

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 064 481**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **17 70319**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **A 61 K 8/99 (2017.01), A 61 Q 19/08, 19/00, C 12 N 1/  
12**

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 30.03.17.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 05.10.18 Bulletin 18/40.

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 :

Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : SOCIETE INDUSTRIELLE LIMOU-  
SINE D'APPLICATION BIOLOGIQUE Société ano-  
nyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : PAUFIQUE JEAN.

⑦3 Titulaire(s) : SOCIETE INDUSTRIELLE LIMOUSINE  
D'APPLICATION BIOLOGIQUE Société anonyme.

⑦4 Mandataire(s) : AQUINOV.

⑤4 UTILISATION D'UN EXTRAIT DE CHLORELLA SOROKINIANA EN COSMETIQUE ET EXTRAITS  
PARTICULIERS DE CHLORELLA SOROKINIANA.

⑤7 L'objet de l'invention est l'utilisation cosmétique d'un  
extrait de Chlorella sorokiniana dans une composition cos-  
métique en tant qu'agent cosmétique, ainsi qu'un extrait par-  
ticulier de Chlorella sorokiniana, des compositions l'incluant  
et un procédé cosmétique de soin de la peau.

FR 3 064 481 - A1



**UTILISATION D'UN EXTRAIT DE *CHLORELLA SOROKINIANA* EN COSMETIQUE  
ET EXTRAITS PARTICULIERS DE *CHLORELLA SOROKINIANA***

La présente invention se rapporte à l'utilisation cosmétique d'extraits de *Chlorella sorokiniana* comme agent cosmétique, en particulier pour raviver l'éclat du teint de la peau du visage, ainsi qu'à des extraits spécifiques de *Chlorella sorokiniana*. L'invention a également pour objet des compositions cosmétiques comprenant de tels extraits, et un  
5 procédé cosmétique de soin de la peau.

Les actifs cosmétiques agissent sur différentes voies pour procurer leur efficacité et améliorer l'aspect esthétique de la peau. Parmi les différentes voies, l'action sur les mitochondries des cellules de la peau a récemment été étudiée.

En effet, les cellules cutanées sont équipées de mitochondries, organites capables de  
10 produire de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) et qui disposent de leur propre ADN, l'ADN mitochondrial (ADNmt). Les mitochondries sont capables de changer de morphologie en fonction des conditions auxquelles elles sont soumises. Ces modifications sont rendues possibles grâce à un équilibre finement régulé entre deux processus : la fission et la fusion mitochondriale.

15 En fonction de leur état de santé, les mitochondries conditionnent le devenir des cellules et des tissus. Elles sont notamment connues pour influencer la prolifération et la différenciation épidermique (B Hamanaka R., Navdeep S. C. Mitochondrial metabolism as a regulator of keratinocyte differentiation. *Cellular Logistics*, 3, 1-5 (2013)).

Lorsqu'elle est en bonne santé, la mitochondrie joue le rôle d'usine énergétique en  
20 produisant de l'ATP. Toutefois, étant particulièrement sensible aux stress notamment oxydatif, son fonctionnement peut être modifié en cas de dommages. La production d'énergie est alors compromise et la production de molécules toxiques tels que les radicaux libres est anormalement accrue. Ces radicaux libres endommagent l'ADN mitochondrial qui, contrairement à son homologue nucléaire, dispose de moyens limités de protection  
25 engendrant ainsi une aggravation du dysfonctionnement de l'organite. De plus, la mitochondrie étant le siège de protéines impliquées dans la mort cellulaire, en cas de stress

aigus, des protéines telles que le cytochrome C peuvent être libérées et provoquer la mort de la cellule. A long terme, un dysfonctionnement mitochondrial chronique conduit à un vieillissement cutané accéléré.

En fonction du niveau de stress et des dommages mitochondriaux induits, trois systèmes de  
5 défense vont entrer en action (Andreux P., Riekelt H. Houtkooper R., Auwerx J. Pharmacological approaches to restore mitochondrial function. *Nature reviews*, 12, 465-483 (2013)).

En cas de faible stress, une première ligne de défense est mobilisée. Elle a pour mission  
10 d'empêcher, voir de réparer des dommages mitochondriaux mineurs. Elle fait intervenir des protéines chaperonnes qui agissent sur les protéines endommagées et des systèmes antioxydants qui vont prévenir les dommages oxydatifs induits sur les protéines et l'ADNmt. Trois protéines participent activement à ce premier niveau de défense : la sirtuine 3 (SIRT3), l'aconitase et la HSP27.

En cas de stress modéré, le niveau de dommages est plus important et compromet la  
15 fonctionnalité de la mitochondrie. Une seconde ligne de défense se met alors en place. Les propriétés dynamiques de la mitochondrie sont sollicitées. Un mécanisme de fusion mitochondriale est initié afin que le contenu de mitochondries saines et faiblement endommagées puisse être mélangé. Il en résulte l'obtention d'un pool de mitochondries homogènes et de nouvelle fonctionnelles.

20 En cas de stress aigu, les mitochondries subissent des dommages irréversibles et deviennent potentiellement dangereuses pour la cellule. Elles doivent alors être éliminées. Face à cette problématique, la troisième ligne de défense se met en action au travers du processus de mitophagie, une dégradation par autophagie spécifiquement dédiée aux mitochondries.

En raison du vieillissement chronologique ou d'agressions environnementales (radiations  
25 ultraviolettes, pollution, etc.), la peau est constamment en « état de stress ». A l'échelle cellulaire, les mitochondries sont les premières endommagées. Leur influence sur le tissu étant très importante, il existe un besoin important de fournir une solution cosmétique naturelle visant à préserver efficacement le fonctionnement de ces organites pour agir sur  
30 raviver le teint.

L'objectif de la présente invention est de répondre à ce besoin. A cet effet, l'invention propose d'utiliser un extrait d'une microalgue spécifique *Chlorella sorokiniana*.

Les microalgues sont à la base de la vie. Parmi les premiers organismes à apparaître sur terre, elles jouent un rôle capital dans les cycles biologiques et la biodiversité terrestre. Elles suscitent un grand intérêt car elles présentent de nombreux avantages :

- une biodiversité extraordinaire : il existe 30 000 espèces décrites et entre 200 000 à 1 million estimées. De par leur grande capacité d'adaptation, ces organismes sont capables de modifier leur métabolisme et de développer des systèmes de défense qui leur permettent de survivre indépendamment de leur environnement ;
- une richesse inépuisable en molécules actives très variées ;
- cultivables industriellement, leur production n'a pas d'impact sur l'environnement.

10 Toutes les espèces de microalgues sont différentes et présentent des compositions moléculaires distinctes qui leur confèrent leurs propriétés. Certaines d'entre elles, ou certains extraits de ces microalgues, présentent des propriétés cosmétiques mais les propriétés cosmétiques d'un extrait d'une microalgue particulière ne peuvent être appliquées au même extrait d'une autre microalgue. Ainsi, avec un procédé d'extraction  
15 identique l'utilisation d'une autre espèce de *Chlorella*, ne permet pas d'obtenir un ingrédient cosmétique présentant l'efficacité cosmétique recherchée.

Les algues du genre *Chlorella* sont des algues unicellulaires qui vivent isolées ou en petits groupes de cellules. La cellule est de forme globuleuse ou ellipsoïdale. La paroi cellulaire est lisse et contient une glucosamine (chitosane). Elle ne présente qu'un seul noyau et un seul  
20 chloroplaste, généralement situés sur les bords de la cellule. Le chloroplaste ne contient qu'un seul pyrénnoïde, recouvert d'une couche d'amidon. Il existe de nombreuses espèces différentes du genre *Chlorella*. La plus connue, *Chlorella vulgaris*, est utilisée pour de nombreuses applications, en particulier comme complément alimentaire, mais également en cosmétique.

25 Les extraits de *Chlorella* actuellement connus et utilisés en cosmétique sont des extraits comprenant essentiellement des protéines, comme cela est décrit notamment dans la demande de brevet FR3031985.

*Chlorella sorokiniana* a une composition particulière et différente de celle de la *Chlorella vulgaris*. De façon surprenante et avantageuse, un extrait de *Chlorella sorokiniana*, lorsqu'il  
30 est appliqué sur la peau, est capable d'agir sur les mitochondries des cellules de l'épiderme, en assurant leur protection, quel que soit le niveau de stress. Il permet aux mitochondries de s'adapter à leur environnement et favorise son métabolisme. En bonne santé, les

mitochondries participent alors au renouvellement efficace de la barrière pour l'obtention d'une peau éclatante.

L'invention a par conséquent pour objet l'utilisation cosmétique d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* dans une composition cosmétique en tant qu'agent cosmétique, ainsi qu'un  
5 procédé de traitement cosmétique pour améliorer l'aspect esthétique de la peau, comprenant l'application sur la peau d'au moins un extrait de *Chlorella sorokiniana* ou d'une composition en contenant.

L'invention vise également un extrait spécifique de *Chlorella sorokiniana* comprenant au moins des carbohydrates et des protéines, les carbohydrates représentant au moins 36% en  
10 poids de matière sèche de l'extrait, ainsi que des compositions cosmétiques contenant un tel extrait.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention, ressortiront de la description en détails de l'invention qui va suivre, en regard d'exemples, d'essais d'efficacité et des figures annexées sur lesquelles :

- 15 - la Figure 1 représente une photographie au microscope de la biomasse de *Chlorella sorokiniana*;
- la Figure 2 représente une photographie au microscope, prise dans les mêmes conditions que la Figure1, après solubilisation et hydrolyse de la biomasse et avant séparation des phases soluble et insoluble ;
- 20 - la Figure 3 représente une photographie au microscope, prise dans les mêmes conditions que la Figure1, de l'extrait selon l'invention.

#### **DEFINITIONS**

Par « agent cosmétique » au sens de l'invention, on entend également un principe actif cosmétique ou un agent actif cosmétique, c'est à dire au moins une molécule,  
25 préférentiellement un ensemble de plusieurs molécules présentant un effet sur les cellules de la peau.

Par « contenant un « X » » ou « comprenant un « X » », sauf indication contraire, au sens de l'invention on entend qui contient ou comprend au moins un « X ».

Par « extrait » de *Chlorella sorokiniana* au sens de l'invention on entend toute molécule ou  
30 mélange de molécules issue(s) de la structure et/ou du milieu intracellulaire de la microalgue *Chlorella sorokiniana*. Il peut s'agir de molécules natives de la microalgue ou de molécules

obtenues par tout type d'extraction et transformation des molécules natives de la microalgue par exemple par hydrolyse. Ce terme « extrait » exclut la biomasse de *Chlorella sorokiniana*, telle quelle.

Par « hydrolysats » on entend tout extrait de *Chlorella sorokiniana*, obtenu avec un procédé  
5 comprenant au moins une étape d'hydrolyse enzymatique ou chimique de *Chlorella sorokiniana*, préférentiellement au moins une étape d'hydrolyse enzymatique.

#### DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

L'invention a donc pour objet l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* en cosmétique, non thérapeutique.

10 En effet, selon l'invention un extrait de *Chlorella sorokiniana* lorsqu'il est appliqué sur la peau, est capable d'améliorer l'aspect esthétique et la texture de la peau.

Il est en effet capable d'agir sur les trois voies mécaniques qui conditionnent l'équilibre et le bon fonctionnement des mitochondries de cellules de l'épiderme, à savoir :

- le contrôle et la régulation de la qualité mitochondriale,
- 15 - la dynamique mitochondriale, et
- la mitophagie.

Afin de maintenir les cellules et tissus dans un bon état de fonctionnement, la mitochondrie fait appel à différentes protéines qui vont assurer le contrôle qualité mitochondrial. Ces protéines ont différentes missions : protéger l'organite des stress radicalaires, favoriser son  
20 métabolisme et l'empêcher d'émettre un signal de mort.

Parmi ces protéines, on recense trois acteurs majeurs :

- La sirtuine 3 (SIRT3) est un membre de la famille des sirtuines, une famille connue pour ses effets positifs sur le métabolisme cellulaire, le maintien de l'intégrité du génome et la résistance aux stress. Localisée au niveau mitochondrial, elle joue un rôle primordial de  
25 protection. D'une part, elle permet de lutter contre le stress oxydatif en dé-acétylant ou en activant la production d'enzymes anti-radicalaires (superoxyde dismutase ou catalase) (H.H.Tseng A., Shieh S.-S., LingWang D. SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 63, 222-234 (2013)). D'autre part, elle joue un rôle favorable sur le métabolisme en boostant les protéines de la chaîne  
30 respiratoire (Kincaid B., Bossy-Wetzl E. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5, 1-13 (2013)) ;

- L'aconitase est décrite comme le garde du corps de la mitochondrie. La forme mitochondriale de cette enzyme est connue pour avoir une double fonction. D'une part, elle participe activement au métabolisme puisque c'est une des enzymes de la chaîne respiratoire. D'autre part, elle préserve l'ADNmt en se liant à ce dernier et en régulant l'expression des gènes mitochondriaux (S. Shadel G. Mitochondrial DNA, aconitase 'wraps' it up. *Trends in Biochemical Sciences*, 30, 294-296 (2005)) ;

La protéine chaperonne HSP27 est localisée au niveau cytoplasmique et impliquée dans de nombreux processus cellulaires. Parmi les fonctions qui lui sont attribuées, elle maintient la fonctionnalité du protéome mitochondrial et favorise la survie cellulaire. En effet, la mitochondrie renferme différentes protéines potentiellement dangereuses pour la cellule. En empêchant le relargage de ces protéines, la protéine HSP27 va protéger la mitochondrie et la cellule d'un processus de mort induite par un stress (Bakthisaran R., Ramakrishna T., Mohan Ch. R. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Journal of Investigative Dermatology*, 291-319 (2015)).

