignons, notamment *Poria cocos* (US 5,716,800),
- des microorganismes, notamment du genre *Lactobacillus* et/ou *Bifidobacterium* (FR 2 938 437, US 2010/0278 793A1),
- 15 - des composés chimiques seuls ou en association, notamment des sels d'ammoniums quaternaires (FR 2 826 269), divers acides seuls ou en association (FR 2 822 066, WO 2011/001111 A2) de la chrysine (FR 2 906 716), du salicylate de zinc (FR 2 9 40 121) ou autres dérivés du zinc (FR 2 829 937).

20 Les documents FR 2 753 903, US 62 07 438 proposent un produit présentant un effet bénéfique vis-à-vis de l'acné. Il s'agit d'extraits d'alginate de sodium, préparés à partir d'algues brunes (de préférence de *Laminaria digitata*), soumis à un traitement de dépolymérisation enzymatique au moyen d'une alginate lyase puis additionnés d'une solution contenant des minéraux, notamment des ions
25 zinc. Le chélate oligosaccharide-Zn ainsi formé présente à la fois un effet inhibiteur de l'activité de l'enzyme 5 alpha-réductase et un effet inhibiteur de la souche bactérienne pathogène *Propionibacterium acnes*, ce qui confère à ce chélate un effet anti-acné. Il est reconnu que les sels de zinc, gluconate, lactate, sulfate, undecylenate, pidolate possèdent une action sébo-statique et anti-septique.

30

Toutefois il persiste toujours le besoin de disposer de compositions cosmétiques et/ou dermocosmétiques permettant d'éviter les troubles cutanés liés à

- 3 -

la peau grasse et/ou la peau à tendance acnéique, notamment la formation des radicaux libres, le déclenchement des processus irritants et la surproduction de sébum.

5 C'est dans ce contexte que les auteurs de la présente invention proposent d'utiliser une association d'extraits d'algues, notamment un extrait de macroalgues et un extrait de microalgues pour améliorer l'état de la peau à tendance grasse et/ou à tendance acnéique.

10 Dans une forme de réalisation préférée du mélange selon l'invention, l'extrait de macroalgues est issu de l'algue brune *Fucus spiralis* et l'extrait de microalgues est issu de la microalgue verte *Tetraselmis chui* provenant d'une culture enrichie en oligoéléments, notamment en zinc.

15 On a décrit dans l'art antérieur l'utilisation d'extraits de macroalgues et d'extraits de microalgues pour des usages cosmétiques et/ou dermocosmétiques.

En ce qui concerne l'utilisation cosmétique et/ou dermocosmétique des macroalgues, les extraits issus de diverses espèces présentent des activités
20 particulièrement utiles au soin de la peau et des phanères, notamment des activités protectrices vis-à-vis des radicaux libres ou de stress divers (FR 2 837 383, FR 2 838 342, FR 2 867 072), des activités anti-irritantes (FR 2 838 340, FR 2 838 341), des activités dépigmentantes (FR 2 911 278, FR 2 942 136, FR 2 946 878) ou encore des activités amincissantes (FR 2 844 449). Ces activités
25 dépendent du groupe taxonomique choisi, de l'espèce algale sélectionnée et du type d'extrait préparé.

A la connaissance des inventeurs l'algue *Fucus spiralis* a fait l'objet de peu d'études en rapport avec une utilisation cosmétique et/ou dermocosmétique.

30 Le brevet GB 70 0663 se rapporte à l'utilisation du mucilage présent dans les conceptacles de *Fucus spiralis* comme pommade contre les brûlures, les gerçures et les engelures. L'hydrocolloïde extrait du *Fucus spiralis* sert aussi

- 4 -

d'élément constitutif d'un article chaussant afin d'absorber au moins une partie de la transpiration puis de désorber la transpiration absorbée (FR 26 90 816).

En ce qui concerne l'utilisation cosmétique et/ou dermocosmétique des microalgues, des extraits ont montré diverses activités appropriées pour le soin de la peau.

Le brevet FR 2 657 012 décrit l'utilisation de divers extraits d'algues microscopiques à activité antiradicalaire, pour des usages cosmétiques, alimentaires et agricoles. Les algues utilisées individuellement sont notamment choisies dans les genres *Dunaliella*, *Nannochloris*, *Tetraselmis*, *Chroomonas*, *Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*, *Isochrysis* et *Pavlova*. Le mode d'extraction est décrit mais aucun détail n'est fourni quant au mode de culture des algues sélectionnées.

15

Le brevet FR 2 894 473 concerne aussi l'utilisation d'extraits de microalgues en culture, notamment des genres *Chromulina*, *Asterionella* et *Tetraselmis*, le milieu de culture précisé étant à base d'eau de mer naturelle ou synthétique montrant une salinité bien définie. Les revendications mentionnées se rapportent à l'augmentation de la fermeté de la peau et l'amincissement de la peau.

