

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
16 octobre 2014 (16.10.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/167247 A2

(51) Classification internationale des brevets : Non classée

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2014/050852

(22) Date de dépôt international :
9 avril 2014 (09.04.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1353200 9 avril 2013 (09.04.2013) FR

(72) Inventeur; et

(71) Déposant : THOREL, Jean-Noël [FR/FR]; 3 Rue Laro-
chelle, F-75014 Paris (FR).

(72) Inventeur : PELLAY, François-Xavier; 3 Square des
Tilleuls, F-92360 Meudon La Foret (FR).

(74) Mandataires : BUCHET, Anne et al.; Cabinet Laurent &
Charras, Le Contemporain, 50 Chemin de la Bruyère, F-
69574 Dardilly Cédex (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))
- avec la partie de la description réservée au listage des sé-
quences (règle 5.2.a))

(54) Title : EXTRACT OF *ARTHROBACTER AGILIS* FOR USE IN PARTICULAR IN COSMETICS

(54) Titre : EXTRAIT D'ARTHROBACTER AGILIS POUR SON UTILISATION NOTAMMENT EN COSMETIQUE

(57) Abstract : The invention relates to a cosmetic, pharmaceutical or food composition including an extract of the *Arthrobacter agilis* bacterium, advantageously rich in carotenoids.

(57) Abrégé : Composition cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire comprenant un extrait de la bactérie *Arthrobacter agilis*, avantageusement riche en caroténoïdes.



WO 2014/167247 A2

EXTRAIT D'ARTHROBACTER AGILIS POUR SON UTILISATION NOTAMMENT EN COSMETIQUE

Domaine de l'invention

5

La présente invention a pour objet un extrait d'*Arthrobacter agilis* pour son utilisation notamment en cosmétique, et plus précisément un extrait riche en caroténoïdes.

10

Plus précisément, l'invention repose sur la mise en évidence de la protection des protéines contre les radicaux libres de l'oxygène (ROS) et les radiations de la lumière (UV et visible) d'un tel extrait, permettant de lutter contre l'altération des cellules, en particulier celle de la peau, provoquée par les agressions extérieures. Un tel extrait, éventuellement en association avec d'autres agents antioxydants, permet donc de lutter contre le stress oxydant et notamment le vieillissement cellulaire.

15

Etat de la technique

20

Chez les organismes aérobies et notamment chez l'homme, l'oxygène est nécessaire à la survie mais est également responsable de dommages oxydatifs liés à ses métabolites réactifs. Ainsi, le terme ROS (pour « reactive oxygen species ») ou ROM (pour « reactive oxygen metabolites ») est couramment utilisé pour désigner tous les radicaux libres et les espèces chimiques non radicalaires qui prennent part aux processus biologiques oxydatifs et dont l'excès est considéré comme la base d'un nombre croissant de procédés dégénératifs et de maladies. Plus précisément, le terme ROS inclut le radical anionique superoxyde O_2^- , le radical hydroxyle $OH\cdot$, l'oxygène singulet 1O_2 et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , ainsi que les radicaux alkoxys $RO\cdot$ et les radicaux peroxy $ROO\cdot$, qui sont formés à partir des molécules organiques dans les processus oxydatifs. La production d'origine exogène de ces métabolites dépend essentiellement d'événements physiques, tels que les irradiations aux ultraviolets (UV), ou des événements chimiques, tels que des agents xénobiotiques. La production endogène, quant à elle, est essentiellement liée à la fuite d'électrons dans la chaîne respiratoire au niveau des mitochondries.

25

30

35

Quel que soit leur procédé de formation, ces métabolites sont dangereux pour l'organisme en raison de leur haute réactivité et leur action affecte divers composants cellulaires, parmi lesquels un grand nombre de protéines structurales, des enzymes, des acides aminés, l'ADN et l'ARN, les glucides, ainsi que les lipides et les phospholipides.

A noter que dans le cas d'irradiations aux UV, outre la génération d'espèces réactives, il peut y avoir en plus un dommage physique direct sur les composants cellulaires. Ainsi, les UV sont connus pour induire des dimères de thymine qui peuvent engendrer des mutations, voire des cassures de l'ADN.

5

Dans une situation de production excessive de métabolites réactifs, l'organisme est confronté à un processus dit de « stress oxydatif » ou « stress oxydant ».

10 Pour se défendre contre les dommages causés par ces métabolites, l'organisme a développé des systèmes de défense contre l'oxydation pour diminuer la réactivité de ces substances, voire pour les neutraliser. Ces systèmes peuvent être de nature protéique, comme l'albumine sérique (HSA), la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, les peroxydases ou des petits peptides, ou de nature non protéique, tels que l'ubiquinol, les anthocyanines, les flavonoïdes, les vitamines liposolubles (à titre d'exemple les vitamines
15 A et E) et les vitamines hydrosolubles (à titre d'exemple la vitamine C). Les cellules possèdent également des systèmes de réparation et de dégradation des molécules oxydées.

20 Ainsi, pour lutter contre le stress oxydatif, il est conseillé d'adopter un régime riche en substances naturellement anti-oxydantes et de prendre des médicaments ou compléments alimentaires à base notamment de vitamines capables de neutraliser les espèces réactives. Dans le domaine cosmétique, de nombreux produits intègrent des agents antioxydants permettant notamment de lutter contre le vieillissement prématuré lié au stress oxydatif.

25 Par conséquent, la recherche de nouvelles molécules ou de nouveaux extraits présentant une activité anti-oxydante, à intégrer notamment dans des compléments alimentaires ou des compositions cosmétiques, est depuis de nombreuses années un enjeu majeur.