Ces 3 protéines impliquées dans le bon état de fonctionnement mitochondrial sont dérégulées lors du vieillissement cutané et lorsque la peau est soumise à un faible stress. Ceci a été démontré notamment sur deux modèles mimant le vieillissement (voir point I).

Selon l'invention, l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokianina* sur la peau, en particulier sur une peau vieillie, permet d'augmenter la synthèse de SIRT3 et d'aconitase, et de normaliser l'expression de la protéine chaperonne HSP27. Avantagusement, en boostant ces trois acteurs mitochondriaux majeurs, l'application d'un extrait de *Chlorella sorokianina* sur la peau permet de corriger la perte de qualité des mitochondries et de contrôler les défauts esthétiques qui apparaissent au cours du vieillissement ou lorsque la peau est soumise à un faible stress.

Par ailleurs, on sait que les mitochondries sont des organites extrêmement dynamiques, capables de se mouvoir le long des microtubules, changeant fréquemment de direction et interagissant les unes avec les autres. Le réseau mitochondrial adopte constamment différentes morphologies au travers de cycles (Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Molecular Cell Biology*, 11, 872-884 (2010)) :

- fusion, caractérisée par la création d'un réseau mitochondrial tubulaire avec de grandes mitochondries allongées ;

- fission, caractérisée par la production de petites mitochondries ponctiformes et sphériques.

Ces changements de forme influencent non seulement l'intégrité des mitochondries mais également de nombreuses fonctions cellulaires des mitochondries à savoir la production d'énergie sous forme d'ATP ou le relargage de radicaux libres (Yu T., Robotham L.J., Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *PNAS*, 103, 2653-2658 (2006)).

Le nombre et la morphologie des mitochondries dépendent principalement de l'équilibre entre ces mécanismes de fission et de fusion mitochondriales et peuvent varier en fonction des conditions physiologiques ou de l'environnement cellulaire (Jugé R., Breugnot J., Da Silva C., Bordes S., Closs B., Auouacheria A. Quantification and Characterization of UVB-Induced Mitochondrial Fragmentation in Normal Primary Human Keratinocytes. *Scientific Reports*, 6, 1-9 (2016)).

La fusion mitochondriale permet à certaines mitochondries modérément endommagées de mixer leur matériel avec des mitochondries saines, en particulier des protéines de la matrice et leur ADNmt. Ce processus permet d'assurer une homogénéité au sein de la population mitochondriale de la cellule. En cas de dommages plus importants, la fission mitochondriale permet à la mitochondrie de se diviser de façon asymétrique pour former une mitochondrie saine et une mitochondrie endommagée qui sera éliminée par un processus d'autophagie sélective appelée mitophagie (Twig G., Elorza A., Molina JA. A., Mohamed H., Wikstrom D.J., Walzer G., Stiles L., Haigh E. S., Katz S., Las G., Alroy J., Wu M., Py F.B., Yuan J., Deeney T.J., Barbara E Corkey E.B., Orian S Shirihai S.O. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO Journal*, 27, 433-446 (2008)).

Le vieillissement de la peau est associé à une augmentation du processus de fission mitochondriale. Ceci a été démontré notamment sur des essais réalisés sur des kératinocytes issus de donneurs jeunes et âgés, tels que présentés dans la partie relative à l'évaluation de l'efficacité cosmétique d'un extrait de *Chlorella sorokianina* au point I.

Selon l'invention, l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokianina* sur la peau, en particulier sur une peau vieillie, permet de restaurer la fusion mitochondriale. Avantagusement, l'application d'un extrait de *Chlorella sorokianina* sur la peau permet ainsi d'obtenir et de maintenir une population mitochondriale homogène et fonctionnelle, au cours du vieillissement cutané ou en cas de stress modéré.

En outre, lorsque les dommages deviennent critiques et se généralisent à de nombreuses mitochondries, ces dernières doivent être prises en charge pour être dégradées. Cette élimination est rendue possible grâce à un mécanisme d'autodigestion des composés cellulaires appelé autophagie et plus particulièrement par l'intermédiaire d'une de ses  
5 formes spécifiques : la mitophagie.

L'autophagie est caractérisée par la formation d'une double membrane lipidique, appelée autophagosome qui va encercler une partie du cytoplasme. Cet autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome à l'intérieur duquel le contenu cytoplasmique va être dégradé. Ce processus permet à la cellule de se débarrasser des divers éléments endommagés présents  
10 dans son cytoplasme tels que les protéines et les lipides oxydés (P Codogno, AJ Meijer. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1509-1518 (2005)). En assurant un contrôle qualité basal et non discriminant, l'autophagie est une première ligne de detoxification.

La mitophagie correspond à une forme d'autophagie spécifique ciblant les mitochondries endommagées. Différentes protéines sont impliquées dans ce processus : PINK1, Parkin, NIX  
15 ou BNIP3 (Youle J.R., Narendra P.D. Mechanisms of mitophagy. *Molecular Cell Biology*, 12, 9-14 (2011)).

Elles permettent le recrutement spécifique des mitochondries endommagées par les autophagosomes et la formation de mitophagosomes. En éliminant les mitochondries  
20 défectueuses productrices de radicaux libres, la mitophagie prévient les dommages oxydatifs aux protéines. C'est ainsi que contrairement à l'autophagie qui va éliminer les biomolécules endommagées, la mitophagie s'attaque à la source des déchets cellulaires, les radicaux libres (ROS), en ciblant les mitochondries dysfonctionnelles surproductrices de ROS. Ce « sous-système » autophagique spécialisé permet de détoxifier de façon discriminante. Elle  
25 constitue une seconde ligne de detoxification plus puissante.

Un stress mitochondrial aigu est associé à l'enclenchement d'un processus de mitophagie. Ceci a été démontré notamment sur des essais réalisés sur des kératinocytes, tels que présentés dans la partie relative à l'évaluation de l'efficacité cosmétique d'un extrait de  
*Chlorella sorokianina* au point I.

30 Selon l'invention, l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokianina* sur la peau, en particulier sur une peau ayant subi un stress mitochondrial aigu, permet d'aider à la dégradation des mitochondries endommagées en favorisant la mitophagie. Avantagusement, l'application

d'un extrait de *Chlorella sorokianina* sur la peau permet ainsi de favoriser l'homéostasie et le renouvellement du pool mitochondrial lorsque la peau est soumise à des agressions.

Par contre, on sait qu'il existe de nombreux produits anti-radicalaires ou anti-oxydants qui permettent de limiter la présence des radicaux libres dans la peau, mais cette efficacité cosmétique est différente de celle de l'invention. En effet, un produit anti-radicalaire ou anti-oxydant permettra de limiter la présence des ROS au niveau de la peau, mais n'aura aucune efficacité sur l'état et la qualité des mitochondries.

Par effet inverse, un produit agissant sur l'état et la qualité des mitochondries ne sera pas obligatoirement un produit anti-radicalaire ou anti-oxydant, ces deux efficacités étant bien distinctes. L'extrait de *Chlorella sorokiniana* selon l'invention n'est d'ailleurs pas un produit anti-radicalaire.

Un extrait de *Chlorella sorokianina* sur la peau permet donc :

- de contrôler et réguler la qualité mitochondriale,
- de stimuler la dynamique mitochondriale, et
- d'augmenter la mitophagie.

Ainsi, il peut être utilisé pour améliorer l'aspect esthétique et la texture de la peau, notamment pour lutter contre le vieillissement cutané, en particulier pour lutter contre les manifestations inesthétiques du vieillissement de la peau, le dysfonctionnement de la mitochondrie étant à l'origine d'un vieillissement accéléré.

Il peut également être utilisé pour renforcer la fonction barrière et favoriser l'éclat du teint. En effet, le dysfonctionnement de la mitochondrie a aussi une influence sur la différenciation kératinocytaire (G. Feichtinger R., Sperl W., W. Bauer J., Kofler B. Mitochondrial dysfunction: a neglected component of skin diseases. *Experimental Dermatology*, 23, 607-614 (2014)).

L'absence d'expression de certains gènes mitochondriaux entraîne une modification du fonctionnement de l'organite qui présente alors une production d'ATP et de radicaux libres différente. A l'échelle de la peau, des répercussions ont été mises en évidence puisque la différenciation épidermique se trouve modifiée (Hamanaka *et al.*, 2013). Une autre étude impute les défauts de cornification à une altération de la dynamique mitochondriale au niveau des cellules souches de l'épiderme. Ces données montrent que la dynamique mitochondriale joue un rôle important et que la fusion et l'établissement d'une bonne distribution des mitochondries est essentielle à la différenciation (R. Baris O., Klose A., E. Kloepper J., Weiland D., Neuhaus J., Schauen M., Wille A., Müller A., Merkwirth C., Langert.,

Larsson N.-G., Krieg T., J. Tobin D., Ralf Paus R., J. Wiesner R. The Mitochondrial Electron Transport Chain Is Dispensable for Proliferation and Differentiation of Epidermal Progenitor Cells. *Stem Cells*, 29, 1459-1468 (2011)).

Au-delà de la différenciation épidermique, le dysfonctionnement mitochondrial modifie également la qualité de la peau. La production massive de radicaux libres par les mitochondries va :

- endommager les mitochondries elles-mêmes, aggravant ainsi la situation de stress ;
- altérer les différents composants cellulaires dont les protéines. Ceci a des conséquences importantes sur la peau puisque l'oxydation des protéines entraîne une altération des fibres de kératine et des propriétés optiques du *stratum corneum* (Iwai I., Ikuta K., Murayama K., Hirao T. Change in optical properties of stratum corneum induced by protein carbonylation *in vitro*. *International Journal of Cosmetic science*, 30, 41-46 (2008))
- exercer des effets délétères sur l'activité des cellules cutanées. La peau perd ainsi sa capacité à se régénérer.

L'établissement d'un pool de mitochondries homogènes et en bonne santé est donc un paramètre incontournable pour l'obtention d'une peau de qualité. Il apparaît indispensable de stimuler la production d'énergie cellulaire tout en limitant la production excessive de radicaux libres afin d'obtenir une fonction barrière efficace, un renouvellement cellulaire constant et un teint éclatant.

Avantageusement, l'application d'un extrait de *Chlorella sorokianina* sur la peau permet d'augmenter la production d'ATP par les kératinocytes de peaux âgées ou en conditions de stress. Ceci est corrélé à une augmentation de la régénération épidermique et de la différenciation épidermique. La peau est plus claire, lumineuse et homogène.

L'invention a donc spécifiquement pour objet, l'utilisation cosmétique d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* dans une composition cosmétique en tant qu'agent cosmétique, en particulier en tant qu'agent cosmétique destiné à améliorer l'aspect esthétique et/ou la texture de la peau, notamment pour :

- améliorer le fonctionnement des mitochondries des cellules de l'épiderme,
- améliorer l'éclat du teint,
- stimuler le renouvellement des cellules de l'épiderme et/ou à renforcer la barrière cutanée.

L'invention vise également un procédé de traitement cosmétique, non thérapeutique, pour améliorer l'aspect esthétique et/ou la texture de la peau, comprenant l'application sur la peau d'au moins un extrait de *Chlorella sorokiniana* ou d'une composition en contenant, en particulier pour améliorer l'éclat du teint.

- 5 Les extraits de *Chlorella sorokiniana* utiles selon l'invention peuvent être de tout type. Préférentiellement, il s'agit d'un hydrolysate de *Chlorella sorokiniana*. Il peut s'agir d'un hydrolysate chimique (basique ou acide) ou/et d'un hydrolysate enzymatique. De façon préférée il s'agit d'un hydrolysate enzymatique.

10 La biomasse de *Chlorella sorokiniana* utilisée comme matière première à l'origine des extraits de *Chlorella sorokiniana* utiles selon l'invention, est constituée par des microalgues cultivées selon tout procédé connu par l'homme du métier. Actuellement, il existe plusieurs procédés de production de microalgues :

- en présence de lumière et de dioxyde de carbone, la culture est dite photoautotrophe. Elle implique les chloroplastes, siège de la photosynthèse ;

- 15 - en absence de lumière, on parle de culture hétérotrophe. Ce second type de culture se fait indépendamment de la photosynthèse. La microalgue se développe alors en consommant les sources carbonées qui lui sont amenées directement dans son milieu de culture.

20 De par leurs propriétés d'adaptabilité, les microalgues sont capables de passer d'un métabolisme à l'autre afin d'assurer leur survie et leur croissance indépendamment des conditions qui leur sont imposées.

La biomasse de *Chlorella sorokiniana* utilisée comme matière première à l'origine des extraits de *Chlorella sorokiniana* utiles selon l'invention, est constituée par des microalgues pouvant être cultivées en hétérotrophie ou en autotrophie.