20

Le brevet FR 2 676 454 se rapporte à l'utilisation de *Tetraselmis* dans de l'eau de mer reconstituée pour la thalassothérapie. La microalgue *Tetraselmis* peut être également incorporée dans des gels de carraghénane (FR 2 683 720). Dans ces deux derniers documents, il s'agit du même mode de culture de *Tetraselmis* que pour le document FR 2 894 473. Il n'est nullement question de culture enrichie en molécules actives.

25

D'autres documents se rapportent à l'utilisation cosmétique d'extraits de *Tetraselmis*, notamment de *Tetraselmis suecica* pour des activités antioxydantes, anti-inflammation, dépigmentantes et/ou anti-bactériennes (KR 2009 0025 431, KR 2009 0092 862) ou des activités anti-rides et protectrices vis-à-vis des UV

30

(KR 2011 0044 494). Il peut aussi s'agir d'activités modifiant la croissance et la pigmentation des cheveux et les taux de filagrine et d'involucrine dans la peau (EP 2 193 785, US 2010 14 32 67). Aucune précision n'est fournie quant au mode de culture de la microalgue, seule est détaillée la préparation des extraits.

5

Le brevet FR 28 58 771 concerne une association d'un extrait de macroalgues, notamment de *Macrocystis pyrifera* et d'un extrait de *Tetraselmis suecica* pour améliorer le relief et le micro-relief cutanés, en particulier en diminuant la profondeur des rides. La microalgue est obtenue en culture pure dans
10 de l'eau de mer de salinité définie, telle que trouvée dans l'Océan Atlantique.

Le brevet FR 2 896 692 s'adresse à une association de la microalgue *Cyclotella* et de la macroalgue *Padina pavonica* utilisée dans le traitement de phénomènes douloureux ou d'irritation en apportant une sensation de soulagement
15 et/ou de plaisir durable après un traumatisme ou une plaie importante. Aucune information n'est apportée quant aux méthodes de culture des algues et aux modes d'obtention des extraits utilisés.

Le brevet EP 1 437 124 se rapporte à une composition complexe
20 comprenant notamment un sel de zinc et un extrait de microalgue verte, en particulier de la souche *Chlamydomonas reinhardtii* connu pour stimuler les cellules épidermiques, cette microalgue étant issue de cultures classiques, non enrichies en molécules actives.

25 La présente invention concerne une association d'un extrait de macroalgues, issu de l'algue brune *Fucus spiralis* et d'un extrait de la microalgue verte *Tetraselmis*, notamment *Tetraselmis chui* provenant d'une culture enrichie en zinc.

Tetraselmis chui se distingue de *Tetraselmis suecica* par sa composition chimique, notamment sa richesse en protéines, lipides et chlorophylle a.
30

Il est bien connu dans l'art antérieur que l'accumulation de molécules à forte valeur ajoutée peut être pratiquée pendant la culture de microorganismes, notamment des microalgues en jouant sur les facteurs environnementaux.

- 6 -

En fonction du métabolite recherché ou de l'activité souhaitée, le forçage (ou induction physiologique) peut être induit en agissant sur divers paramètres, notamment en intervenant sur la température de la culture, l'exposition à la lumière ou l'enrichissement du milieu de culture en divers composés inducteurs.

5

Ainsi, en modifiant les paramètres de culture et de préparation des microorganismes, on peut induire chez les microalgues, la production de divers métabolites tels des pigments, notamment de la phycoérythrine, du carotène ou de l'astaxanthine (FR 2 656 874, FR 2 696 475, FR 2 703 692, FR 2 789 399), des superoxydismutases et autres anti-oxydants (FR 2 656 874, FR 2 706 465, FR 2 785 909, FR 2 785 910), des lipides polyinsaturés et divers acides gras notamment l'acide eicosapentaénoïque (FR 2 686 619, FR 2 696 475), des vitamines, notamment la vitamine C (WO 2004/07 00 44, US 5 521 090) ou toutes autres molécules biologiquement actives, par exemple des anti-inflammatoires, des antibiotiques, des hormones, des polyamines (FR 2 827 301, WO 2004/070044, WO 2004/071519).

On peut aussi induire la bioaccumulation par les microalgues d'oligoéléments particuliers, tels le chrome, le cuivre, le fer, le magnésium, le manganèse, le zinc ou encore le sélénium (FR 2 935 394, FR 2 612 399, FR 2 626 890, FR 2 929 957, WO 2004/071519), ces oligoéléments pouvant aussi être complexés aux exopolysaccharides algaux (WO 2009/144 711).