Description de l'invention

30

La présente invention repose sur l'identification d'un extrait issu d'une bactérie extrêmophile, présentant une activité anti-oxydante d'intérêt. Outre un effet direct sur les radicaux libres, la présente demande rapporte un effet particulier d'un tel extrait sur les dommages causés par les UV voire par la lumière visible, et plus généralement un effet
35 protecteur, voire stabilisant sur les protéines, ainsi qu'une synergie avec des antioxydants connus.

Ainsi, la présente invention concerne un extrait de la bactérie *Arthrobacter agilis*, plus précisément un extrait riche en caroténoïdes obtenu à partir de cette bactérie.

La bactérie *Arthrobacter agilis* a été par exemple décrite par Koch *et al.* (*Int J Syst Bacteriol.* 1995, 45(4):837-9) et peut être aisément identifiée, notamment grâce à la séquence de son ARN 16S accessible dans les bases de données sous le numéro X80748 et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 1 suivante :

```
GATCCTGGCT CAGGATGAAC GCTGGCGGCG TGCTTAACAC ATGCAAGTCG AACGATGAAC
CTCACTTGTG GGGGGATTAG TGGCGAACGG GTGAGTAACA CGTGAGTAAC CTGCCCTTGA
10 CTCTGGGATA AGCCTGGGAA ACCGGGTCTA AACTGGATA CGACCTTCTG GCGCATGCCA
TGTTGGTGGA AAGCTTTTGT GGTTTTGGAT GGAATCGCGG CCTATCAGCT TGTTGGTGGG
GTAATGGCCT ACCAAGGCGA CGACGGGTAG CCGGCCTGAG AGGGTGACCG GCCACACTGG
GACTGAGACA CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGGAATATTG CACAATGGGC
GCAAGCCTGA TGCAGCGACG CCGCGTGAGG GATGAAGGCC TTCGGGTTGT AAACCTCTTT
15 CAGTAGGGAA GAAGCCTGTC TTTTGGGTGG GTGACGGTAC CTGCAGAAGA AGCGCCGGCT
AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGGCGCAAG CGTTATCCGG AATTATTGGG
CGTAAAGAGC TCGTAGGCGG TTTGTGCGGT CTGCCGTGAA AGTCCGGGGC TTAACCTCCG
ATCTGCGGTG GGTACGGGCA GACTAGAGTG CAGTAGGGGA GACTGGAATT CCTGGTGTAG
CGGTGAAATG CGCAGATATC AGGAGGAACA CCGATGGCGA AGGCAGGTCT CTGGGCTGTA
20 ACTGACGCTG AGGAGCGAAA GCATGGGGAG CGAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAT
GCCGTAAACG TTGGGCACTA GGTGTGGGGG ACATTCCACG TTTTCCGCGC CGTAGCTAAC
GCATTAAGTG CCCCCTGG GGAGTACGGC CGCAAGGCTA AACTCAAAG GAATTGACGG
GGGCCCCGAC AAGCGGCGGA GCATGCGGAT TAATTCGATG CAACGCGAAG AACCTTACCA
AGGCTTGACA TGAACCGGAA TGATGCAGAG ATGTGTCAGC CACTTGTGGC CGGTTTACAG
25 GTGGTGCATG GTTGTCTGCA GCTCGTGTG TGAGATGTTG GGTAAAGTCC CGCAACGAGC
GCAACCCTCG TTCCATGTTG CCAGCGGGT ATGCCGGGGA CTCATGGGAG ACTGCCGGGG
TCAACTCGGA GGAAGGTGGG GACGACGTCA AATCATCATG CCCCTTATGT CTTGGGCTTC
ACGCATGCTA CAATGGCCGG TACAAAGGGT TGCGATACTG TGAGGTGGAG CTAATCCCAA
AAAGCCGGTC TCAGTTCGGA TTGAGGTCTG CAACTCGACC TCATGAAGTT GGAGTCGCTA
30 GTAATCGCAG ATCAGCAACG CTGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCC
TCAAGTCACG AAAGTTGGTA ACACCGAAG CCGGTGGCCT AACCCCTTGT GGGAGGGAGC
CGTCGAAGGT GGGACCGGCG ATTGGGACTA AGTCGTAACA AG
```

Ainsi et selon un mode de réalisation particulier, la souche bactérienne mise en œuvre possède un ARN 16S codé par une séquence présentant plus de 90%, voire plus de 95%, voire 99%, voire même 100% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1, par exemple de séquence partielle SEQ ID NO : 2.

Selon un mode de réalisation particulier, un tel extrait contient des caroténoïdes, avantageusement est riche en caroténoïdes.

5 Dans le cadre de l'invention, on entend par « caroténoïdes » des pigments liposolubles caractérisés par leur couleur pouvant aller du rouge au jaune et leur spectre d'absorption. Ils appartiennent à la famille chimique des terpénoïdes, à structure aliphatique ou alicyclique polyinsaturée.

10 Comme mentionné, un extrait selon l'invention contient des caroténoïdes, qui peuvent aussi bien être membranaires que cytoplasmiques.

De manière avantageuse et comme par exemple mis en évidence par une analyse HPLC, un extrait objet de la présente invention est riche en caroténoïdes. Les caroténoïdes présentent une zone d'absorption maximale entre 400 et 600 nm, plus précisément entre 15 450 et 550 nm, et sont identifiables par leur spectre d'absorption à « 3 doigts » à une longueur d'onde proche de 490 nm. Encore plus avantageusement, les caroténoïdes représentent plus de 50%, voire 60%, 70%, 80% ou même 90% en quantité de l'extrait. Préférentiellement, l'extrait est dépourvu de protéines et/ou d'ADN et/ou de glucides.