- 25 Préférentiellement, la biomasse de *Chlorella sorokiniana* utilisée comme matière première à l'origine des extraits de *Chlorella sorokiniana* utiles selon l'invention, est constituée par des microalgues cultivées en hétérotrophie.

Avantageusement, la culture en hétérotrophie assure :

- 30 - la maîtrise de la culture en bioréacteur qui se fait indépendamment des conditions climatiques. Ces modalités confèrent au procédé d'obtention de l'extrait selon l'invention robustesse, reproductibilité et répétabilité ;

- la production en grande quantité de biomasse, un élément indispensable à l'élaboration industrielle d'extraits ;

- la durabilité car il requiert un prélèvement unique de la souche d'intérêt et de ce fait est sans impact sur la biodiversité;

5 - la traçabilité de l'approvisionnement puisque la souche est issue d'une collection.

De plus, d'un point de vue biologique, dans ce mode de culture hétérotrophe la microalgue développe un métabolisme atypique. En effet, cette culture se faisant à l'obscurité, la machinerie photosynthétique est inactivée et la microalgue utilise ses ressources pour produire des métabolites autres que les pigments ce qui est un avantage dans l'industrie de  
10 la cosmétique blanche. Ce métabolisme fait uniquement appel à la mitochondrie. C'est grâce à une augmentation du nombre de mitochondries et un métabolisme 100% mitochondrial que la microalgue est capable de survivre et de proliférer. Le mode de culture hétérotrophe est donc préféré pour les extraits de *Chlorella sorokiniana* utiles selon l'invention.

La biomasse de *Chlorella sorokiniana* cultivées en hétérotrophie, peut être caractérisée au  
15 moyen des mêmes méthodes d'analyses que les extraits. Ainsi la biomasse de *Chlorella sorokiniana* cultivées en hétérotrophie comprend :

- Protéines : entre 30 et 40%
- Carbohydrates : entre 30 et 45%
- Lipides : entre 5 et 10%
- 20 - Cendres minérales :  $\leq 5\%$
- Non identifié :  $\leq 20\%$

les pourcentages étant exprimés en poids (m/m).

La biomasse de *Chlorella sorokiniana* présente des cellules entières de la microalgue. La Figure 1 représente une photographie au microscope d'une solution contenant 5% de  
25 biomasse de *Chlorella sorokiniana*. On observe la présence de cellules entières nombreuses. Les extraits de *Chlorella sorokiniana* utiles selon l'invention sont préférentiellement les extraits tels que décrits ci-après.

En effet, l'invention a également pour objet des extraits particuliers de *Chlorella sorokiniana*, à savoir des extraits de *Chlorella sorokiniana*, comprenant au moins des carbohydrates et  
30 des protéines, caractérisée en ce que les carbohydrates représentent au moins 36% en poids de matière sèche de l'extrait. Les extraits de *Chlorella sorokiniana* peuvent aussi contenir des minéraux.

La teneur en sucres dans l'extrait peut être déterminée par la méthode de DUBOIS (Dubois M. et al., *Analytical chemistry*, 28, 3, 350-356, 1956).

Ces extraits comprennent donc une quantité importante de carbohydrates. Préférentiellement, la teneur en sucres de l'extrait selon l'invention est comprise entre 36% et 94%, en poids de matière sèche de l'extrait.

De façon préférée, les carbohydrates de l'extrait présentent les caractéristiques suivantes :

- les carbohydrates contenus dans l'extrait sont des sucres de masse molaire inférieure à 8400 Da, et/ou

- au moins 70% des carbohydrates sont des oligosaccharides et des polysaccharides de glucose de masses molaires comprises entre 345 et 8400Da (degré de polymérisation compris entre 2 et 47), le pourcentage étant donné en poids par rapport au poids total des carbohydrates de l'extrait,

- moins de 30% des carbohydrates sont des monosaccharides, le pourcentage étant donné en poids par rapport au poids total des carbohydrates de l'extrait.

Les sucres simples constituant les carbohydrates de l'extrait de *Chlorella sorokiniana* selon l'invention, sont préférentiellement le glucose et le galactose.

Concernant les protéines, les extraits de *Chlorella sorokiniana* selon l'invention ont préférentiellement une teneur en protéines comprise entre 6% et 40% en poids par rapport au poids total de matière sèche de l'extrait.

La teneur en protéines est préférentiellement déterminée par la méthode de LOWRY (Lowry et al., *Protein measurement with the folin reagent*, J. Biol. Chem., 193, 265, 1951).

Préférentiellement, au moins 90% des protéines contenues dans l'extrait selon l'invention, sont des protéines de masse molaire inférieure à 3500 Da, le pourcentage étant donné en poids par rapport au poids total des protéines de l'extrait.

Concernant les minéraux, les extraits de *Chlorella sorokiniana* selon l'invention ont préférentiellement une teneur en cendres minérales inférieure à 20% en poids par rapport au poids total de matière sèche de l'extrait.

La teneur en cendres brutes peut être déterminée par la pesée des résidus issus de l'incinération des échantillons de l'hydrolysate à 550°C dans un four à moufle électrique.

L'extrait selon l'invention ne comprend pas de biomasse de *Chlorella sorokiniana*, il ne contient pas de cellules entières, ni de fragments de cellules. La Figure 3 représente une photographie microscopique d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* à 5% dans l'eau. La

photographie a été réalisée dans les mêmes conditions que la Figure 1. On n'observe pas une seule cellule, ni aucun fragment de cellules n'est présent dans l'extrait selon l'invention.

Préférentiellement l'extrait selon l'invention est un hydrolysate de *Chlorella sorokiniana*. Il peut s'agir d'un hydrolysate chimique (acide ou basique) et/ou d'un hydrolysate enzymatique

5 de *Chlorella sorokiniana*. De façon préférée, l'extrait selon l'invention est un hydrolysate enzymatique c'est-à-dire obtenu par un procédé comprenant au moins une hydrolyse enzymatique. La ou les enzymes utilisée(s) peu(ven)t être toute(s) enzyme(s) connue(s) par l'homme du métier pour permettre d'obtenir un extrait présentant les caractéristiques de l'extrait selon l'invention. La ou les enzymes peuvent être notamment des protéases, qui  
10 sont capables d'hydrolyser les protéines et les glycoprotéines constituant *Chlorella sorokiniana* ou des carbohydrases, qui sont capables d'hydrolyser les carbohydrates et les glycoprotéines constituant *Chlorella sorokiniana*.

De façon préférée, la biomasse utilisée pour obtenir l'extrait selon l'invention est une biomasse cultivée en hétérotrophie.

15 L'extrait selon l'invention peut se présenter sous forme solide ou sous forme liquide, préférentiellement sous forme liquide.

Lorsqu'il se présente sous forme liquide, il se présente de façon préférée sous forme d'un liquide limpide ou opalescent, avec une couleur jaune.

L'extrait selon l'invention peut être obtenu par tout procédé permettant d'obtenir un extrait  
20 de *Chlorella sorokiniana* présentant les caractéristiques revendiquées. Préférentiellement il s'agit d'un procédé comprenant au moins une étape d'hydrolyse de *Chlorella sorokiniana*, en particulier au moins une étape d'hydrolyse des protéines et des glycoprotéines constituant la microalgue. Encore plus préférentiellement, il est obtenu par un procédé comprenant au moins une étape d'hydrolyse enzymatique, en particulier d'hydrolyse enzymatique des  
25 protéines et glycoprotéines c'est-à-dire une hydrolyse réalisée par voie enzymatique au moyen d'enzymes protéolytiques. Il peut s'agir par exemple de protéases, endoprotéases et exopeptidases d'origine végétale (papaine, bromélaïne, ficine) et d'origine bactérienne (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus*, etc.). Préférentiellement il s'agit d'un procédé comprenant au moins une étape d'hydrolyse de *Chlorella sorokiniana*, en particulier au moins une étape  
30 d'hydrolyse des carbohydrates et des glycoprotéines constituant la microalgue. Encore plus préférentiellement, il est obtenu par un procédé comprenant au moins une étape d'hydrolyse enzymatique, en particulier d'hydrolyse enzymatique des carbohydrates et

glycoprotéines c'est-à-dire une hydrolyse réalisée par voie enzymatique au moyen d'enzymes comme les carbohydrases. L'extrait selon l'invention peut-être obtenu par un procédé combinant au moins une hydrolyse chimique et au moins une hydrolyse enzymatique.

5 Préalablement au procédé d'obtention de l'hydrolysate en tant que tel, il convient de produire la biomasse de *Chlorella sorokiniana*. Cette étape est réalisée selon le mode de culture des levures dans un milieu adapté à leur développement, de manière classique pour l'homme de métier. Préférentiellement, la culture est réalisée en hétérotrophie.

Une fois la biomasse obtenue, il convient de mettre en œuvre le procédé d'extraction. Selon  
10 un mode de réalisation particulièrement adapté, le principe actif est obtenu par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- solubilisation de la biomasse de *Chlorella sorokiniana*, préférentiellement entre 20 et 200g/L dans l'eau (la Figure 1 a été réalisée à ce stade),

- hydrolyse chimique,

15 - hydrolyse(s) enzymatique(s) :

- o les conditions d'hydrolyse sont choisies pour hydrolyser les protéines et les glycoprotéines ; préférentiellement l'hydrolyse enzymatique est réalisée au moyen d'une protéase, et/ou

20 o les conditions d'hydrolyse sont choisies pour hydrolyser les carbohydrates et les glycoprotéines ; préférentiellement l'hydrolyse enzymatique est réalisée au moyen de d'une carbohydrase,

- inactivation de(s) l'enzyme(s) préférentiellement par traitement thermique : cette inactivation est réalisée selon la préconisation technique du(des) fournisseur(s) de(s) l'enzyme(s) (la Figure 2 a été réalisée à ce stade ; on observe la présence des  
25 quelques cellules de microalgues entières, mais surtout la présence de fragments cellulaires),

- séparation des phases soluble et insoluble préférentiellement par centrifugation, et récupération de la phase soluble contenant entre autres les sucres, les protéines et éventuellement des minéraux solubles ;

30 - filtration pour éliminer les particules encore en suspension, et récupération du filtrat ;

- purification par filtration afin d'éliminer les molécules de haut poids moléculaire, préférentiellement les molécules de poids moléculaire supérieur à 10kDa ; cette étape est de façon préférée réalisée par nanofiltration membranaire ;
- obtention d'un filtrat, qui constitue l'extrait selon l'invention, qui se présente sous  
5 forme liquide (la Figure 3 a été réalisée à ce stade).

L'hydrolysate obtenu à ce stade peut être encore concentré et/ou purifié afin de sélectionner les fractions de bas poids moléculaires, préférentiellement inférieures à 5kDa, par des étapes de filtrations et filtration stérilisante successives à travers des filtres de porosité différente, en conservant les filtrats à chaque étape et/ou par une méthode de type  
10 chromatographique, afin, par exemple d'enrichir spécifiquement l'hydrolysate en ces molécules.

Le procédé peut aussi comprendre une étape de décoloration et/ou désodorisation.

Les étapes des procédés décrites ci-avant, prises individuellement sont usuelles dans le domaine des extractions d'actifs à partir de matières premières naturelles et l'homme du  
15 métier est à même d'en ajuster les paramètres réactionnels sur la base de ses connaissances générales.

L'extrait selon l'invention est préférentiellement utilisé comme agent cosmétique dans des compositions, ces compositions comprenant un milieu cosmétiquement acceptable. Il s'agit de compositions dans différentes formes galéniques, adaptées à une application sur la peau,  
20 en particulier la peau du visage.

Ces compositions peuvent se présenter notamment sous forme d'émulsions huile-dans-eau, émulsions eau-dans-huile, émulsions multiples (Eau/Huile/Eau ou Huile/Eau/Huile) qui peuvent être éventuellement des microémulsions ou des nanoémulsions, ou sous forme de solutions, suspensions, hydrodispersions, gels aqueux ou poudres. Elles peuvent être plus ou  
25 moins fluides et avoir l'aspect de lotion, shampoing, crème ou mousse.

Il peut s'agir de compositions comprenant au moins 0.5% d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* selon l'invention, préférentiellement entre 0.5 et 5%, les pourcentages étant donnés en poids par rapport au poids de la composition.

Ces compositions comprennent, outre l'extrait de *Chlorella sorokiniana*, un milieu  
30 physiologiquement acceptable et de préférence cosmétiquement acceptable, c'est-à-dire qui ne provoque pas de sensations d'inconfort inacceptables pour l'utilisateur telles que des rougeurs, tiraillements ou picotements.

Les compositions selon l'invention peuvent contenir comme adjuvant au moins un composé choisi parmi :

- les huiles, qui peuvent être choisies notamment parmi les huiles de silicone, linéaires ou cycliques, volatiles ou non volatiles ;
- 5 - les cires, telles que l'ozokérite, la cire de polyéthylène, la cire d'abeille ou la cire de carnauba,
- les élastomères de silicone,
- les tensioactifs, de préférence émulsionnants, qu'ils soient non ioniques, anioniques, cationiques ou amphotères,
- 10 - les co-tensioactifs, tels que les alcools gras linéaires,
- les épaississants et/ou gélifiants,
- les humectants, tels que les polyols comme la glycérine,
- les colorants, les conservateurs, les charges,
- les tenseurs,
- 15 - les séquestrants,
- les parfums,
- et leurs mélanges, sans que cette liste soit limitative.