Ces microorganismes et microalgues diversement enrichis en molécules biologiquement actives sont utilisés à des fins pharmaceutiques, alimentaires et/ou cosmétiques, notamment pour leurs activités anti-oxydantes et activités pro-cicatrisantes (FR 2 785 910, WO 00 75 282).

Il peut s'agir de bactéries, notamment *Lactobacillus* (WO 92 21749), de Cyanobactéries, notamment *Spirulina* (Brevet FR 2 789 399, Fr 2 929 957, WO 2004/070044), de microalgues diverses, notamment *Porphyridium cruentum* (FR 2 696 475, FR 2 686 619, FR 2 656 874, FR 2 785 909, FR 2 785 910), *Dunaliella*

30

- 7 -

salina (FR 2 696 475), *Haematococcus pluvialis* (FR 2 656 874, FR 2 703 692),
5 *Scenedesmus* (FR 2 626 890) ou *Chlorella* (FR 2 626 890).

Un enrichissement en méthionine a été expérimenté chez *Tetraselmis* (WO
5 2004 / 07 0044).

Mais, à la connaissance des inventeurs, l'utilisation de la microalgue
Tetraselmis, notamment de *Tetraselmis chui* issu d'une culture enrichie en
oligoéléments et notamment en zinc, pour les domaines cosmétiques et/ou
10 dermocosmétiques afin de traiter les désordres liés à la peau grasse et/ou à tendance
acnéique n'a pas été envisagée.

Les auteurs de la présente invention ont découvert que les extraits de la
microalgue *Tetraselmis*, notamment de *Tetraselmis chui* issu d'une culture
15 enrichie en zinc, en association avec un extrait de macroalgues, notamment de
Fucus spiralis, présentent diverses activités biologiques, associées à une grande
tolérance cutanée, les rendant directement utilisables dans des compositions à
usage cosmétique et/ou dermatologique destinées au traitement et/ou à la
prévention des désordres cutanés associés à la peau grasse et /ou à la peau à
20 tendance acnéique liés notamment à la formation des radicaux libres, au
déclenchement des processus irritants et inflammatoires et à la formation excessive
de sébum.

Dans un mode de réalisation avantageux, les extraits d'algues selon la
25 présente invention sont des extraits aqueux caractérisés en ce que l'on réalise
l'extraction à partir de thalles et/ou de cellules sous forme fraîche, congelée, sèche,
entière, fragmentée ou broyée.

Les extraits sont avantageusement obtenus par macération des thalles et/ou
30 de cellules dans un solvant ou un mélange de solvants suivie d'une filtration et
d'une centrifugation pour éliminer les particules.

- 8 -

Dans un mode préféré de réalisation de la présente invention, les extraits ainsi obtenus peuvent être calibrés par des ultrafiltrations et concentrations successives afin d'obtenir un extrait de poids moléculaire compris entre 5 000 à 500 000 Daltons.

5

A titre de solvants avantageusement employés, on citera l'eau, les solvants chlorés tel que le chloroforme, les éthers tels que l'éther éthylique, l'acétone, les esters en C2 à C8 tels que l'acétate d'éthyle et l'acétate de butyle, des alcools en C1 à C6 tels que le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol et le butanol, des polyols en
10 C2 à C6 tels que le propylène glycol et le butylène glycol, sans que cette liste soit limitative. Ces solvants peuvent être utilisés seuls ou en mélange.

L'extraction peut être renouvelée plusieurs fois jusqu'à épuisement de la matière première conformément aux procédés bien connus de l'homme de l'art. La
15 proportion en masse entre le solvant et le matériau à extraire peut varier dans de larges limites. Plus précisément elle peut être comprise entre 20:1 et 5:1 et de préférence 10:1.

Des améliorations, optimisations et modifications du procédé de préparation
20 des extraits sont envisageables. A la place de la macération simple, on peut employer les techniques à contre courant, la décoction, la lixiviation, l'extraction sous reflux, l'extraction à l'aide d'ultrasons ou de micro-ondes associée ou non aux solvants, l'extraction au moyen de fluides supercritiques, sans que cette liste soit limitative.

25

Pour certaines applications cosmétiques, il peut s'avérer judicieux de concentrer et de purifier l'extrait liquide ou encore de préparer un extrait sec à partir d'extrait liquide par exemple par des techniques classiques de séchage, précipitation, évaporation, atomisation ou lyophilisation.

30

L'objet de la présente invention consiste donc en l'utilisation d'une association d'extraits d'algues du genre *Fucus* et du genre *Tetraselmis*, notamment

de *Fucus spiralis* et de *Tetraselmis chui* en tant que principe actif pour la préparation de compositions cosmétiques et/ou dermatologiques à usage topique destinées au soin de la peau à tendance grasse et/ou à tendance acnéique.