20 Selon un mode de réalisation privilégié, l'extrait selon l'invention contient différentes formes de caroténoïdes, avantageusement 6 formes principales, y compris différents isomères ou formes glycosylées.

25 Un extrait selon l'invention est avantageusement obtenu par culture d'*Arthrobacter agilis* dans les conditions suivantes :

Le milieu de culture utilisé est typiquement un milieu LB sans sel, à savoir contenant 1% en poids de tryptone et 0,5% en poids d'extrait de levure. Alternativement, des milieux R2A (Koch *et al.*, 1995, *Int J Syst Bacteriol.* 45(4):837-9) et Bacto Marine 2216 (Fong *et al.*, 2001, *Appl Microbiol Biotechnol.* 56(5-6):750-6) peuvent être envisagés.

Les cellules sont avantageusement cultivées à une température comprise entre 20 et 30°C, par exemple 25°C.

35 De manière adaptée, la croissance se fait dans des conditions d'aérobiose, préférentiellement sous aération par bulle d'air ou d'oxygène.

L'extrait selon l'invention est avantageusement obtenu à partir de cellules en phase stationnaire, soit typiquement après une croissance de 3 jours dans les conditions décrites ci-dessus.

- 5 Pour l'obtention de l'extrait, les cellules bactériennes sont soumises à un protocole d'extraction/purification permettant d'isoler et de purifier les caroténoïdes. En raison du caractère liposoluble des caroténoïdes, l'obtention de l'extrait objet de l'invention repose avantageusement sur l'isolation d'une phase apolaire.
- 10 Dans une première étape, il s'agit d'extraire des composants membranaires et cytoplasmiques, avantageusement à l'exception des lipides, des protéines et de l'ADN. De manière adaptée, un solvant polaire est mis en œuvre permettant de « casser » les membranes et de solubiliser un très grand nombre de molécules hydrophiles et certaines lipophiles.
- 15 Ainsi et à titre d'exemple, le culot bactérien peut être extrait à l'aide d'acétone, de méthanol ou d'un mélange acétone/méthanol (par exemple 1/5 en volume).
- Dans une seconde étape, l'ajout d'un solvant apolaire, avantageusement de l'hexane, et
- 20 d'une solution aqueuse saturée en sels, avantageusement une solution de NaCl saturée, permet l'obtention d'un mélange biphasique, à savoir une phase aqueuse d'un côté et la phase apolaire de l'autre correspondant à l'extrait d'intérêt dans le cadre de l'invention. De manière avantageuse, la phase aqueuse peut être lavée, éventuellement plusieurs fois, à l'aide du solvant apolaire.
- 25 Les phases apolaires sont alors réunies et évaporées sous vide. L'extrait ainsi obtenu peut être stocké au froid, en particulier congelé.
- Il ressort clairement de ce procédé qu'il s'agit d'un extrait bactérien et non d'un
- 30 surnageant de culture.
- Selon un premier mode de réalisation, l'extrait selon l'invention est utilisé sous forme sèche, en tant que poudre. Alternativement, le culot peut être repris dans toute phase lipophile adaptée. Dans le cadre de l'application cosmétique selon l'invention, l'extrait
- 35 est avantageusement repris dans une huile, du propanediol ou une micro-émulsion.

La concentration en caroténoïdes de la composition reconstituée à partir de l'extrait séché peut être aisément mesurée, par exemple par mesure de l'absorbance à 512 nm dans le DMSO ou à 502 nm dans le propanediol.

- 5 A noter que les différentes étapes d'extraction et de purification sont avantageusement réalisées à l'abri de la lumière, dans l'obscurité ou dans la pénombre, afin d'éviter l'éventuelle dégradation de l'extrait.

- 10 En raison des propriétés remarquables mises en évidence dans le cadre de la présente demande et exposées ci-dessous, un tel extrait peut notamment être utilisé dans une composition cosmétique, une composition pharmaceutique ou un complément alimentaire.

- 15 Selon un premier aspect, la présente invention concerne donc une composition cosmétique comprenant un extrait de la bactérie *Arthrobacter agilis*. Selon un mode de réalisation privilégié, la composition cosmétique comprend un extrait riche en caroténoïdes de la bactérie *Arthrobacter agilis*.

- 20 La composition cosmétique selon l'invention est avantageusement topique, destinée à être appliquée sur la peau et éventuellement sur les cheveux. Elle peut contenir tout ingrédient ou excipient couramment utilisé en cosmétique. En d'autres termes, elle comprend au moins un excipient cosmétiquement acceptable, tous les excipients utilisés dans une telle composition devant être cosmétiquement acceptables.

- 25 A noter que le méthanol notamment n'est pas considéré comme un excipient cosmétiquement acceptable. Selon un mode de réalisation particulier, la composition cosmétique selon l'invention ne contient donc pas de méthanol.

- 30 Elle peut aussi bien se présenter sous forme de lotion, de crème, de gel, de spray, ...

Selon un mode de réalisation particulier, elle présente une couleur rosée.

- 35 Selon un autre aspect, la présente invention concerne donc une composition pharmaceutique comprenant un extrait de la bactérie *Arthrobacter agilis*. Selon un mode de réalisation privilégié, la composition pharmaceutique comprend un extrait riche en caroténoïdes de la bactérie *Arthrobacter agilis*.

La composition pharmaceutique selon l'invention peut être notamment destinée à une administration topique ou orale. Elle peut contenir tout ingrédient ou excipient couramment utilisé en pharmacie. En d'autres termes, elle comprend au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable, tous les excipients utilisés dans une telle composition devant être pharmaceutiquement acceptables.

A noter que le méthanol notamment n'est pas considéré comme un excipient pharmaceutiquement acceptable. Selon un mode de réalisation particulier, la composition pharmaceutique selon l'invention ne contient donc pas de méthanol.