Des exemples de tels adjuvants sont cités notamment dans le Dictionnaire CTFA (*International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook* publié par le *Personal Care*  
20 *Product Council*).

Bien entendu, l'homme du métier veillera à choisir les éventuels composés complémentaires, actifs ou non-actifs, et leur quantité, de telle sorte que les propriétés avantageuses du mélange ne soient pas, ou sensiblement pas, altérées par l'adjonction envisagée.

Ces compositions sont notamment destinées à être utilisées sur la peau pour améliorer  
25 l'aspect esthétique de la peau, en particulier pour hydrater la peau et/ou améliorer l'éclat du teint.

Afin d'illustrer les effets cosmétiques d'un extrait de *Chlorella sorokiniana*, les exemples suivants avec leurs résultats d'essais sont présentés.

**EXEMPLES****Exemples d'extraits**

Plusieurs extraits selon l'invention ont été réalisés en faisant varier les étapes d'hydrolyse, de concentration, de décoloration/désodorisation.

- 5 Les étapes générales sont les suivantes :
- solubilisation dans l'eau de la biomasse de *Chlorella sorokiniana*,
  - hydrolyse(s) chimique(s) et/ou hydrolyse(s) enzymatique(s). Les conditions d'utilisation optimale des enzymes sont celles préconisées par les fournisseurs.
  - Inactivation par traitement thermique, selon les préconisations des fournisseurs
- 10 d'enzymes
- Séparation des phases soluble et insoluble par centrifugation et récupération de la phase soluble
  - Filtration sur 10kDa et récupération du filtrat
  - Filtration et filtration stérilisante sur filtre 0.22µm.
- 15 Les conditions variables du procédé pour les différents extraits des exemples sont décrits dans les Tableau 1A et 1B :

Conditions	Solubilisation
A	20g/l
B	50g/l
C	100g/l
D	150g/l
E	200g/l

**Tableau 1A**

**Tableau 1A et 1B** : Conditions des procédés pour l'obtention des différents exemples d'extraits selon l'invention

Conditions	Hydrolyse(s)
a	Basique et protéase
b	Basique et carbohydase
c	Basique et protéase et carbohydase
d	Acide et protéase
e	Acide et carbohydase
f	Acide et protéase et carbohydase

**Tableau 1B**

- 20 Les extraits selon l'invention obtenus sont caractérisés comme suit :
- Les protéines sont déterminées en poids de matière sèche, par la méthode de LOWRY,

- Les carbohydrates sont déterminés en poids de matière sèche, par la méthode de DUBOIS,
- Les cendres sont déterminées en poids de matière sèche, par la pesée des résidus issus de l'incinération des échantillons de l'hydrolysate à 550°C dans un four à moufle électrique.

5

Les caractéristiques obtenues pour plusieurs exemples sont présentées dans le Tableau 2 ci-dessous :

Exemples	Matières sèches	Teneur en protéines	Teneur en carbohydrates	Teneur en cendres minérales
Exemple 1	31.4g/l	24%	60%	11%
Exemple 2	48.7g/l	23%	57%	20%
Exemple 3	48.3g/l	34%	57%	9%
Exemple 4	36.3g/l	25%	63%	12%
Exemple 5	33.7g/l	29.4%	52%	18.6%
Exemple 6	71.1g/l	27%	53%	20%

**Tableau 2** : Caractérisation de différents exemples d'extraits selon l'invention

Le procédé d'extraction de l'exemple 1 a été appliqué sur la biomasse de *Chlorella vulgaris*.

- 10 La caractérisation analytique de l'extrait obtenu est présenté dans le Tableau 3 :

Exemples	Matières sèches	Teneur en protéines	Teneur en carbohydrates	Teneur en cendres minérales
Exemple 7 Sur <i>Chlorella vulgaris</i>	49.1g/l	48%	28%	10%

**Tableau 3** : Caractérisation d'un extrait de *Chlorella vulgaris* obtenu par le même procédé que celui mis en œuvre pour obtenir un extrait de *Chlorella sorokiniana* selon l'exemple 1

Les peptides ont été caractérisés de façon à déterminer leurs poids moléculaires et à quantifier les différentes fractions protéiques par chromatographie FPLC d'exclusion stérique.

- 15 L'extrait est analysé selon les conditions suivantes :

- Pompe : FPLC AKTA (Pharmacia)
- Colonne : Superdex Peptides TRICORN 10/300 GL (Pharmacia)
- Phase Mobile : tampon phosphate de potassium 20 mM, pH 7,2 avec 0,25 M NaCl.
- Détecteur : UV à 280 nm
- Débit : 0,5 mL/min

20

- Volume d'injection : 200  $\mu$ L

Une courbe de calibration des temps de rétention des marqueurs en fonction de leur masse molaire est construite (fit logarithmique). Le Tableau 4 résume les temps de rétention obtenus pour les différents marqueurs.

Molécules	Poids moléculaire (Da)	Temps de rétention (min)
Cytochrome C	12 500	20,0
Aprotinine	6 512	23,5
Vitamine B12	1 355	33,4
Cytidine	243	41,4

5 **Tableau 4.** Temps de rétention des différents marqueurs.

Grâce à la courbe de calibration, les temps de rétention suivants ont pu être estimés :

- protéine de 10 000 Da :  $t_r = 21,4$  mn
- protéine de 3 500 Da :  $t_r = 25,2$  mn
- protéine de 2 000 Da :  $t_r = 30,3$  mn

10 Ensuite, un programme de fractionnement est construit, en fonction des temps de rétention, dans le but de collecter les fractions suivantes (MM = poids moléculaire) :

- fraction 1 : 10 000 Da < MM
- fraction 2 : 3 500 Da < MM < 10 000 Da
- fraction 3 : 2 000 Da < MM < 3 500 Da
- fraction 4 : 243 Da < MM < 2 000 Da
- fraction 5 : MM < 243 Da

15

Les différentes fractions collectées des exemples d'extraits selon l'invention sont quantifiées par dosage spectrophotométrique selon la méthode de LOWRY (Lowry *et al.*, Protein measurement with the folin reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951).

20 Le profil chromatographique et le fractionnement des peptides de l'extrait et la répartition de chaque fraction déterminée par méthode spectrophotométrique est présentée dans le Tableau 5.

Poids moléculaire (Da)	Répartition (%)
Fraction 1 : 10 000 Da < MM	0,0
Fraction 2 : 3 500 Da < MM < 10 000 Da	6,3
Fraction 3 : 2 000 Da < MM < 3 500 Da	17,7
Fraction 4 : 243 Da < MM < 2 000 Da	75,8
Fraction 5 : MM < 243 Da	0,3

**Tableau 5.** Répartition et quantification des protéines des extraits selon l'invention (moyenne des exemples)

Plus de 93% de peptides des extraits selon l'invention présentent des masses molaires comprises entre 243 et 3500 Da.

5 De même, la fraction glucidique des extraits a été caractérisée.

La détermination des masses molaires est réalisée par HPLC avec détection RI selon les conditions suivantes. Les échantillons des extraits selon l'invention ont été dilués au ½ dans la phase mobile avant injection sur le système HPLC/RI.

Les masses molaires des carbohydrates sont évaluées par comparaison des temps de rétention des pics détectés dans les échantillons avec les temps de rétention de standards injectés au préalable. L'extrait est analysé selon les conditions suivantes :

- Colonne : Polymer Laboratories (Varian) PL aquagel-OH 60, aquagel-OH 40 et aquagel-OH 30 de dimension 300 x 7,5 mm (en séries) avec pré-colonne de mêmes caractéristiques
- 15 - Débit : 1 mL/min
- Solvant : tampon NaNO<sub>3</sub> 0,3 M et NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0,01 M, pH=7 en mode isocratique
- Détecteur : RI (Indice de Réfraction)
- Volume d'injection : 10 µL

20 L'identification et la quantification des sucres simples sont réalisées par chromatographie liquide ionique. Les échantillons ont été hydrolysés avec de l'acide trifluoroacétique 2 M (TFA) pendant 2 heures à 105°C. Ils ont ensuite été refroidis et neutralisés par de la soude 4 M (NaOH), puis dilués à la concentration appropriée afin de correspondre à la gamme d'étalonnage.

25 Une gamme d'étalonnage est préparée pour chaque ose neutre à partir de standards entre 10 mg/L et 50 mg/L.

Le Tableau 6 donne la répartition des masses molaires des carbohydrates présents dans les extraits selon l'invention obtenues à partir des aires du chromatogramme obtenu.

	Masse molaire (Da) et degré de polymérisation correspondant	Taux de carbohydrates (%)
Monosaccharides	MM ≤ 180 (DP1)	15 %
Oligosaccharides et Polysaccharides	180 < MM < 8 400 DP1 < DP < DP47	85 %

**Tableau 6 :** Répartition des masses molaires des carbohydrates présents dans les extraits des exemples (moyenne)

5 L'extrait selon l'invention est constitué majoritairement d'oligosaccharides et polysaccharides de masse molaire inférieure à 8400Da. Les carbohydrates des extraits des exemples ont une masse molaire moyenne de 697 Da.

La composition en sucres simples des extraits des exemples est déterminée par chromatographie liquide ionique, est présentée dans le Tableau 7.

Type de sucre	Proportion (%)
Glucose	95
Galactose	5

10

**Tableau 7 :** Composition en sucres simples des extraits des exemples (moyenne)

Cette analyse permet donc de mettre en évidence que les extraits des exemples sont principalement constitués de glucose et de galactose.

### **Exemples compositions**

15 Exemple 8: Soins de nuit comprenant un extrait de *Chlorella sorokiniana* :

Un exemple de composition selon l'invention sous forme de gel soins de nuit est constitué par :

A. Eau	qsp 100%
Glycérine	6%
Conservateur	1%
Extrait de <i>Chlorella sorokiniana</i>	2,5%

B.	DUB CG7	(Stéarinerie Dubois)	1%
	Phytowax Olive 8L25	(Sophim)	1,5%
	Biophytosebum	(Sophim)	2,5%
	Vegeline 65	(Sophim)	0,5%
	DUB Zenoat	(Stéarinerie Dubois)	3%
	DUB 5545	(Stéarinerie Dubois)	6%
	Simulsol165	(Seppic)	1,5%
	DUB PTCC	(Stéarinerie Dubois)	1%
	Beurre d'amande	(Sophim)	2,5%
	Montanov L	(Seppic)	1,5%
	Lanol 1688	(Seppic)	3,0%
	Sepinov EMT10	(Seppic)	2%
C.	Sunsphères H121	(AGC Chemicals)	0,5%
	Sepiplus 400	(Seppic)	0,3%

Ce gel émulsionné présente un pH de 5,1. Il est blanc, épais, brillant, sans odeur, avec une texture souple.

Ses autres caractéristiques sont une préhension aisée, un étalement frais et glissant, une pénétration rapide, un fini doux et légèrement filmogène.

5 La composition peut être obtenue par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- Mélanger et chauffer séparément A et B, au bain marie à 80°C
- Emulsionner B dans A, sous rotor stator à 2500 tr/min
- A 30°C, ajouter C
- Laisser agiter (à 2000 tr/min) pour une homogénéisation complète.

10

Exemple 9: Formule Blur comprenant un extrait de *Chlorella sorokiniana* :

Un exemple de composition selon l'invention sous forme de formule Blur est constitué par :

A.	Eau	qsp 100%
	Glycérine	4%
	Conservateur	1%

	24	
	Extrait de <i>Chlorella sorokiniana</i>	2,5%
B.	DUB Lilirose (Stéarinerie Dubois)	2%
	Biophytosebum (Sophim)	1%
	Vegeline65 (Sophim)	1%
	DUB Zenoat (Stéarinerie Dubois)	4%
	Sepimax Zen (Seppic)	1%
	Easynov (Seppic)	3%
C.	Timiron Splendid Violet (Merck)	0,05%
	Timiron Glam Sylver (Merck)	0,02%

Ce gel blanc, brillant, souple et sans odeur, présente un pH de 6.

Ses autres caractéristiques sont : une préhension crémeuse, un étalement glissant et doux, et une pénétration très rapide, ainsi qu'un fini soyeux.

Cette composition peut être obtenue par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 5 - Mélanger A
- Chauffer au bain-marie à 80°C sous agitation
- Mélanger B
- Chauffer au bain-marie à 80°C sous agitation
- Emulsionner B dans A, sous rotor stator à 1500 tr/min
- 10 - A 50°C, ajouter C et laisser refroidir toujours sous rotor stator à 1500 tr/min.

Exemple 10: Formule Soins de jour comprenant un extrait de *Chlorella sorokiniana* :

Un exemple de composition selon l'invention sous forme de soins de jour est constitué par :

A.	Eau	qsp 100%
	Glycérine	4%
	Conservateur	1%
	Extrait de <i>Chlorella sorokiniana</i>	2,5%
	Sepimax Zen (Seppic)	0,5%
B.	DUB 5545 (Stéarinerie Dubois)	3%

	25		
Euthanol G	(BASF)		2%
Tegosoft tn2	(BASF)		1%
Oléate de glycérol	(Stéarinerie Dubois)		2%
DUB Vinyl	(Stéarinerie Dubois)		0,6%
DUB Cocorose	(Stéarinerie Dubois)		0,8%
Easynov	(Seppic)		4%
C.	Sunsphères H121	(AGC Chemicals)	1%
	DC71300	(Dow Corning)	1%

Cette émulsion blanche, brillante, fluide et sans odeur présente un pH de 5,6.