- 5 Les avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples donnés à titre illustratif et non limitatif.

Exemple n°1 : Obtention du principe actif selon l'invention

- 10 L'extrait de *Fucus spiralis* est obtenu à partir de thalles broyés que l'on extrait à l'aide d'un solvant, de préférence l'eau. La suspension est ensuite filtrée et centrifugée pour éliminer les particules. Le surnageant est alors soumis à des ultrafiltrations successives de façon à obtenir un extrait de poids moléculaire compris entre 5 000 à 500 000 Daltons. L'extrait est concentré jusqu'à la
15 calibration de ses activités. Il est enfin filtré et stérilisé.

- Les cellules de *Tetraselmis chui* sont obtenues après concentration et centrifugation d'une culture enrichie en zinc, notamment en sulfate de zinc (doses comprises entre 10 ppm et 5000 ppm). La durée de bioaccumulation est de
20 préférence comprise entre 1 et 20 heures. Les microalgues sont ensuite récoltées, rincées et éventuellement congelées sous vide avant l'extraction. L'extrait utilisé pour le mélange selon l'invention est le broyat cellulaire entier ou la partie débarrassée des débris membranaires par filtration et/ou centrifugation de la pâte d'algues obtenue à partir de la culture. Il est obtenu de préférence par dispersion
25 dans de l'eau. Selon une forme de réalisation particulière, les débris membranaires des algues sont éliminés. L'extrait de *Tetraselmis chui* ainsi obtenu présente une teneur en zinc comprise entre 10 ppm et 2000 ppm. Il peut être soumis à des ultrafiltrations successives de façon à obtenir un extrait de poids moléculaire compris entre 5 000 à 500 000 Daltons. L'extrait est concentré jusqu'à la
30 calibration de ses activités. Il est enfin stérilisé.

- 10 -

Dans l'association selon l'invention, la proportion de l'extrait de *Fucus spiralis* par rapport à l'extrait de *Tetraselmis chui* est comprise entre 1/10 et 10/1, de préférence entre 40/60 et 60/40.

5 Ce mélange permet d'obtenir un principe actif dont l'efficacité a été testée vis-à-vis de différentes propriétés cosmétiques.

Exemple n°2 : Etude du potentiel anti-oxydant du principe actif obtenu selon l'invention

10

Les radicaux libres sont des constituants chimiques très réactifs intervenant dans de nombreux mécanismes cellulaires. S'ils sont incontrôlés, ils peuvent réagir rapidement avec des molécules avoisinantes et donner naissance à des produits toxiques pour le fonctionnement cellulaire. Il en découle un stress oxydant
15 provoquant des dégâts importants au niveau, des membranes cellulaires et de l'ADN. L'organisme possède des mécanismes de défense qui s'avèrent parfois insuffisants. En particulier les systèmes de défense sont significativement diminués dans la peau à tendance acnéique.

20 L'objet de cette étude est d'évaluer les capacités anti-oxydantes du principe actif obtenu selon l'invention par le test DPPH.

Le DPPH (1,1-diphényl-2-picryl hydrazyl) est un radical libre stable coloré en violet. Il est peu spécifique mais permet d'évaluer le potentiel anti-oxydant d'une substance (« effet scavenger »). Le taux de réduction du radical DPPH est
25 évalué par le changement d'absorbance d'une solution de DPPH en présence et en absence de ladite substance à 517nm. Le mélange d'extraits d'algues préparé selon l'invention est testé à quatre concentrations différentes (0,2%- 0,5%- 1%- et 2%). Chaque essai est réalisé en triple.

30 Les résultats des moyennes de ces essais figurent dans le tableau inséré ci-après. Ils sont exprimés en pourcentages d'inhibition du DPPH par rapport au témoin sans extrait.

- 11 -

	DPPH Pouvoir anti-oxydant (%)
Témoïn	0
Association selon l'invention à 0.2%	4.1
Association selon l'invention à 0.5%	15.1
Association selon l'invention à 1%	25.6
Association selon l'invention à 2%	37.0
Association selon l'invention à 5%	56.9

Aux concentrations testées, le mélange présente un pouvoir réducteur dose -
5 dépendant vis-à-vis du DPPH.

Plus précisément, plus la concentration en extrait obtenu selon l'invention augmente, plus le pouvoir anti-oxydant (« pouvoir scavenger ») est important.

De fait l'utilisation de l'association d'extraits d'algues, notamment de
10 *Fucus spiralis* et *Tetraselmis chui* selon l'invention en tant que principe actif s'avère avantageux pour la préparation d'une composition cosmétique et/ou dermatologique destinée à limiter la formation des radicaux libres.