Elle peut aussi bien se présenter sous forme de lotion, de crème, de gel, de spray, de solutions par exemple sous forme de gouttes, de gélules, de comprimés, ...

Une telle composition pharmaceutique peut par exemple être utilisée dans le domaine ophtalmique, notamment pour traiter certaines rétinopathies (DMLA, ...), dans le traitement des maladies chroniques du foie ou de l'hyperoxie qui suit l'ischémie-reperfusion. De manière plus générale sont visées les pathologies dans lesquelles un stress oxydant peut endommager irréversiblement les protéines.

Dans le même contexte, une composition selon l'invention peut être un complément alimentaire.

Des compositions selon l'invention peuvent en outre contenir d'autres actifs, en plus de l'extrait objet de la présente invention.

Il peut en particulier s'agir d'autres agents antioxydants, regroupant différentes classes de molécules, en particulier des caroténoïdes, des thiols ou des phénols.

Une liste non exhaustive de tels agents antioxydants, pour lesquels un effet de synergie avec l'extrait selon l'invention a été mis en évidence, est la suivante :

- Vitamine E ou ses dérivés, tels que le Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylic acid) ;
- N-Acétyl-Cystéine (NAC) ;
- Butyl-Hydroxy-Anisole (BHA) ;
- Vitamine C ;
- Glutathion ;
- Acide caféique ou acide (E) 3-(3,4-dihydroxyphényl)prop-2-énoïque ;
- Curcumin ou diféruloylméthane ;

- Quercétine ou quercétol ;
- Lycopène ;
- Coenzyme Q10 (Q10) ;
- Acide urique.

5

Des extraits végétaux, tels qu'un extrait de thé vert, un extrait de sarment de vigne, un extrait des feuilles d'arganier, un extrait de pamplemousse, un extrait de feuilles de murier et/ou un extrait de pomme, peuvent également être associés à un extrait selon l'invention.

10

Les concentrations en extrait et en actif, respectivement, sont déterminées au cas par cas par l'homme de métier, de manière à ce que la synergie entre les deux s'exprime pleinement. Ainsi et de manière adaptée, les concentrations de l'extrait et de l'actif supplémentaire doivent être optimisées pour l'effet anti-oxydant recherché.

15

De manière avantageuse, l'extrait sec représente de 0,00001 (10^{-5}) à 0,1 (10^{-1}) %, avantageusement de 0,0001 (10^{-4}) à 0,01 (10^{-2}) % en poids de la composition selon l'invention.

20

En raison des propriétés remarquables mises en évidence dans le cadre de la présente demande, une telle composition peut en particulier être utilisée contre le vieillissement (effet anti-âge) ou pour la protection solaire (effet anti-UV).

25

Selon un autre aspect, la présente invention vise un procédé de traitement cosmétique, avantageusement pour lutter contre le stress oxydant, notamment le vieillissement cellulaire de la peau, consistant à appliquer sur la peau la composition cosmétique selon l'invention. Un stress oxydant peut également être causé par une exposition aux rayonnements (UV et/ou visible), contre lesquels la composition selon l'invention se montre particulièrement efficace.

30

Une première utilisation possible de l'extrait selon l'invention est celui d'un agent anti-radicalaire, notamment vis-à-vis des radicaux libres suivants : le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$; le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ; l'ion hypochlorite ClO^- ; le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$; les radicaux peroxyde ($ROO^{\cdot}$) ou alkoxyle ($RO^{\cdot}$) où R est une chaîne carbonée ; les radicaux dérivés d'acides gras insaturés ; le peroxynitrite $ONOO^{\cdot}$; le monoxyde d'azote $NO^{\cdot}$; le dioxygène singulet 1O_2 .

35

Un extrait selon l'invention peut également être utilisé comme agent anti-UV, aussi bien contre les UV-A (400-315nm), les UV-B (315-280nm) et/ou les UV-C (280-153nm), notamment contre les UV-C. De manière remarquable, il a été montré qu'un extrait selon

5 l'invention exerçait un effet anti-UV via plusieurs mécanismes d'action :

- un effet de neutralisation des singulets de l'oxygène ($^1\text{O}_2$) générés par les UV ;
- un effet « écran », « filtre » ou « bouclier », par absorption directe des UV ;
- un effet antioxydant plus classique, à savoir la neutralisation des radicaux libres générés par les singulets de l'oxygène ($^1\text{O}_2$).

10

Comme déjà dit, un extrait selon l'invention présente également un intérêt dans la protection contre la lumière visible, en particulier vis-à-vis de la lumière bleu-violet (longueur d'onde typiquement comprise entre 400 et 500 nm).

15 Par ailleurs, un extrait selon l'invention exerce un effet protecteur sur les protéines. Ainsi, un tel extrait est susceptible de stabiliser et de protéger des protéines.

Comme démontré dans la présente demande, cette protection du protéome s'exerce notamment vis-à-vis de la carbonylation. De manière plus générale, la présente demande
20 démontre le potentiel protecteur d'un extrait riche en caroténoïdes sur le protéome.

Ainsi et selon un autre aspect, la présente invention vise l'utilisation des caroténoïdes pour la protection du protéome.

25 Comme mentionné ci-dessus et au vu des synergies mises en évidence, l'extrait selon l'invention peut être utilisé, pour ces différentes applications, en combinaison avec d'autres actifs, en particulier des agents antioxydants, avantageusement sélectionnés dans la liste suivante :

- Vitamine E ou ses dérivés, tels que le Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylic acid) ;
- 30 - N-Acétyl-Cystéine (NAC) ;
- Butyl-Hydroxy-Anisole (BHA) ;
- Vitamine C ;
- Glutathion ;
- 35 - Acide caféique ou acide (E) 3-(3,4-dihydroxyphényl)prop-2-énoïque ;
- Curcumin ou diféruloylméthane ;
- Quercétine ou quercétol ;
- Lycopène ;

- Coenzyme Q10 (Q10) ;
- Acide urique.