Ses autres caractéristiques sont : une préhension liquide, un étalement glissant, une pénétration assez rapide et un fini doux et sec.

Cette composition peut être obtenue par la mise en œuvre des étapes suivantes :

- 5 - Mélanger A
- Chauffer au bain-marie à 80°C sous agitation
- Mélanger B
- Chauffer au bain-marie à 80°C sous agitation
- Emulsionner B dans A, sous rotor stator à 2000 tr/min
- 10 - A 50°C, ajouter C et laisser homogénéiser sous rotor stator à 1500 tr/min, jusqu'à complet refroidissement.

## EVALUATION DE L'EFFICACITE COSMETIQUE SELON L'INVENTION

### I. EFFET DE L'EXTRAIT DE CHLORELLA SOROKINIANA SELON L'INVENTION SUR LES LEVIERS DE DEFENSE MITOCHONDRIALE

- 15 Les essais ont été réalisés avec plusieurs extraits selon l'invention, tels que présentés précédemment. Les résultats donnés dans les essais décrits ci-après, représentent la moyenne des résultats de chacun de ces extraits.

#### o 1.1. Effet d'un extrait selon l'invention sur le contrôle de la qualité mitochondriale

- 20 L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* sur le contrôle qualité mitochondrial.

Pour cela, trois marqueurs impliqués dans le contrôle la qualité de la bonne vitalité des mitochondries ont été étudiés.

- l'expression de HSP27 (Heat Shock protein 27), protéine chaperonne impliquée dans la survie cellulaire;
- 5 - la synthèse de SIRT3 (Sirtuin 3), enzyme mitochondriale prédominante impliquée dans le métabolisme et dans les processus de défense en cas de stress ;
- la synthèse d'aconitase, véritable garde du corps de la mitochondrie qui agit à la fois sur le métabolisme et sur la préservation de l'ADNmt.

10 L'expression de HSP27 a été étudiée sur des kératinocytes humains jeunes et âgés par PCR quantitative. Les synthèses de SIRT3 et d'aconitase ont été évaluées après marquages immunohistologiques sur des épidermes reconstruits (SILABSKIN® RE) réalisés à partir de kératinocytes jeunes ou vieillis par réplifications successives.

Les protocoles opératoires sont décrits en suivant :

- 15 - A. Test sur kératinocytes

Les kératinocytes sontensemencés dans un milieu de culture adéquat et incubés à 37°C pendant plusieurs jours. Ils sont ensuite traités par le principe actif selon l'invention à 0.40% et 0.70%. après 48h de traitement, les ARN sont recueillis et les ADN complémentaires sont analysés par la technique de PCR quantitative.

- 20 - B. Etude sur épidermes reconstruits :

A **J0**, les kératinocytes humains normaux ou vieillis par réplifications sontensemencés sur l'insert.

Le milieu de culture est changé tous les 2 jours en présence ou non de l'extrait selon l'invention à 0,20% et 0,40% (V/V).

25 A **J15**, les épidermes reconstruits sont fixés, déshydratés et inclus en paraffine. Des coupes (4 µm) sont réalisées à l'aide d'un microtome.

Réalisation des marquages immunohistologiques de SIRT3 et d'aconitase :

- Déparaffinage en xylène
- Démasquage des sites antigéniques
- 30 - Saturation
- Anticorps primaires monoclonaux anti-SIRT3 ou anti-aconitase :
- Anticorps secondaires anti-IgG couplés pour SIRT3 ou aconitase :

Lecture des immunomarquages : la visualisation est réalisée sur microscope confocal couplé à un système d'analyse d'images. Les synthèses de SIRT3 et d'aconitase sont proportionnelles à l'intensité de la fluorescence (couleur verte) présente sur les épidermes reconstruits.

5 Une analyse quantitative des images a été réalisée à l'aide d'un logiciel.

Les résultats sont donnés dans les Tableaux 8 à 10.

	Expression de HSP27 (%)	Capacité à rétablir l'expression de HSP27 (%)
<b>Kératinocytes humains jeunes</b>		
Témoin	100	
Extrait selon l'invention 0,70%	98	
<b>Kératinocytes humains âgés</b>		
Témoin	69 <sup>♦♦</sup>	
Extrait selon l'invention 0,40%	79	32
Extrait selon l'invention 0,70%	95*	84

**Tableau 8** Effet de l'extrait selon l'invention sur l'expression de HSP27 par des kératinocytes humains jeunes et âgés.

♦♦ : résultat significatif selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE normaux témoin ( $p < 0,01$ ).

10 \* : résultats significatifs selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE vieillis témoin ( $p < 0,05$ ).

	Synthèse de SIRT3 ( $\times 10^2$ UA)	Capacité à rétablir la synthèse de SIRT3 (%)
<b>SILABSKIN® RE normaux</b>		
Témoin	1016	
Extrait selon l'invention 0,40%	1025	
<b>SILABSKIN® RE vieillis</b>		
Témoin	695 <sup>♦♦</sup>	
Extrait selon l'invention 0,20%	907*	66
Extrait selon l'invention 0,40%	1115*	131

**Tableau 9** Effet de l'extrait selon l'invention sur la synthèse de SIRT3 dans des SILABSKIN® RE normaux et vieillis.

15 ♦♦ : résultat significatif selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE normaux témoin ( $p < 0,01$ ).

\* : résultats significatifs selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE vieillis témoin ( $p < 0,05$ ).

	Synthèse d'aconitase (x10 <sup>4</sup> UA)	Capacité à rétablir la synthèse d'aconitase (%)
<b>SILABSKIN® RE normaux</b>		
Témoin	207	
Extrait selon l'invention 0,40%	210	
<b>SILABSKIN® RE vieillis</b>		
Témoin	146 <sup>◇◇</sup>	
Extrait selon l'invention 0,20%	188 <sup>**</sup>	69
Extrait selon l'invention 0,40%	208 <sup>**</sup>	102

**Tableau 10.** Effet de l'extrait selon l'invention sur la synthèse d'aconitase dans des SILABSKIN® RE normaux et vieillis.

◇◇ : résultat significatif selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE normaux témoin ( $p < 0,01$ ).

5 \*\* : résultats significatifs selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE vieillis témoin ( $p < 0,01$ ).

Ces résultats montrent que l'expression de HSP27 et les synthèses de SIRT3 et d'aconitase sont diminuées avec le vieillissement.

On constate également d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* permet d'augmenter 3 paramètres principaux du contrôle qualité mitochondrial.

10 En particulier, testé à 0,70% sur kératinocytes âgés, l'extrait selon l'invention stimule significativement l'expression de HSP27 de 84%. De plus, testé à 0,40% sur SILABSKIN® RE vieillis, il active significativement les synthèses de SIRT3 de 131% et d'aconitase de 102%. Ainsi, l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* permet de restaurer les défauts de contrôle qualité mitochondrial au cours du vieillissement.

15 ○ 1.2. Effet d'un extrait selon l'invention sur la dynamique mitochondriale

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* sur la dynamique mitochondriale.

Pour cela, la morphologie du réseau mitochondrial, dictée par l'équilibre entre les mécanismes de fusion (mitochondries allongées) et de fission (mitochondries ponctiformes et sphériques) a été étudiée.

20

La fragmentation du réseau mitochondrial est souvent associée à une perte d'intégrité des mitochondries.

Par conséquent, l'étude morphologique des mitochondries donne des renseignements sur l'état de stress cellulaire. Deux paramètres de forme des mitochondries ont été étudiés : la circularité et le ratio d'aspect.

Ces études ont été réalisées par marquage avec des sondes fluorescentes sur kératinocytes humains normaux jeunes et âgés.

Le protocole opératoire est décrit en suivant.

A J0, les kératinocytes sontensemencés dans du milieu de culture et incubés à 37°C.

Après plusieurs jours de culture, les kératinocytes sont traités avec l'extrait selon l'invention à 0,70% (V/V final) pendant 24h.

10 Le milieu de culture est éliminé et remplacé puis les kératinocytes sont incubés à 37°C.

Après 6 heures, on réalise deux marquages

avec la sonde MitoTracker® Green FM et le Hoechst 33342.

avec la sonde CellMask™ Orange plasma membrane stain.

La visualisation est réalisée sur microscope confocal couplé à un système d'analyse d'images

15 Mlitoshape®.

Les mitochondries apparaissent colorées en vert.

La coloration de la membrane plasmique et du noyau sert à la détection automatique des cellules lors de la quantification.

La quantification des paramètres de circularité et de ratio d'aspect du réseau mitochondrial

20 pour chaque cellule est réalisée numériquement :

- La circularité correspond au degré de branchement et à la longueur des mitochondries.
- Le ratio d'aspect correspond au ratio : longueur de la mitochondrie / largeur de la mitochondrie.

25 Les 2 paramètres utilisés sont inversement corrélés. Plus le réseau mitochondrial sera fragmenté plus la circularité sera élevée et le ratio d'aspect faible.

Les résultats sont donnés dans les Tableaux 11 et 12.

	Circularité (%)	Capacité à rétablir la circularité (%)
<b>Kératinocytes humains jeunes</b>		
Témoin	0,636	
Extrait selon l'invention 0,70%	0,649	
<b>Kératinocytes humains âgés</b>		
Témoin	0,663 <sup>◇</sup>	
Extrait selon l'invention 0,70%	0,650	42

**Tableau 11** Effet de l'extrait selon l'invention sur la circularité du réseau mitochondrial dans des kératinocytes humains jeunes et âgés.

<sup>◇</sup> : résultat significatif selon le test t de Student / aux kératinocytes humains jeunes témoin ( $p < 0,05$ ).

	Ratio d'aspect (%)	Capacité à rétablir le ratio d'aspect (%)
<b>Kératinocytes humains jeunes</b>		
Témoin	1,258	
Extrait selon l'invention 0,70%	1,219	
<b>Kératinocytes humains âgés</b>		
Témoin	1,117 <sup>◇◇</sup>	
Extrait selon l'invention 0,70%	1,196*	48

**Tableau 12** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* sur le ratio d'aspect du réseau mitochondrial dans des kératinocytes humains jeunes et âgés.

<sup>◇◇</sup> : résultat significatif selon le test t de Student / aux kératinocytes humains jeunes témoin ( $p < 0,01$ ).

\* : résultat significatif selon le test t de Student / aux kératinocytes humains âgés témoin ( $p < 0,05$ ).

- 5 On constate qu'avec le vieillissement, la morphologie du réseau mitochondrial est modifiée. On observe une circularité augmentée et un ratio d'aspect diminué dans les kératinocytes humains âgés par rapport aux kératinocytes humains jeunes.
- Ces résultats montrent également que l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* permet une amélioration de l'intégrité des mitochondries dans des kératinocytes humains
- 10 âgés, en restaurant les paramètres morphologique de kératinocytes humains jeunes. En particulier, dans les conditions de l'étude, testé à 0,70% sur kératinocytes âgés, il restaure significativement les deux paramètres de forme des mitochondries à hauteur de :
- 42% pour la circularité
  - 48% pour le ratio d'aspect

- 1.3 Effet d'un extrait selon l'invention sur la mitophagie et comparaison à l'effet d'un extrait de *Chlorella vulgaris*

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet d'un extrait selon l'invention et d'un extrait de *Chlorella vulgaris* (extrait de *Chlorella vulgaris* de l'exemple 7) sur la mitophagie.

- 5 Pour cela, la colocalisation entre les marqueurs GRP75 (mitochondries) et LC3 (autophagosomes), preuve directe de la prise en charge des mitochondries par mitophagie, a été étudiée.

Ces études ont été réalisées par marquage par immunofluorescence sur kératinocytes humains normaux jeunes soumis à un stress CCCP (carbonyl cyanide m-  
10 chlorophenylhydrazone) connu pour induire la mitophagie. Le protocole opératoire est décrit en suivant.

A J0, les kératinocytes sontensemencés dans du milieu de culture et incubés à 37°C.

Après quelques jours les kératinocytes sont traités avec du milieu contenant du CCCP à 1 µM avec différents produits.

- 15 A J3, un immunomarquage est réalisé dans les conditions suivantes :

- Anticorps primaires anti-GRP75 ou anti-LC3B :
- Anticorps secondaires anti-IgG couplé pour GRP75 ou LC3B :

La visualisation du marquage est réalisée sur microscope confocal couplé à un système d'analyse d'images.

- 20 Les mitochondries apparaissent colorées en vert.

Les autophagosomes apparaissent colorées en rouge.

Le pourcentage de mitophagosomes correspond au nombre d'autophagosomes contenant une mitochondrie rapporté au nombre total d'autophagosomes présents dans les cellules.

- 25 La quantification du pourcentage de mitophagosomes est réalisée grâce à un programme d'analyse implémenté dans un logiciel d'analyse d'images.

La mitophagie est caractérisée par une augmentation du pourcentage de mitophagosomes.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 13.

	Mitophagosomes (%)	Capacité à augmenter les mitophagosomes (%)
<b>Kératinocytes humains jeunes</b>		
Témoin	7.88	
Témoin +	18.73	
CCCP + extrait selon l'invention 0,70%	23.85	27
CCCP + Exemple 7 (hors invention) 0,70%	19.10	2

**Tableau 13** Effet de différents produits sur la production de mitophagosomes dans des kératinocytes humains jeunes traités CCCP.