15 **Exemple n°3 : Etude de l'activité protectrice contre l'inflammation du principe actif obtenu selon l'invention**

L'inflammation est une réponse physiologique normale et immédiate à toute agression, qu'elle soit mécanique ou infectieuse. Les kératinocytes participent activement à la défense immunitaire : ils sécrètent des cytokines, dont
20 l'Interleukine-8 (IL-8) qui crée un gradient chimiotactique attirant les cellules impliquées dans l'inflammation, particulièrement les neutrophiles. Ces derniers jouent un rôle crucial dans la peau car, en infiltrant les zones irritées, ils libèrent non seulement des radicaux libres mais également des enzymes telles que l'élastase leucocytaire ou des métalloprotéïnases contribuant ainsi à la dégradation des fibres
25 élastiques du tissu conjonctif et plus généralement de la matrice extracellulaire

Le TNF- α est non seulement impliqué dans la réaction inflammatoire cutanée mais il induit également la production de substance P et de neurotrophines

qui contrôlent la densité de l'innervation cutanée. Cette cytokine constitue donc un lien important entre le système nerveux et immunitaire (Paterson, S., Schmelz, M., McGlone, F., Turner, G and Rukwied, R. Facilitated neurotrophin release in sensitized human skin. Eur. J. Pain 13 : 399-405, 2009).

5 Par ailleurs, une augmentation du taux de TNF- α est rapportée dans la dermatite atopique, le psoriasis ou la dermatite de contact.

Le but de cette étude est de quantifier la production d'IL-8 et de TNF- α dans des surnageants cellulaires de kératinocytes humains normaux traités pendant 24H
10 en présence du mélange préparé selon l'invention, testé à des doses non cytotoxiques puis stimulés par l'IL-1 β ou le phorbol myristate acétate (PMA) pendant 24 h, toujours en présence du mélange.

Schématiquement, des kératinocytes humains normaux sont mis en culture
15 jusqu'à obtention de cellules confluentes à 80%. Les cellules sont traitées pendant 24H avec le produit à évaluer puis elles sont stimulées 24H avec de l'interleukine-1 β (1ng/ml : libération de IL-8) ou du phorbol myristate acétate (PMA à 500 ng/ml : libération de TNF- α) en présence du produit. Certains puits traités ne reçoivent pas de stimulation. En fin d'expérience, les surnageants contenant les cytokines sont
20 recueillis et conservés à -20°C en attente du dosage.

La quantification des cytokines humaines s'effectue au moyen de tests en microplaque ELISA. Un dosage protéique est réalisé pour chaque puits de la microplaque cellulaire de façon à exprimer la quantité de cytokines libérées en
25 pg/ml/ μ g de protéines.

Les essais sont réalisés en triple et les moyennes sont comparées (test t de Student - comparaison des moyennes - différence significative à 95% si $p < 0,05^*$ et à 99% si $p < 0,01^{**}$).

30 Les pourcentages d'inhibition du principe actif préparé selon l'invention sont calculés pour chaque concentration des produits soumis à la stimulation selon la formule ci-après :

- 13 -

% Inhibition de la stimulation = $100 \times [1 - (\text{valeur stimulée } \textit{Traitement} / \text{valeur stimulée } \textit{Témoin})]$.

Les tableaux insérés à la page suivante montrent les résultats relatifs (1) à la libération d'IL-8 sous stimulation avec IL-1 β en présence du mélange obtenu selon l'invention et (2) à la libération de TNF- α sous stimulation avec le PMA en présence du mélange obtenu selon l'invention.

	IL-8 (pg/ml/ μ g protéines)	% Inhibition	IL-8 induite par IL-1 β (pg/ml/ μ g protéines)	% Inhibition
Témoin	6,8 \pm 2,9	-	58,7 \pm 6,7	-
SEBOCEA® à 2%	17,7 \pm 2,1	-	53,3 \pm 2,0	9% ns
SEBOCEA® à 1%	8,1 \pm 1	-	26,9 \pm 0,9	54% **
SEBOCEA® à 0,5%	6,5 \pm 1,8	-	30,8 \pm 3,8	48% **
SEBOCEA® à 0,25%	5,5 \pm 1,4	19% ns	36,8 \pm 3,8	37% **
Dexaméthasone 64 μ M	1,3 \pm 0,3	80% *	30,8 \pm 2,7	48% **