Exemples de réalisation

5

La manière dont l'invention peut être réalisée et les avantages qui en découlent, ressortiront mieux des exemples de réalisation qui suivent, donnés à titre indicatif et non limitatif, à l'appui des figures annexées.

10 La figure 1 correspond à une image en microscopie inverse (grossissement x100) de la souche SB5.

La figure 2 représente le spectre HPLC de l'extrait SBE selon l'invention, ainsi que le spectre d'absorbance pour chacun des 6 pics principaux (notés 1 à 6).

15 La figure 3 représente le pouvoir antioxydant mesuré à l'aide du test ABTS de l'extrait selon l'invention (SBE) par rapport à d'autres agents antioxydants connus, exprimé en équivalent Trolox.

20 La figure 4 représente le pouvoir protecteur des protéines, vis-à-vis des radicaux libres, de l'extrait selon l'invention (SBE) par rapport à d'autres agents antioxydants, exprimé en équivalent Trolox (A), et compare ce pouvoir protecteur à celui des fractions correspondant aux 6 pics observés en HPLC (B).

La figure 5 représente le pouvoir protecteur des protéines, vis-à-vis des UV, de l'extrait selon l'invention (SBE) par rapport à d'autres agents antioxydants, exprimé en équivalent Trolox.

25 La figure 6 représente le suivi de l'activité de la phosphatase alcaline (AP), en fonction de la concentration de l'extrait selon l'invention (SBE).

La figure 7 représente le pouvoir protecteur des protéines, vis-à-vis des radicaux libres, de l'extrait selon l'invention (SBE) mélangé à d'autres agents antioxydants, exprimé en équivalent Trolox (B).

30 La figure 8 représente le pouvoir protecteur des cellules humaines (kératinocytes) et de leur ADN, vis-à-vis des radicaux libres et des UV, de l'extrait selon l'invention (SBE) par rapport à l'acétate de tocophérol via le test des comètes.

35 La figure 9 représente la mesure de la carbonylation des protéines évaluant le pouvoir protecteur des cellules humaines (kératinocytes) et de leurs protéines, vis-à-vis d'une irradiation UV/visible, de l'extrait selon l'invention (SBE) par rapport à l'acétate de tocophérol.

1/ Isolation et caractérisation de la souche SB5 :

Une bactérie (SB5) a été isolée dans la neige tombante et sélectionnée pour sa résistance
5 aux UVC et sa capacité à croître rapidement. Elle a été caractérisée comme appartenant
aux *Arthrobacters*, bactéries gramin positives dont beaucoup d'espèces sont extrémophiles
ou extrémotolérantes.

Plus précisément, la bactérie isolée est une souche d'*Arthrobacter agilis*. *A. agilis* est une
10 bactérie coccoïde gram positive, non-sporulante et non pathogène, de 0,8 à 1,2 µm de
diamètre et pouvant posséder de 0 à 3 flagelles (Koch *et al.* (1995) *Int J Syst Bacteriol.*
45(4):837-9), isolée pour la première fois en 1889 (Ali-Cohen (1889) *Zentralbl.*
Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. 6:33-36).

15 La figure 1 montre une image en microscopie inverse de la souche isolée, conforme à la
description de la bactérie *Arthrobacter agilis*.

Par ailleurs, l'appartenance de la souche SB5 à l'espèce *Arthrobacter agilis* a été
confirmée par séquençage partiel de son ARN 16S. La séquence correspondante (SEQ ID
20 NO : 2) est comme suit, la base N indiquant qu'il n'a pas pu être déterminé si le
nucléotide correspondait à A, C, G ou T :

```
ACATGCAAGT CGAACGATGA ACCTCACTTG TGGGGGGATT AGTGGCGAAC GGGTGAGTAA
CACGTGAGTA ACCTGCCCTT GACTCTGGGA TAAGCCTGGG AAACCGGGTC TAATACTGGA
TACGACCTTC TGGCGCATGC CATGTTGGTG GAAAGCTTTT GTGGTTTTGG ATGGACTCGC
25 GGCCTATCAG CTTGTTGGTG GGGTAATGGC CTACCAAGGC GACGACGGGT AGCCGGCCTG
AGAGGGTGAC CGGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG
TGGGGAATAT TGCACAATGG GCGCAAGCCT GATGCAGCGA CGCCGCGTGA GGGATGAAGG
CCTTCGGGTT GTAAACCTCT TTCAGTAGGG AAGAAGCCGG CCTTTTGGGT TGGTGACGGT
ACCTGCAGAA GAAGCGCCGG CTAACCTACGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GTAGGGCGCA
30 AGCGTTATCC GGAATTATTG GGCCTAAAGA GCTCGTAGGC GGTGTGTCGC GTCTGCCGTG
AAAGTCCGGG GCTTAACTCC GGATCTGCGG NGGGTACGGG CAGACTAGAG TGCACTAGGG
GAGACTGGAA TTCCTGGTGT AGCGGTGAAA TGCGCAGATA TCAGGAGGAA CACCGATGGC
GAAGGCAGGT NTCTGGGCTG TAACTGACGC TGAGGAGCGA AAGCATGGGG AGCGAACAGG
ATTAGATACC CTGGTAGTCC ATGCCGTAAC CGTTGGGCAC TAGGTGTGGG GGACATTCCA
35 CGTTTTCCGC GCCGTAGCTA ACGCATTAAAG TGCCCCGCCT GGGGAGTACG GCCGCAAGGC
TAAACTCAA AGGAATTGAC GGGGGCCCCG ACAAGCGGCG GAGCATGCGG ATTAATTGCA
TGCAACGCGA AGAACCTTAC CAAGGCTTGA CATGAACCGG AATGATGCAG AGATGTGTCA
GCCACTTGTG GCCGGTTTAC AGGTGGTGCA TGGTTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT
```

TGGGTAAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT CGTTCCATGT TGCCAGCGGG TTATGCCGGG
GACTCATGGG AGACTGCCGG GGTCAACTCG GAGGAAGGTG GGGACGACGT CAAATCATCA
TGCCCCCTTAT GTCTTGGGCT TCACGCATGC TACAATGGCC GGTACAAAGG GTTGCGATAC
TGTGAGGTGG AGCTAATCCC AAAAAGCCGG TCTCAGTTCG GATTGAGGTC TGCAACTCGA
5 CCTCATGAAG TTGGAGTCGC TAGTAATCGC AGATCAGCAA CGCTGCGGTG AATACGTTCC
CGGGCCTTGT ACACACCGCC CGTCAAGTCA CGAAAGTNGT AACACCCGAA GCCGGNGCCT
AACCCCTTGN GGAGGGAGCC

Cette séquence présente effectivement plus de 99,2% d'identité avec la séquence de
10 référence SEQ ID NO : 1, confirmant l'appartenance de cette souche à l'espèce
Arthrobacter agilis.

2/ Préparation de l'extrait SBE :

2-1. Culture de la souche SB5 :

La souche est cultivée dans du milieu LB sans sel à une température de 25°C, en aérobie
et sous forte agitation, jusqu'à ce que la phase stationnaire soit atteinte, soit environ après
3 jours.

20

Les cellules sont alors collectées par centrifugation, typiquement à une vitesse de 5000
rpm pendant environ 15 minutes. Le culot est ensuite séché par stockage à l'obscurité à
4°C.

2-2. Isolation de l'extrait SBE :

25

Le culot est repris dans 6 ml d'acétone par gramme de culot, éventuellement en présence
de méthanol, par exemple dans un mélange méthanol/acétone (5/1). Cette étape
d'extraction a lieu pendant plusieurs heures, typiquement 18 heures, à 4°C et à
30 l'obscurité.

30

La suspension dans l'acétone, ou dans le mélange acétone/méthanol, est complétée par
ajout d'hexane, avantageusement à la moitié du volume d'acétone. Une solution saturée
en NaCl (chlorure de sodium) est alors ajoutée jusqu'à séparation du mélange biphasique,
35 avec une phase aqueuse d'un côté et une phase apolaire de l'autre. De manière
avantageuse, la phase aqueuse est à nouveau extraite à l'aide d'hexane et les phases
hexaniques sont réunies.

La phase apolaire ou hexanique est évaporée, avantageusement sous vide et à 25°C.

L'extrait SBE peut être conservé en l'état à -20°C ou peut être repris en solution, par exemple dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) ou du THF (tétrahydrofurane) ou du propanediol pour être testé sur cellules vivantes, et est très soluble dans le dichlorométhane et l'acétone.

La concentration en caroténoïdes est déterminée par mesure de l'absorbance à 512 nm dans le DMSO ou à 502 nm dans le propanediol.

Le spectre HPLC de l'extrait, ainsi que le spectre d'absorbance pour chacun des 6 pics principaux, sont représentés à la Figure 2. La comparaison de ces spectres avec les données de la littérature (Fong *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2001) 56 : 750-756) montre que l'extrait est constitué très majoritairement de caroténoïdes, avec un spectre caractéristique d'absorption à 3 « doigts » vers 490 nm. Comme indiqué dans Fong *et al.*, (*Appl Microbiol Biotechnol* (2001) 56 : 750-756), le spectre d'absorption révèle également la présence de formes glycosylées et de différents isomères de ces caroténoïdes.

3/ Activités de l'extrait SBE :

3-1. Test ABTS :

Comme mentionné ci-dessus, ce test classiquement utilisé dans l'industrie cosmétique et agro-alimentaire permet d'établir, de façon purement chimique, le « pouvoir antioxydant total » d'un extrait. Bien que ce test soit incomplet car il ne mesure en fait l'activité antioxydante de l'extrait que face à un type particulier de radical, il présente l'avantage, par sa normalisation avec le Trolox, de donner des résultats qui sont comparables avec des milliers d'autres molécules testées de cette manière.

Ce test a été mis en œuvre comme décrit dans Re *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.* (1999) 26(9-10) : 1231-7.

La figure 3 révèle que l'extrait selon l'invention (SBE) montre un pouvoir antioxydant plus de 4 fois supérieur à celui de l'antioxydant de référence, le Trolox.

Dans le cadre de l'invention, un équivalent Trolox correspondant au nombre de moles du produit testé permettant d'obtenir un effet équivalent à celui d'1 mole de Trolox. L'extrait selon l'invention a été quantifié grâce à l'utilisation des caroténoïdes comme marqueur de l'extrait. Ainsi, 1 mole de l'extrait SBE correspond à 1 mole de caroténoïdes, tel que mesuré par absorbance à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption et déduit du coefficient d'extinction molaire des caroténoïdes.

3-2. Protection des protéines contre les radicaux libres :

Ce test consiste à mesurer à 405 nm l'activité de la phosphatase alcaline (AP) en présence de radicaux libres, notamment hydroxyles ($\text{OH}^\cdot$), et d'un composé ou extrait d'intérêt, afin d'évaluer le pouvoir protecteur vis-à-vis des protéines dudit composé ou extrait.