Ces résultats montrent que le traitement CCCP des kératinocytes entraîne une activation de la mitophagie comme le montre la colocalisation entre les marqueurs GRP75 (mitochondries) et LC3 (autophagosomes) : preuve directe de la prise en charge des mitochondries.

- 5 On constate que l'extrait selon l'invention permet d'augmenter les mitophagosomes. Dans les conditions de l'étude cette augmentation est de 27%. Ainsi un extrait de *Chlorella sorokiniana* permet de potentialiser l'activation de la mitophagie dans les kératinocytes humains.

10 On constate également qu'un extrait de *Chlorella vulgaris*, autre espèce de microalgue du même genre, obtenu selon le même procédé, ne présente pas un tel effet.

## **II. ABSENCE D'EFFET ANTI-RADICALAIRE DE L'EXTRAIT DE CHLORELLA SOROKINIANA SELON L'INVENTION**

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'activité anti-radicalaire d'un extrait selon l'invention, selon la méthode au DPPH.

15 Le Di Phényl Picrylhydrazyl Hydrate (DPPH) est un radical libre, absorbant dans le violet à 517nm. Un produit anti-radicalaire entraîne une disparition de la coloration violette.

La solution DPPH utilisée pour cette étude est une solution préparée à partir de 4,8mg de DPPH dissout dans du méthanol,

Le protocole expérimental de l'étude est décrit en suivant.

20 On ajoute dans des tubes à hémolyse de la solution DPPH et on ajoute la solution diluée du produit à tester (extrait selon l'invention à 10% et 20%) ou de l'eau distillée (pour le blanc).

On agite et on attend 20 minutes avant de lire les densités optiques (DO) à 517nm contre l'air.

Les résultats obtenus sont présentés en pourcentage d'activité anti-radicalaire, dans le Tableau 14.

Dose testée d'actif selon l'invention	Activité DPPH	
PM 17.023.1 35g/l°	10%	7%
	1%	5%
PM 17.025.1 70g/l	10%	7%
	1%	4%

**Tableau 14** Effet de différents produits sur la production de mitophagosomes dans des kératinocytes humains jeunes traités CCCP.

- 5 L'extrait selon l'invention ne présente pas d'activité anti radicalaire selon la méthode du DPPH, car l'homme de métier considère qu'un actif possède une efficacité anti radicalaire / anti oxydante à partir 25% d'activité pour une concentration de maximum 10%.

### III. EFFET DE L'EXTRAIT DE CHLORELLA SOROKINIANA SELON L'INVENTION SUR LE METABOLISME CELLULAIRE ET TISSULAIRE

- 10 ○ III1 Effet d'un extrait selon l'invention sur la production d'ATP

Deux études ont été menées pour montrer l'effet sur la production d'ATP, il s'agit d'une étude in vitro et d'une étude in vivo.

#### Etude in vitro

- 15 L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* sur la production d'ATP.

Les essais ont été réalisés avec plusieurs extraits selon l'invention, tels que présentés précédemment. Comme pour les autres études, les résultats donnés dans cet essai, représentent la moyenne des résultats individuels de ces extraits.

- 20 L'ATP est une source d'énergie directement utilisable par la cellule et est indispensable au bon fonctionnement des cellules.

Le dosage d'ATP intracellulaire a été réalisé par bioluminescence sur kératinocytes humains normaux jeunes et âgés traités ou non au CCCP.

Le protocole opératoire est décrit en suivant.

A J0, les kératinocytes sontensemencés dans du milieu de culture et incubés à 37°C.

Après plusieurs jours de culture, les kératinocytes sont traités avec du milieu contenant ou non du CCCP à 1  $\mu$ M avec un extrait selon l'invention à 0,40% et 0,70% (V/V final).

Après 24h, l'ATP intracellulaire est quantifié à l'aide d'un kit dédié.

Les résultats sont donnés dans les Tableaux 15 et 16.

	Concentration d'ATP ( $\mu$ M)	Capacité à augmenter l'ATP (%)
<b>Kératinocytes humains jeunes</b>		
Témoin	1,92	
Extrait selon l'invention 0,40%	2,21 <sup>◇◇</sup>	15
Extrait selon l'invention 0,70%	2,58 <sup>◇◇</sup>	34
<b>Kératinocytes humains âgés</b>		
Témoin	1,50 <sup>◇◇</sup>	
Extrait selon l'invention 0,40%	1,60	7
Extrait selon l'invention 0,70%	1,84 <sup>**</sup>	23

5 **Tableau 15** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* sur la production d'ATP par des kératinocytes humains jeunes et âgés.

<sup>◇◇</sup> : résultats significatifs selon le test t de Student / aux kératinocytes humains jeunes témoin ( $p < 0,01$ ).

<sup>\*\*</sup> : résultat significatif selon le test t de Student / aux kératinocytes humains âgés témoin ( $p < 0,01$ ).

	Concentration d'ATP ( $\mu$ M)	Capacité à augmenter l'ATP (%)
<b>Kératinocytes humains jeunes</b>		
Témoin CCCP	0.93	
CCCP + Extrait selon l'invention 0,40%	1.61	73
CCCP + Extrait selon l'invention 0,70%	1.76	89
<b>Kératinocytes humains âgés</b>		
Témoin CCCP	0.89	
CCCP + Extrait selon l'invention 0,40%	1.29	45
CCCP + Extrait selon l'invention 0,70%	1.47	65

10 **Tableau 16** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* sur la production d'ATP par des kératinocytes humains jeunes et âgés soumis à une agression CCCP.

<sup>◇◇</sup> : résultat significatif selon le test t de Student / aux kératinocytes humains jeunes témoin CCCP ( $p < 0,01$ ).

<sup>\*</sup> : résultat significatif selon le test t de Student / aux kératinocytes humains âgés témoin CCCP ( $p < 0,05$ ).

On constate que les kératinocytes humains âgés soumis ou non à un stress CCCP produisent significativement moins d'ATP que les kératinocytes jeunes dans les mêmes conditions.

15 Ces résultats montrent également que l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* permet d'activer la production de l'énergie nécessaire au bon fonctionnement cellulaire.

En particulier, dans les conditions de l'étude, testé à 0,70%, il permet d'augmenter significativement la production d'ATP de :

- 34% sur kératinocytes jeunes,
- 23% sur kératinocytes âgés,
- 5 -89% sur kératinocytes jeunes traités CCCP,
- 65% sur kératinocytes âgés traités CCCP.

### **Etude in vivo**

L'objectif de cette étude a été d'évaluer, *in vivo*, l'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% en émulsion sur la production d'ATP, en comparaison à un placebo.

- 10 L'effet de l'extrait a été étudié sur 20 volontaires, sains, caucasiens, de sexe féminin, d'âge moyen  $42 \pm 5$  ans.

La concentration en ATP est dosée par luminométrie. Les prélèvements ont été réalisés, au niveau des joues sur des zones asymétriques à l'aide de D-squames®, avant et 2 heures après une application unique ainsi qu'après 7 jours d'utilisation biquotidienne des formules.

- 15 Un résumé des résultats correspondant à l'effet des extraits de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% et comparé au placebo, sur la production d'ATP est présenté dans le Tableau 17.

	Variation / Placebo (%)
T2H	+51,1 (p = 0,0083)
J7	+54,2 (p = 0,0156)

**Tableau 17** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% sur la production d'ATP en comparaison au placebo.

- 20 Ces résultats montrent encore que l'utilisation d'un extrait selon l'invention permet d'augmenter la production d'ATP.

En particulier, on constate que dans les conditions de cette étude, et en comparaison au placebo, dès 2 heures après une unique application, l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* permet de booster significativement la production d'ATP de 51%. Il continue à

- 25 activer la production d'ATP après 7 jours d'applications biquotidiennes.

### III.2 Effet d'un extrait selon l'invention sur le renouvellement cellulaire et la fonction barrière

Deux études ont été menées pour montrer l'effet sur la production d'ATP, il s'agit d'une étude in vitro et d'une étude in vivo.

#### **Etude in vitro**

- 5 L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité d'un extrait selon l'invention à favoriser la construction d'un épiderme stratifié et fonctionnel.
- Les essais ont été réalisés avec plusieurs extraits selon l'invention, tels que présentés précédemment. Comme pour les autres essais, les résultats donnés dans cet essai, représentent la moyenne des résultats individuels de ces extraits.
- 10 Pour cela, un marqueur de prolifération (Ki-67) qui permet de valider la fonctionnalité des épidermes reconstruits ont été étudiés.
- Cette étude a été réalisée par marquages immunohistologiques sur épidermes reconstruits (SILABSKIN® RE) à partir de kératinocytes humains vieillis par répliquations successives.
- A J0, les kératinocytes humains normaux ou vieillis sontensemencés sur l'insert.
- 15 Le milieu de culture est changé tous les 2 jours en présence ou non d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* à 0,20% et 0,40% (V/V).
- Après plusieurs jours de culture, les épidermes reconstruits sont fixés, déshydratés et inclus en paraffine. Des coupes (4 µm) sont réalisées à l'aide d'un microtome.
- On réalise des marquages immunohistologiques dans les conditions suivantes :
- 20                   - Anticorps primaire anti-Ki67:  
                      - Anticorps secondaire anti-IgG couplé pour Ki67
- La visualisation est réalisée sur microscope couplé à un système d'analyse d'images.
- La synthèse de Ki-67 est proportionnelle à l'intensité de la fluorescence (couleur jaune) présente sur les coupes de SILABSKIN® RE.
- 25 Les noyaux des cellules apparaissent colorés en bleu.
- Les résultats sont donnés dans le Tableau 18.

	Nombre de cellules Ki-67 positives (%)	Capacité à rétablir la synthèse de Ki-67 (%)
<b>SILABSKIN® RE normaux</b>		
Témoin	58	
Extrait selon l'invention 0,40%	57	
<b>SILABSKIN® RE vieillies</b>		
Témoin	53 <sup>◇</sup>	
Extrait selon l'invention 0,20%	61 <sup>**</sup>	160
Extrait selon l'invention 0,40%	63 <sup>**</sup>	200

**Tableau 18.** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* sur la synthèse de Ki-67 dans des SILABSKIN® RE normaux et vieillies.

<sup>◇</sup> : résultat significatif selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE normaux témoin ( $p < 0,05$ ).

<sup>\*\*</sup> : résultats significatifs selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE vieillies témoin ( $p < 0,01$ ).

5 Ces résultats montrent que la synthèse de Ki-67, est diminuée dans les SILABSKIN® RE vieillies par rapport aux SILABSKIN® RE normaux.

On constate que l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* permet de rétablir le renouvellement des SILABSKIN® RE vieillies.

10 En particulier, dans les conditions de l'étude, testé à 0,40% sur SILABSKIN® RE vieillies, il permet d'augmenter significativement la synthèse de Ki-67, de 200%.

### **Etude in vivo**

L'objectif de cette étude a été d'évaluer *in vivo* l'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana*, formulé à 2% en émulsion sur le renouvellement cellulaire en comparaison à un placebo.

15 L'étude a été réalisée sur 18 volontaires sains, caucasiens, de sexe féminin, d'âge moyen de  $39 \pm 5$  ans.

20 Les mesures de la couleur de la peau ont été réalisées sur des zones situées au niveau du ventre, après coloration à la dihydroxyacétone (DHA), à l'aide d'un Chromamètre®. Les mesures ont eu lieu avant, 72 heures après coloration, puis 5 fois au cours des 14 jours d'applications biquotidiennes de la composition contenant l'extrait de *Chlorella sorokiniana* et le placebo.

Deux paramètres ont été étudiés :

- le paramètre b\* (caractéristique de la pigmentation jaune mélanique cutanée). Plus le paramètre b\* diminue, plus la peau s'éclaircit.

- le paramètre  $\Delta E$  (caractéristique de la variation de la couleur). Plus ce paramètre augmente, plus la décoloration de la zone colorée à la DHA est importante

Un résumé des résultats correspondant à l'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2,5% et comparé au placebo sur l'évolution des paramètres  $b^*$  et  $\Delta E$ , caractéristique du renouvellement cellulaire est présenté dans les Tableaux 19 et 20.

	Evolution du paramètre $b^*$				
	J2-J0	J4-J0	J7-J0	J11-J0	J14-J0
<b>Zone non traitée</b>	-0,9	-1,3	-2,0	-4,5	-5,3
<b>Placebo</b>	-0,8	-1,3	-2,7	-4,6	-5,0
<b>Extrait de <i>Chlorella sorokiniana</i> 2,5%</b>	-1,1	-2,4	-3,6	-5,2	-5,3

<i>p</i> -valeur / placebo	0,2040	<b>0,0012</b>	<b>0,0035</b>	<b>0,0490</b>	0,3475
----------------------------	--------	---------------	---------------	---------------	--------

**Tableau 19** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% en émulsion sur le paramètre  $b^*$  après 14 jours d'applications biquotidiennes.