	TNF- α (pg/ml/ μ g protéines)	% Inhibition	TNF- α induite par le PMA (pg/ml/ μ g protéines)	% Inhibition
Témoin	nd	-	3 \pm 0,5	-
SEBOCEA® à 2%	0,2 \pm 0	-	1,5 \pm 0,1	50% **
SEBOCEA® à 1%	0,2 \pm 0	-	0,9 \pm 0,2	70% **
SEBOCEA® à 0,5%	0,0 \pm 0,1	-	1,4 \pm 0,2	53% **
SEBOCEA® à 0,25%	0,2 \pm 0,2	-	1,4 \pm 0,3	53% **
Dexaméthasone 64 μ M	nd	-	0,8 \pm 0,1	73% **

10 Moyenne de 3 essais \pm écart-type

** : $p < 0,01$ (test de Student) – Résultats très significatifs à 99%.

* : $p < 0,05$ (test de Student) – Résultats significatifs à 95%.

ns : résultat non significatif - nd : résultat non détectable.

15 Le principe actif préparé selon l'invention induit une inhibition statistiquement très significative de la production d'IL8 aux concentrations de 1%, 0,5% et 0,25 % (% d'inhibition de 54%, 48% et 37%, respectivement, $p < 0,01$).

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec le standard : la dexaméthasone.

Le principe actif préparé selon l'invention inhibe également de manière très importante la production de TNF- α à toutes les concentrations de 2%, 1%, 0,5 % et 0,25 % (% d'inhibition de 50 %, 70 %, 53 % et 53 %, respectivement, $p < 0,01$).

5

En conclusion, Le principe actif préparé selon l'invention possède de puissantes propriétés anti inflammatoires.

Exemple n° 4 : Etude de l'activité inhibitrice de la 5 alpha-réductase

10 **du principe actif obtenu selon l'invention**

L'activité de la 5 alpha-réductase est mesurée par dosage de la 5 alpha-dihydrotestostérone (DHT) formée après métabolisation de la testostérone radiomarquée dans une culture de fibroblastes dermiques humains en monocouche.

15 Les effets du principe actif obtenu selon l'invention ont été comparés à ceux obtenus en présence du finastéride, inhibiteur de référence (dose 20 μ M).

Schématiquement, des fibroblastes humains ont été traités pendant 24 H en présence du principe actif obtenu selon l'invention (trois doses non cytotoxiques :
20 2mg/ml, 10 mg/ml et 20 mg/ml). Le milieu a ensuite été additionné de testostérone tritiée et le traitement s'est poursuivi pendant 24 H. Les stéroïdes marqués ont été extraits du surnageants de culture puis déposés sur des plaques de gel de silice de chromatographie en couche mince. Ils ont été enfin quantifiés.

25 Les valeurs du dosage de la 5 alpha-dihydrotestostérone (DHT) ont été calculées à partir des mesures de radioactivité effectuées sur les fractions DHT. Ces valeurs de DHT (dpm/puits) ont été exprimées en % de la radioactivité totale des stéroïdes. Les valeurs obtenues ont été ensuite corrigées par le taux de protéines cellulaires évalué par la méthode de Coomassie. Les essais ont été
30 réalisés en triple et validés statistiquement par le test de Student.

- 15 -

Les résultats sont regroupés ci-après.

	Témoin	Traitement avec le principe actif			Finasteride
		2 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	20 µM
DHT (% Total)	1.15+/-0.11	1.13 +/- 0.09	0.67 +/- 0.03	1.14 +/- 0.06	0.00 +/- 0.00
DHT /mg prot.	2.42 +/- 0.23	2.34 +/- 0.19	1.39 +/- 0.06	2.41 +/- 0.12	0.00 +/- 0.00
Activité de la 5 alpha réductase	100 +/- 9.4	96.6 +/- 8.0	57.6 +/- 2.3	99.8 +/- 5.0	0.0 +/- 0.0

Le principe actif préparé selon l'invention induit une inhibition de l'activité de la 5 alpha-réductase, notamment de 42% à la dose de 10mg/ml ($p < 0.01$).

En conclusion, Le principe actif préparé selon l'invention possède des activités inhibitrices de la 5 alpha réductase.

10 **Exemple n° 5 : Etude de l'activité anti-séborrhéique du principe actif obtenu selon l'invention**

Cette étude est réalisée in vivo sur 20 volontaires ayant entre 20 et 60 ans et ayant une peau grasse à tendance acnéique.

15 On effectue des mesures de la production de sébum grâce à un patch commercialisé sous la dénomination « Sebutape », ceci avant et après 28 jours d'application biquotidienne d'un gel contenant 3% de principe actif obtenu selon l'invention. Le patch est appliqué 6 secondes à la surface de la peau sous des conditions ambiantes soigneusement contrôlées. Les tâches obtenues sont ensuite
20 analysées par traitement d'images.

Le tableau inséré ci-après regroupe les résultats obtenus.