Matériel et méthodes :

Réactifs :

Tampon : poudre de « Tris Buffered Saline » (Sigma ; Référence produit : T6664-10PAK) ;

Enzyme : Phosphatase alcaline 10KU à 125U/ μL dans une solution de glycérol tamponnée (Sigma ; Référence produit : P0114) ;

Agent oxydant :

1/ Peroxyde d'hydrogène à 30% ou 9M (Sigma ; Référence produit : H1009-5ML) : solution B1 ;

2/ Sulfate de fer II heptahydrate ($\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) 0,1M (Fluka ; Référence produit : 44970) : solution B2 ;

Substrat : solution de 4-nitrophényl phosphate (« Alkaline Phosphatase yellow substrate » ; Sigma ; Référence produit : P7998-100ML).

Kit :

- Plaque 96 puits ;
- Tampon : 20 ml d'une solution TBS 0,05M à pH 8 ;
- Solution A (enzyme) : 10 μL de la solution mère diluée au 1/1000 (1,25U soit 0,125U/ μL) dans du tampon ;
- 100 μL de solution B1 et 100 μL de solution B2 ou solution B correspondant au mélange des solutions B1 et B2 à une dilution adaptée dans du tampon (par exemple 3 ml de solution B à 90 mM, obtenue à partir de 30 μL de solution B1 + 30 μL de solution B2 soit une dilution au 1/100) ;
- Solution C (substrat) : 5 ml de la solution commerciale.

Protocole :

- Diluer la solution A dans du tampon à une dilution adaptée ;
- Déposer, dans chaque puits, 10 µl de la solution A diluée de sorte à avoir une
5 quantité d'enzyme comprise entre 0,005 et 0,05 U ;
- Ajouter 10 µl du produit ou de l'extrait à tester, éventuellement dilué dans du
tampon, dans chaque puits. Les différents puits peuvent servir à tester une gamme
de dilution ;
- Ajouter 30 µl de la solution B dans chaque puits. La concentration de la solution
10 B est ajustée pour obtenir une inactivation de 90% de la quantité d'enzyme en
présence. La concentration finale de l'agent oxydant correspondant à 30% de la
concentration de la solution B ;
- Incuber 15 minutes à 37°C sans agitation ;
- Ajouter 50 µl de la solution C. Le volume réactionnel est donc égal à 100 µl ;
- 15 - Placer la plaque à 37°C sous agitation ;
- Lire l'absorbance à 405 nm pendant 20 minutes (cinétique) ou après 5 minutes de
réaction (ponctuelle).

Résultats :

20

La figure 4A révèle que l'extrait selon l'invention (SBE) présente un pouvoir protecteur
des protéines, face aux radicaux libres, environ 100 fois plus élevé que celui du Trolox, et
plus de 6 fois supérieur à tous les antioxydants testés. La différence entre ce résultat et le
potentiel antioxydant mesuré par ABTS démontre que la protection des protéines n'est
25 pas uniquement liée au potentiel antioxydant de SBE.

Par ailleurs, cette même technique a été utilisée pour comparer l'effet des 6 fractions
(notées SB1 à SB6) correspondant aux 6 pics principaux repérés par l'analyse HPLC à
celui de l'extrait SBE total.

30

Il ressort de la figure 4B que l'extrait SBE a un pouvoir protecteur des protéines face aux
radicaux libres de 2 à 4 fois plus élevé que celui de chacun des pics qui le compose et
démontre un effet de synergie entre les différentes fractions de l'extrait.

35

3-3. Protection des protéines contre les UV :

Ce test est similaire à celui décrit dans la section précédente. Il consiste à mesurer à 405 nm l'activité de la phosphatase alcaline (AP), irradiée à l'aide d'UV-C (254 nm), en présence d'un composé ou extrait d'intérêt, afin d'évaluer le pouvoir protecteur vis-à-vis des protéines dudit composé ou extrait.

Matériel et méthodes :

La phosphatase alcaline a été soumise à une irradiation UV à 254 nm correspondant aux UV-C. Sous agitation constante, des doses d'UV permettant une inactivation de 90% de l'enzyme ont été appliquées sur un milieu réactionnel et dans des conditions similaires à ceux mentionnés ci-dessus. A noter que le volume occupé par l'agent oxydant est ici remplacé par du tampon. En pratique, il été utilisé une lampe d'une puissance égale à 0,0365J/cm²/min, avec un temps d'exposition de 1 ou 2 heures.

Résultats :

La figure 5 révèle que l'extrait selon l'invention (SBE) présente un pouvoir protecteur des protéines, vis-à-vis des UV, plus de 300 fois plus élevé que celui du Trolox et près de 40 fois supérieur à tous les antioxydants testés.

Ce très fort effet protecteur de l'extrait selon l'invention pourrait s'expliquer par plusieurs effets conjugués de l'extrait en présence :

- un effet de neutralisation des singulets de l'oxygène (¹O₂) générés par les UV ;
- un effet « écran », « filtre » ou « bouclier », par absorption directe des UV ;
- un effet antioxydant plus classique, à savoir la neutralisation des radicaux libres générés par les singulets de l'oxygène (¹O₂).

3-4. Protection des protéines :

L'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée en l'absence de tout stress oxydant mais en présence de concentrations croissantes de l'extrait selon l'invention (SBE).

La figure 6 révèle que l'activité de l'AP est augmentée en présence de l'extrait selon l'invention (SBE) à très faibles doses. Cette augmentation pourrait être due à la protection de l'enzyme pendant les étapes d'incubation et d'agitation. Il est également

envisageable que certaines oxydations subies par l'enzyme stockée à -20°C soient réduites par l'extrait SBE, ce qui pourrait augmenter son activité par « rajeunissement ».