	Evolution du paramètre $\Delta E$				
	J2	J4	J7	J11	J14
<b>Zone non traitée</b>	2,6	3,1	4,5	6,9	8,8
<b>Placebo</b>	2,8	4,0	5,4	7,9	9,0
<b>Extrait de <i>Chlorella sorokiniana</i> 2,5%</b>	2,8	4,4	6,3	8,6	9,2

<i>p</i> -valeur / placebo	0,5346	0,0958	<b>0,0490</b>	<b>0,0154</b>	0,3289
----------------------------	--------	--------	---------------	---------------	--------

**Tableau 20** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% en émulsion sur le paramètre  $\Delta E$  après 14 jours d'applications biquotidiennes.

10

On constate que l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* permet d'accélérer le renouvellement cellulaire. En particulier, dans les conditions de cette étude, après 14 jours d'applications biquotidiennes, en comparaison au placebo, un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% diminue plus rapidement le paramètre  $b^*$  représentatif de la couleur jaune mélanique et augmente le paramètre  $\Delta E$  caractéristique de l'éclaircissement de la peau.

15

### III.3 Effet d'un extrait selon l'invention sur la fonction barrière

Deux études ont été menées pour montrer l'effet de l'extrait de *Chlorella sorokiniana* selon l'invention sur la fonction barrière cutanée. Une première étude in vitro a permis d'évaluer l'effet sur la différenciation épidermique et une seconde étude in vivo complète par l'étude  
5 des pertes insensibles en eau en condition ou non de stress.

#### **Etude in vitro**

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité d'un extrait selon l'invention à favoriser la construction d'un épiderme stratifié et fonctionnel.

Les essais ont été réalisés avec plusieurs extraits selon l'invention, tels que présentés  
10 précédemment. Comme pour les autres essais, les résultats donnés dans cet essai, représentent la moyenne des résultats individuels de ces extraits.

Pour cela, des marqueurs de différenciation (cytokératine 10 et loricrine) qui permettent de valider la fonctionnalité des épidermes reconstruits ont été étudiés.

Ces études ont été réalisées par marquages immunohistologiques sur épidermes  
15 reconstruits (SILABSKIN® RE) à partir de kératinocytes humains vieilliss par répliquions successives.

A J0, les kératinocytes humains normaux ou vieilliss sont ensemencés sur l'insert.

Le milieu de culture est changé tous les 2 jours en présence ou non d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* à 0,20% et 0,40% (V/V).

20 Après plusieurs jours de culture, les épidermes reconstruits sont fixés, déshydratés et inclus en paraffine. Des coupes (4 µm) sont réalisées à l'aide d'un microtome.

On réalise des marquages immunohistologiques dans les conditions suivantes :

- Anticorps primaires anti-CK10 ou anti-loricrine :
- Anticorps secondaires anti-IgG couplé pour CK10 ou loricrine

25 La visualisation est réalisée sur microscope couplé à un système d'analyse d'images.

Les synthèses de la cytokératine 10 et de la loricrine sont proportionnelles à l'intensité de la fluorescence verte présente sur les coupes de SILABSKIN® RE.

Les noyaux des cellules apparaissent colorés en bleu.

Les résultats sont donnés dans les Tableaux 21 et 22.

	Synthèse de CK10 (x10 <sup>4</sup> UA)	Capacité à rétablir la synthèse de CK10 (%)
<b>SILABSKIN® RE normaux</b>		
Témoin	1990	
Extrait selon l'invention 0,40%	1991	
<b>SILABSKIN® RE vieillis</b>		
Témoin	1731 <sup>◇</sup>	
Extrait selon l'invention 0,20%	1856*	48
Extrait selon l'invention 0,40%	1878**	57

**Tableau 21** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* sur la synthèse de CK10 dans des SILABSKIN® RE normaux et vieillis.

<sup>◇</sup> : résultat significatif selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE normaux témoin ( $p < 0,05$ )

\* : résultat significatif selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE vieillis témoin ( $p < 0,05$ )

5 \*\* : résultat significatif selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE vieillis témoin ( $p < 0,01$ )

	Synthèse de loricrine (x10 <sup>4</sup> UA)	Capacité à rétablir la synthèse de loricrine (%)
<b>SILABSKIN® RE normaux</b>		
Témoin	497	
Extrait selon l'invention 0,40%	491	
<b>SILABSKIN® RE vieillis</b>		
Témoin	330 <sup>◇◇</sup>	
Extrait selon l'invention 0,20%	398*	41
Extrait selon l'invention 0,40%	445*	69

**Tableau 22** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* sur la synthèse de loricrine dans des SILABSKIN® RE normaux et vieillis.

<sup>◇◇</sup> : résultat significatif selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE normaux témoin ( $p < 0,01$ ).

\* : résultats significatifs selon le test t de Student / aux SILABSKIN® RE vieillis témoin ( $p < 0,05$ ).

10 Ces résultats montrent que les synthèses de cytokératine 10 et loricrine sont diminuées dans les SILABSKIN® RE vieillis par rapport aux SILABSKIN® RE normaux.

On constate que l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* permet de rétablir le renouvellement et la différenciation des SILABSKIN® RE vieillis.

En particulier, dans les conditions de l'étude, testé à 0,40% sur SILABSKIN® RE vieillies, il permet d'augmenter significativement les synthèses cytokératine 10 et loricrine respectivement de 57% et 69%.

### ***Etude in vivo***

- 5 L'objectif de cette étude a été d'évaluer, *in vivo*, l'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% sur la qualité de la fonction barrière de la peau avec et sans stress.
- Dans une première étude, la capacité d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* à améliorer la qualité de la barrière cutanée a été étudiée sur 20 volontaires caucasiens, sains, de sexe féminin, d'âge moyen  $45 \pm 4$  ans.
- 10 Les mesures ont été réalisées au niveau du visage à l'aide d'un Tewamètre® avant et après 14 et 28 jours d'applications biquotidiennes du placebo et d'une composition comprenant un extrait de *Chlorella sorokiniana* en héli-visage.
- Dans une seconde étude, l'extrait de *Chlorella sorokiniana* a été évalué sur sa capacité à réguler les pertes en eau excessives engendrées par une agression répétée à l'aide d'un
- 15 détergent, le Lauryl Sulfate de Sodium (SLS) 10% pendant 14 jours.
- En effet, la barrière cutanée joue un rôle régulateur dans l'équilibre en eau de la peau. Lorsque celle-ci est lésée, il apparaît des dérèglements dans la régulation des échanges d'eau. L'eau migre alors plus facilement vers le milieu extérieur, ce qui augmente la perte insensible en eau. En revanche, si l'état de la barrière cutanée s'améliore, les valeurs de
- 20 perte en eau vont diminuer car la régulation des échanges en eau sera assurée de façon correcte.
- Cet effet a été observé sur 22 volontaires caucasiens, sains, de sexe féminin, d'âge moyen  $44 \pm 4$  ans.
- Les mesures de perte en eau de la peau ont été réalisées avec un Tewamètre® au niveau de
- 25 la face antéro-latérale externe du bras avant et après 7 et 14 jours d'applications biquotidiennes du placebo et de la composition comprenant un extrait de *Chlorella sorokiniana*.

Concernant l'effet sur la perte insensible en eau sans agression, un résumé des résultats correspondant à l'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% sur la perte

insensible en eau de la peau mesurée à l'aide d'un Tewamètre® est présenté dans le Tableau 23.

	Variation / Placebo (%)
<b>J14</b>	-11,2
<b>J28</b>	-18,1

**Tableau 23** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% sur la perte insensible en eau

On constate que l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* sur la peau, permet de diminuer la perte insensible en eau et par conséquent d'améliorer la qualité de la fonction barrière de la peau.

En particulier, dans les conditions de cette étude, dès 14 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison au placebo, un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% en émulsion, diminue significativement la perte insensible en eau de la peau de 11,2%. Cet effet se poursuit après 28 jours d'applications biquotidiennes pour atteindre une diminution significative des pertes en eau, sur une peau saine, de 18,1%.

Concernant l'effet sur la perte insensible en eau avec stress (ou agression)

Un résumé des résultats correspondant à l'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% comparé au placebo sur la PIE mesurée à l'aide d'un Tewamètre® après agression au SLS 10% est présenté dans le Tableau 24.

	Variation / Placebo (%)
<b>J7</b>	-9,3
<b>J14</b>	-24,2

**Tableau 24** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% sur la perte insensible en eau après agressions répétées au SLS

On constate que l'utilisation d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* sur la peau, permet de réguler les pertes en eau excessives engendrées par une agression répétée au SLS.

En particulier, dans les conditions de cette étude, dès 7 jours d'applications biquotidiennes, un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% en gel-émulsionné diminue significativement la perte insensible en eau après agression répétée au SLS de 9,3% en

comparaison au placebo. Cet effet se poursuit après 14 jours d'application, où la diminution des pertes en eau observée atteint 24,2%. Cet effet a été validé chez 73% des volontaires.

#### **IV. EFFET DE L'EXTRAIT DE CHLORELLA SOROKINIANA SUR LES PARAMETRES CUTANES**

Pour les études suivantes, les compositions utilisées présentent les formules suivantes :

5 - Pour les volontaires caucasiens

Isononyl isononanoate (Lanol 99, Seppic)	5,0%
Behenyl alcohol / arachidyl glucoside / arachidyl alcohol (Montanov 202, Seppic)	3,0%
<b>Extrait de <i>Chlorella sorokiniana</i></b>	<b>2,0%</b>
Cetearyl alcohol / cetearyl glucoside (Montanov 68, Seppic)	2,0%
Conservateurs	0,7%
Polyacrylamide / C13-14 isoparaffin / laureth 7 (Sepigel 305, Seppic)	0,3%
Eau	qsp 100%

- Pour les volontaires asiatiques

Glycerine	6,2%
Cetearyl Ethylhexanoate (Lanol 1688, Seppic)	3,0%
Coco-Caprylate / Caprate (Lanol 2681, Seppic)	3,0%
<b>Extrait de <i>Chlorella sorokiniana</i></b>	<b>2,0%</b>
Isononyl isononanoate (Lanol 99, Seppic)	2,0%
Conservateurs	1,0%
Polyacrylate Crosspolymer-6 (Sepimax Zen, Seppic)	0,5%
Hydroxyethyl Acrylate / Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer (Sepinov EMT 10, Seppic)	0,5%
Eau	qsp 100%

##### o IV.1. Effet d'un extrait selon l'invention sur l'éclaircissement de la peau

10 L'objectif de cette étude a été d'évaluer, *in vivo*, l'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% en émulsion sur l'éclaircissement de la peau contre placebo.

L'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* sur l'éclaircissement de la peau a été étudié :

- sur un panel caucasien, composé de 20 volontaires, sains, de sexe féminin, d'âge moyen  $45 \pm 4$  ans.

- sur un panel asiatique composé de 32 volontaires, sains, de sexe féminin, d'âge moyen  $40 \pm 6$  ans.

L'étude sur panel caucasien a été réalisée grâce à des mesures chromamétriques au niveau des joues.

5 Deux paramètres ont été étudiés :

- le paramètre L\* (caractéristique de la clarté de la peau). Plus le paramètre L\* augmente, plus la peau s'éclaircie.
- le paramètre ITA (Angle Typologique Individuel) est retenu pour évaluer l'évolution de l'aspect éclatant de la peau. Une augmentation du paramètre ITA est caractéristique d'une peau plus claire et lumineuse.

10

Pour ce qui est de l'étude sur panel asiatique, une analyse colorimétrique sur photographies numériques a été réalisée.

Trois paramètres ont été retenus :

- le paramètre L\* représente la clarté (du sombre au pâle)
- le paramètre ITA°, permet d'évaluer l'évolution de l'aspect éclatant de la peau.
- l'homogénéité est obtenue à partir d'une analyse de texture qui vise à regarder la variation des couleurs dans toutes les directions de la surface de la peau.

15

20 Dans les deux cas, les mesures ont été réalisées avant et après 14 et 28 jours d'applications biquotidiennes du placebo et de la composition comprenant l'extrait de *Chlorella sorokiniana* en hémi-visage.

#### Etude sur panel caucasien

25 Un résumé des résultats correspondant à l'effet d'une composition comprenant un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2,5% comparé au placebo, sur les paramètres caractéristiques de l'éclaircissement de la peau de personnes de type caucasien, est présenté dans les Tableaux 25 et 26.

	Paramètre ITA°		
	J0	J14	J28
Placebo	29,81	29,92	31,33
<b>Extrait de <i>Chlorella sorokiniana</i></b>	27,65	28,96	32,47

**Tableau 25.** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% sur le paramètre ITA° représentatif de l'éclaircissement de la peau.

	Paramètre L*		
	J0	J14	J28
Placebo	59,59	59,83	60,23
<b>Extrait de <i>Chlorella sorokiniana</i></b>	58,77	59,45	60,46

**Tableau 26** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2%.sur le paramètre L\* représentatif de l'éclaircissement de la peau.

- 5 On constate que dans les conditions de cette étude, après 28 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison au placebo, un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% en émulsion éclaircit la peau de personnes de type caucasien.
- En effet, une augmentation significative des paramètres L\* et ITA°, caractéristiques d'une peau plus claire et plus lumineuse, est observée après 28 jours d'applications biquotidiennes
- 10 d'une composition comprenant un extrait de *Chlorella sorokiniana*.