	T0			T 28 jours			% front	% joue	% moyen
	Front	Joue	Moyenne	Front	Joue	Moyenne			
Moyenne	14,67	8,9	11,79	8,26	6,36	7,31			
Ecart type	13,17	8,36	8,61	8,20	6,37	5,64	- 44%	- 29%	-38%

- 16 -

Après 28 jours d'utilisation du principe actif obtenu selon l'invention, dosé à 3% dans un gel, nous observons

- une amélioration significative de 44% au niveau du front ($p=0.015$) du taux de sébum avec 75% de sujets répondants
- 5 - une amélioration non significative de 29% au niveau des joues ($p=0.093$) du taux de sébum avec 63% de sujets répondants
- une amélioration significative de 38% de manière globale ($p=0.019$) du taux de sébum avec 69% de sujets répondants.

10 En conclusion, Le principe actif préparé selon l'invention possède des activités régulatrices de la production de sébum.

Les exemples exposés ci-dessus démontrent que le mélange préparé selon l'invention, à partir de la macroalgue du genre *Fucus* notamment *Fucus spiralis* et de la microalgue *Tetraselmis chui* soumises à des conditions particulières de culture enrichie en zinc, peut avantageusement être utilisé dans différentes applications cosmétiques et dermatologiques.

La présente invention a donc pour objet des compositions cosmétiques et/ou dermatologiques à usage topique pour la peau. Les dites compositions contiennent, seul ou en association avec au moins un autre principe actif dans un excipient approprié pour une application topique, le mélange préparé selon l'invention, à partir de la macroalgue *Fucus spiralis* et de la microalgue *Tetraselmis chui* soumise à des conditions particulières de culture enrichie en zinc

25

La composition finale du principe actif obtenu selon l'invention destiné à être utilisé dans lesdites compositions consiste dans une proportion pouvant varier entre 0,1% et 40 % (p/p), préférentiellement entre 0,1 et 10 %.

30

Diverses formes de formulations pour applications topiques peuvent être réalisées. Elles incluent toute forme galénique employée en cosmétique et / ou en dermocosmétique acceptable c'est-à-dire compatible avec la peau notamment les

polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, émulsions H/E et E/H ou émulsions multiples, laits, lotions, gels, pommades, huiles corporelles, shampooings, savons, sticks et crayons, patchs, sprays, sans que cette liste soit limitative.

5

Le mélange d'extraits d'algues préparé selon l'invention, peut être combiné dans lesdites compositions cosmétiques et/ou dermatologiques avec tout autre ingrédient habituellement utilisé dans les formulations : lipides d'extraction et/ ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits de plantes, extraits marins, extraits tissulaires, antioxydants, colorants, conservateurs, parfums sans que cette liste soit limitative.

Il est possible d'incorporer cet extrait algal obtenu selon l'invention dans tout vecteur cosmétique adéquat comme par exemple des agents filmogènes, des liposomes, des chylomicrons, des cyclodextrines, des micelles, des macro-, micro- et nanoparticules des macro-, micro- et nanocapsules, ou encore de les absorber sur des polymères organiques et des supports minéraux.

Il est également possible d'incorporer le mélange préparé selon l'invention dans des textiles pour en assurer une libération topique continue.

Bien entendu, l'Homme de métier veillera à choisir les éventuels composés complémentaires de telle sorte que les propriétés avantageuses de l'association des deux d'algues selon l'invention ne soient pas altérées par l'adjonction envisagée.

REVENDEICATIONS

1 – Utilisation d'une association d'agents actifs caractérisée en ce qu'elle comprend un extrait de macroalgues et un extrait de microalgues, pour la
5 préparation d'un produit cosmétique et/ou dermocosmétique à usage topique pour la peau à tendance grasse et/ou acnéique.

2 - Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrait de macroalgues est issu de thalles de l'algue brune *Fucus spiralis*.

10

3 - Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrait de microalgues est issu de cellules de *Tetraselmis chui* obtenu à partir d'une culture enrichie en zinc.

15 4 - Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 en ce que l'on réalise l'extraction à partir de thalles ou de cellules des dites algues sous forme fraîche, congelée, sèche, entière, fragmentée ou broyée.

5 - Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 en ce que
20 lesdits extraits sont obtenus par macération de thalles et de cellules des dites algues, suivie de filtrations, centrifugations, ultrafiltrations et concentrations.

6 - Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 en ce que le solvant d'extraction est choisi parmi le groupe formé par l'eau, les alcools, les
25 cétones, les esters, les polyols, les solvants chlorés et les mélanges d'au moins deux des solvants précités.

7 - Utilisation selon les revendications 1 à 6 en ce que la macération peut être remplacée par des techniques à contre courant, la décoction, l'extraction sous
30 reflux, l'extraction à l'aide d'ultrasons, de micro-ondes associée ou non aux solvants, l'extraction par des fluides supercritiques, notamment le CO₂ supercritique avec ou sans co-solvant.