#### Etude sur panel asiatique

- Un résumé des résultats correspondant à l'effet d'une composition comprenant un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% comparé au placebo, sur les paramètres caractéristiques de l'éclaircissement de la peau de personnes de type asiatique, est présenté
- 15 dans les Tableaux 27 à 29.

	Paramètre ITA°		
	J0	J14	J28
Placebo	72,55	72,55	72,83
<b>Extrait de <i>Chlorella sorokiniana</i></b>	72,63	72,85	73,43

**Tableau 27** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% sur le paramètre ITA° représentatif de l'éclaircissement de la peau

	Paramètre L*		
	J0	J14	J28
Placebo	59,01	59,22	58,93
Extrait de <i>Chlorella sorokiniana</i>	59,02	59,38	59,61

**Tableau 28** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% sur le paramètre L\* représentatif de l'éclaircissement de la peau.

	Paramètre Homogénéité		
	J0	J14	J28
Placebo	0,025	0,025	0,026
Extrait de <i>Chlorella sorokiniana</i>	0,025	0,026	0,027

**Tableau 29** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% sur le paramètre homogénéité de la peau.

On constate que dans les conditions de cette étude, après 28 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison au placebo, un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% en émulsion éclaircit la peau de personnes d'origine asiatique.

En effet, une augmentation significative des paramètres L\* et ITA°, caractéristiques d'une  
 5 peau plus claire et plus lumineuse, est observée après 28 jours d'applications biquotidiennes d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* ainsi qu'une amélioration significative de l'homogénéité de la peau.

○ IV.2. Capacité d'un extrait selon l'invention à améliorer l'éclat du teint

L'objectif de cette étude a été d'évaluer, *in vivo*, l'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana*  
 10 formulé à 2% en émulsion sur l'éclat du teint en comparaison à un placebo.

Cette étude a été réalisée sur 20 volontaires caucasiens, sains, de sexe féminin, d'âge moyen 45 ± 4 ans.

L'évaluation de l'éclat du teint du visage a été réalisée en aveugle, par deux experts entraînés, avant et après 14 et 28 jours d'applications biquotidiennes du placebo ou d'une  
 15 composition comprenant un extrait de *Chlorella sorokiniana* en héli-visage.

Un résumé des résultats correspondant à l'effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% comparé au placebo, sur les principaux paramètres caractéristiques de l'éclat du teint évalué par experts est présenté dans le Tableau 30.

	Variation / Placebo (%)	
	J14	J28
<b>Rayonnement</b>	+5,3	+8,8
<b>Couleur rose</b>	+7,7	+16,3
<b>Couleur olive</b>	-6,1	-11,0
<b>Etat de fatigue des yeux</b>	-7,1	-9,2

**Tableau 30** Effet d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% sur l'éclat du teint.

5 On constate que dans les conditions de cette étude, dès 14 jours d'applications biquotidiennes et en comparaison au placebo, un extrait de *Chlorella sorokiniana* formulé à 2% en émulsion :

- améliore significativement le rayonnement de la peau de 5,3% ainsi que la couleur rose, caractéristique d'un teint frais de 7,7%,

10 - diminue significativement la couleur olive de 6,1% et l'état de fatigue des yeux de 7,1%.

Cet effet se poursuit après 28 jours d'applications. On constate ainsi que l'application d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* :

15 - augmente significativement le rayonnement de la peau de 8,8% ainsi que la couleur rose, de 16,3% (effet validé chez 85% des volontaires),

- permet une diminution significative de la couleur olive de 11,0% et de l'état de fatigue des yeux de 9,2% (effet validé chez 75% des volontaires).

REVENDEICATIONS

1. Utilisation cosmétique d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* dans une composition cosmétique en tant qu'agent cosmétique.

2. Utilisation cosmétique d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* selon la revendication 1, en tant qu'agent cosmétique améliorant l'aspect esthétique et/ou la texture de la peau.

5 3. Utilisation cosmétique d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* selon la revendication 1 ou 2, en tant qu'agent cosmétique améliorant l'éclat du teint.

4. Utilisation cosmétique d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* selon l'une des précédentes revendications, en tant qu'agent cosmétique stimulant le renouvellement des cellules de l'épiderme et/ou à renforcer la barrière cutanée.

10 5. Utilisation cosmétique d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* selon l'une des précédentes revendications, en tant qu'agent cosmétique améliorant le fonctionnement des mitochondries des cellules de l'épiderme.

15 6. Utilisation cosmétique d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* selon l'une des précédentes revendications, caractérisé en ce que ledit extrait est un hydrolysate de *Chlorella sorokiniana*.

7. Extrait de *Chlorella sorokiniana*, comprenant au moins des carbohydrates, des protéines et des minéraux, caractérisé en ce que les carbohydrates représentent au moins 36% en poids de matière sèche de l'extrait.

20 8. Extrait de *Chlorella sorokiniana* selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est caractérisé par :

- une teneur en carbohydrates comprise entre 36 et 94%
- une teneur en protéines comprise entre 6 et 40%

les pourcentages étant donnés en poids par rapport au poids total de matière sèche de l'extrait.

25 9. Extrait de *Chlorella sorokiniana* selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce qu'au moins 70% des carbohydrates sont des oligosaccharides et des polysaccharides de glucose de masses molaires comprises entre 345 et 8400Da, le pourcentage étant donné en poids par rapport au poids total des carbohydrates de l'extrait.

10. Extrait de *Chlorella sorokiniana* selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce qu'au moins 90% des protéines ont une masse molaire inférieure à 3500 Da, le pourcentage étant donné en poids par rapport au poids total des protéines de l'extrait.

11. Extrait de *Chlorella sorokiniana* selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un hydrolysate de *Chlorella sorokiniana*.

12. Extrait de *Chlorella sorokiniana* selon l'une des revendications 7 à 11, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un hydrolysate enzymatique de *Chlorella sorokiniana*.

13. Utilisation cosmétique d'un extrait de *Chlorella sorokiniana* selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ledit extrait est un extrait selon l'une des revendications 7 à 12.

14. Composition cosmétique comprenant au moins 0,5% en poids d'un extrait de de *Chlorella sorokiniana*.

15. Composition cosmétique selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme de crème, lotion, lait, sérum, pommade, gel, pâte, mousse, ou sous forme solide.

16. Procédé de traitement cosmétique pour améliorer l'aspect esthétique de la peau, caractérisé en ce qu'il comprend l'application sur la peau d'au moins un extrait de *Chlorella sorokiniana* ou d'une composition en contenant.

20. Procédé de traitement cosmétique selon la revendication 16, pour améliorer l'éclat du teint de la peau.

18. Procédé de traitement cosmétique selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que l'extrait de *Chlorella sorokiniana* est un extrait selon l'une des revendications 7 à 12.

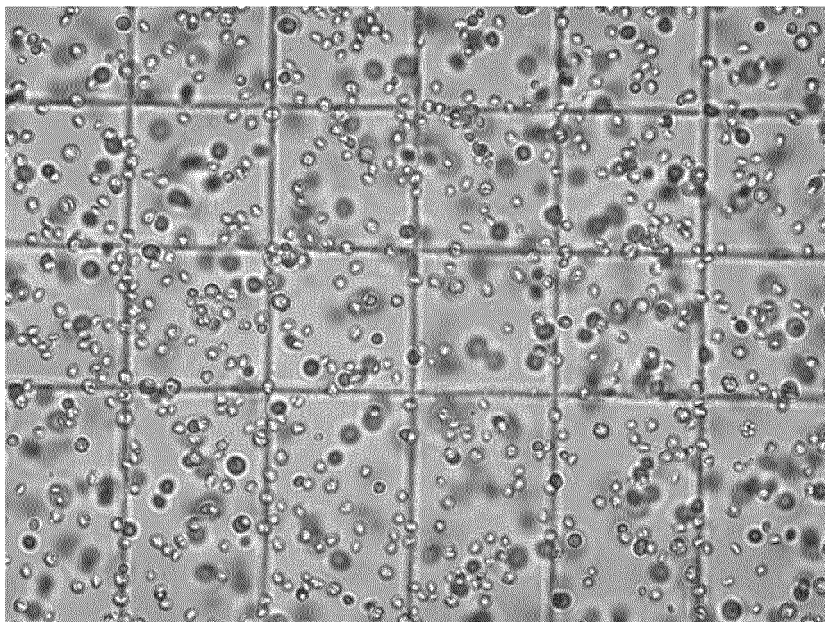


Figure 1

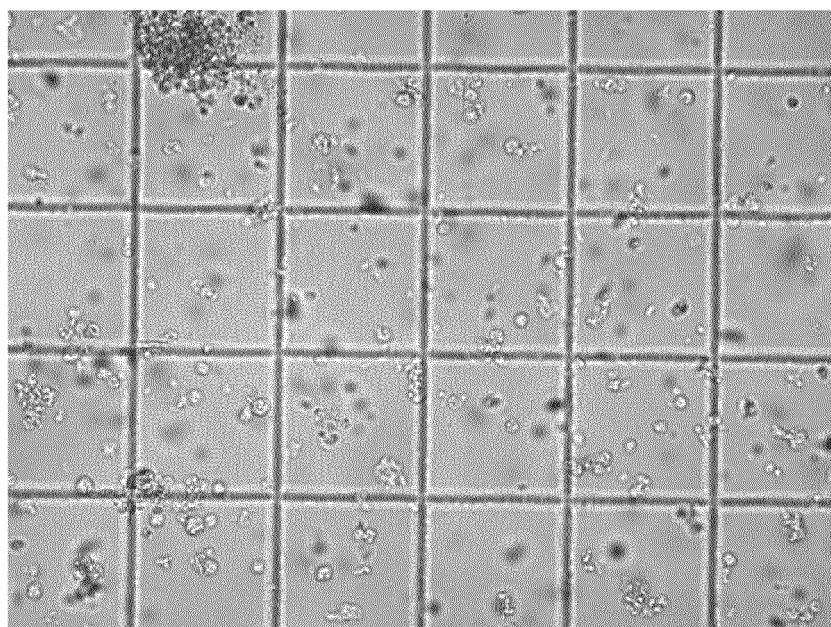


Figure 2

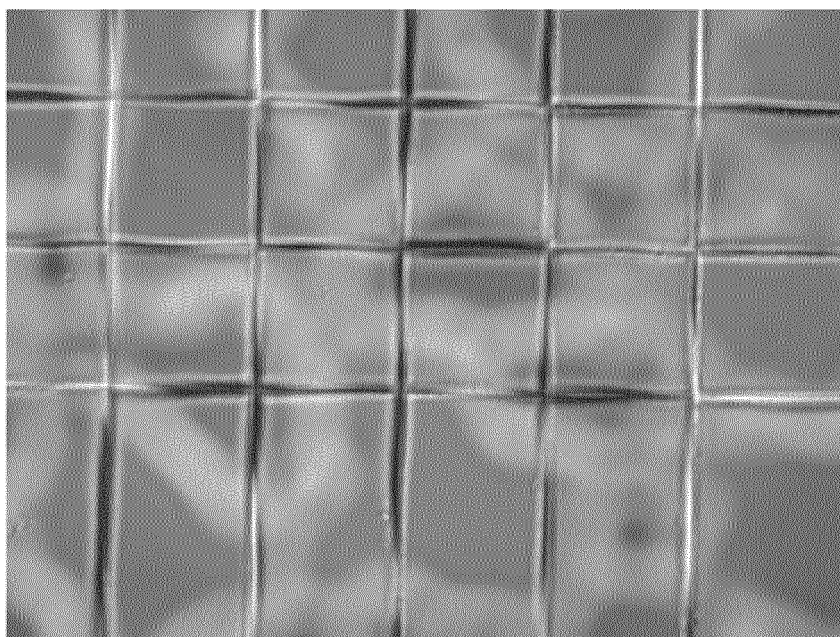


Figure 3



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement  
national

FA 837820  
FR 1770319

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	US 2012/202768 A1 (CORAGLIOTTI ANNA [US] ET AL) 9 août 2012 (2012-08-09) * revendications 1-69 * * exemples 1-18 * * alinéa [0001] - alinéa [0018] * -----	1-18	A61K8/99 A61Q19/08 A61Q19/00 C12N1/12
X	EP 1 808 483 A1 (COGNIS IP MAN GMBH [DE]) 18 juillet 2007 (2007-07-18) * revendications 1-11 * -----	1-18	
X	US 2009/111876 A1 (HSIEH HSING-PANG [TW] ET AL) 30 avril 2009 (2009-04-30) * alinéas [0010], [0015] * * revendications 1-21 * * exemple 1 * -----	1-18	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			A61K A61Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
31 juillet 2017		Schifferer, Hermann	
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			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1770319 FA 837820**

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 **31-07-2017**

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
US 2012202768 A1	09-08-2012	US 2012202768 A1 US 2015150776 A1	09-08-2012 04-06-2015
-----			
EP 1808483 A1	18-07-2007	EP 1808483 A1 ES 2374079 T3 US 2007196893 A1	18-07-2007 13-02-2012 23-08-2007
-----			
US 2009111876 A1	30-04-2009	CN 101444542 A HK 1129326 A1 KR 20090042181 A MY 149112 A SG 152154 A1 TW 200918083 A US 2009111876 A1	03-06-2009 15-07-2011 29-04-2009 15-07-2013 29-05-2009 01-05-2009 30-04-2009
-----			