- 19 -

8 - Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisées en ce que ledit extrait est utilisé soit sous forme liquide soit sous forme sèche obtenue par des techniques classiques de séchage, précipitation, atomisation, évaporation ou lyophilisation.

5

9 - Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisées en ce que la proportion de l'extrait de *Fucus spiralis* par rapport à l'extrait de *Tetraselmis chui* est comprise entre 1/10 et 10/1 et de préférence entre 40/60 et 60/40.

10

10- Composition cosmétique et/ou dermocosmétique caractérisée en ce qu'elle comprend de 0.1 à 10 % en poids d'une association d'extraits d'algues selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 dans un véhicule approprié pour une application topique.

15

11- Composition cosmétique et/ou dermocosmétique selon la revendication 10 caractérisée en ce qu'elles se présentent sous forme de crèmes, de gels, de laits, de suspensions, d'émulsions O/W ou W/O, de liposomes ou de mousses, sans que cette liste soit limitative.

20

12- Composition cosmétique et/ou dermocosmétique selon les revendications 10 et 11, incluant le principe actif selon l'une des revendications 1 à 9, ayant une activité destinée à lutter contre les radicaux libres.

25

13- Composition cosmétique et/ou dermocosmétique selon les revendications 10 et 11, incluant le principe actif selon l'une des revendications 1 à 9, ayant une activité destinée à limiter les phénomènes d'irritation de la peau.

30

14- Composition cosmétique et/ou dermocosmétique selon les revendications 10 et 11, incluant le principe actif selon l'une des revendications 1 à 9, ayant une activité destinée à inhiber l'activité de la 5 alpha-reductase, enzyme impliquée dans la production de sébum.



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

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

FA 757325
FR 1102948

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	FR 2 921 561 A1 (THOREL JEAN NOEL [FR]) 3 avril 2009 (2009-04-03) * page 2, ligne 15 - ligne 31 * * page 5, ligne 5 - ligne 10 * * page 6 - page 8 * * revendication 8 *	1,4-8, 10,11,13	A61K8/97 A61K36/03 A61Q19/00 A61P17/00
X,D	US 2010/143267 A1 (PERTILE PAOLO [IT] ET AL) 10 juin 2010 (2010-06-10) * alinéa [0038] - alinéa [0039]; revendication 7 *	1,4-8, 10-14	
X	FR 2 893 251 A1 (COURTAGE ET DE DIFFUSION CODIF [FR]) 18 mai 2007 (2007-05-18) * page 9, ligne 6 - page 10, ligne 11; revendications 1,4,13 *	1-11,13	
X,D	FR 2 657 012 A1 (SECMA [FR]) 19 juillet 1991 (1991-07-19) * revendications 1,3 *	1-12	
Y	WO 2004/070044 A1 (BRUNEAU FRANCOIS [FR]; HOURS-LINARES PEGGY [FR]) 19 août 2004 (2004-08-19) * page 1, ligne 6 - ligne 12 * * page 3, ligne 29 - ligne 34 * * page 6, ligne 17 - page 7, ligne 7 * ----- -/--	1-11,14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K A61Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 juin 2012		Sala-Jung, Nathalie	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		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.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 2



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement
national

FA 757325
FR 1102948

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, des parties pertinentes		
Y	<p>D. STAMATIADIS, MARIE-CLAIRE BULTEAU-PORTOIS, IRENE MOWSZOWICZ: "Inhibition of 5 alpha-reductase activity in human skin by zinc and azelaic acid", British Journal of Dermatology, vol. 119, no. 5 novembre 1988 (1988-11), 1988, pages 627-632, XP002677673, DOI: 10.1111/j.1365-2133.1988.tb03474.x Extrait de l'Internet: URL:http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10. 1111/j.1365-2133.1988.tb03474.x/pdf [extrait le 2012-06-13] * page 627 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-11,14	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		13 juin 2012	Sala-Jung, Nathalie
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		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	
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			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1102948 FA 757325**

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 **13-06-2012**

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 2921561	A1	03-04-2009	FR 2921561 A1	03-04-2009
			WO 2009047443 A2	16-04-2009

US 2010143267	A1	10-06-2010	EP 2193785 A2	09-06-2010
			US 2010143267 A1	10-06-2010

FR 2893251	A1	18-05-2007	AUCUN	

FR 2657012	A1	19-07-1991	AUCUN	

WO 2004070044	A1	19-08-2004	AU 2003214316 A1	06-09-2004
			WO 2004070044 A1	19-08-2004
			WO 2004071519 A1	26-08-2004