5 Sur la base de la figure 6, une concentration adaptée en extrait selon l'invention (SBE) se situe entre 0,001 et 100 µM, avantageusement entre 0,1 et 1 µM. Il s'agit toutefois de concentrations à atteindre dans les cellules cibles de la peau. Ainsi, la concentration dans les compositions cosmétiques doit être bien supérieure pour prendre en compte les pertes liées à la pénétration cutanée.

10 Une interaction entre l'enzyme et l'extrait pourrait être à l'origine de cette action « boostante ». Par extension, l'extrait selon l'invention est susceptible de protéger les protéines présentes dans l'organisme, notamment celles impliquées directement dans la protection de l'organisme contre le stress oxydatif ou dans la réparation des dommages oxydatifs.

15

3-5. Synergie avec d'autres antioxydants :

Afin d'identifier des antioxydants susceptibles d'augmenter l'efficacité de la protection des protéines par l'extrait selon l'invention (SBE), le test décrit à la section 3-2 a été mis en œuvre en mélangeant l'extrait selon l'invention (SBE) et une dizaine d'antioxydants connus, pris individuellement. L'intérêt est d'identifier des molécules avec lesquelles l'extrait selon l'invention (SBE) cumule les effets antioxydants, voire de mettre en évidence des synergies allant au-delà des effets additifs. Un autre intérêt de tels mélanges est la possible stabilisation de l'extrait selon l'invention (SBE).

25

La figure 7 montre qu'en présence de l'ensemble des antioxydants testés, et particulièrement en présence de Trolox, l'extrait selon l'invention (SBE) présente une forte synergie, qui augmente significativement (d'un facteur supérieur à 5 avec le Trolox) son pouvoir protecteur des protéines vis-à-vis des radicaux libres.

30

3-6. Protection des cellules Humaines :

A/ Test des comètes :

35 Afin de confirmer la protection par l'extrait selon l'invention (SBE) exercée sur les cellules humaines, des mesures de la protection de cultures primaires de kératinocytes et de leur ADN face à un stress oxydant induit par la lumière UV/visible a été mis en œuvre grâce au test dit des comètes, tel que décrit par Ostling, O., and K. J. Johanson.

(*Biochemical and biophysical research communications* 123.1 (1984): 291-298) et Singh, Narendra P., *et al.* (*Experimental cell research* 175.1 (1988): 184-191). L'intérêt est de montrer l'activité de protection de l'extrait selon l'invention (SBE) dans un modèle cellulaire et de le comparer à un antioxydant de référence, l'acétate de tocophérol.

5

Matériel et méthodes :

Les propriétés antioxydantes du SBE et de l'acétate de tocophérol (Ac-Toc) contre des rayonnements UVB/UVA/VISIBLE (Irradié : 290 nm – 800 nm) ont été évaluées par le test des comètes (version alcaline) sur des primo-cultures de kératinocytes humains normaux.

L'évaluation des propriétés antioxydantes a été effectuée aux concentrations de 500 nM pour SBE et 50 μ M pour Ac-Toc. Les deux produits ont été mis en solution dans du tétrahydrofurane à une concentration finale de 1%. Les propriétés antioxydantes ont été définies comme la capacité à diminuer le nombre de cassures simple brin de l'ADN des cellules qui est produit après une irradiation UVB/UVA/Visible (290-800 nm) et ces propriétés ont été mesurées après un contact avec les produits de 120 min à 37°C. L'irradiation a été délivrée par un simulateur solaire Suntest CPS+ (Atlas Material Testing Technology BV, Moussy le Boeuf, France). La dose totale d'irradiation était de 12.0 J/cm² pour une période de 2.7 min (puissance nominale de la lampe 750 W/m²). Les contrôles négatifs comprenaient des kératinocytes traités par THF (1%) et non irradiés, par Ac-Toc (50 μ M) et SBE (500 nM) dans THF 1% et non irradiés.

Résultats :

La figure 8 montre que l'extrait selon l'invention (SBE) présente un fort potentiel protecteur des cellules face à un stress oxydant et qu'il permet de protéger l'ADN des cellules mieux que l'acétate de Tocophérol, tout en étant 100 fois moins concentré. Son pouvoir protecteur in vitro est donc plus de 100 fois plus important que celui de l'acétate de tocophérol.

B/ Test de carbonylation :

En suivant le même protocole d'irradiation UV/visible que celui utilisé ci-dessus pour le test des comètes, le taux de carbonylation des kératinocytes en présence de SBE et acétate de tocophérol a été mesuré.

Matériel et méthodes :***1- Culture des kératinocytes et irradiation***

- Kératinocytes humains normaux (KHN) (T6)- 10^6 cellules/condition
- 5 - Conditions :
 - Témoin solvant THF 1%
 - SBE 200 nM
 - Acétate de tocophérol 20 μ M
- Chaque condition est réalisée en triplicat.
- 10 - Mise en contact des KHN dans les différentes conditions expérimentales pendant 2h.
- Irradiation UVB UVA Visible à 120kJ/m^2 des cellules placées dans PBS par un simulateur solaire Suntest CPS+ (Atlas Material testing technology) à 4°C. Les contrôles négatifs sont maintenus à 4°C pendant la même durée que l'irradiation.
- Trypsination des cellules post irradiation. Rinçage du PBS glacé. Elimination du PBS et
- 15 congélation immédiate des culots cellulaires à -80°C.

2- Mesure de la carbonylation

- Les protéines sont extraites après lyse des cellules et leur concentration est mesurée par test de Bradford.
- 20 - Les protéines sont dérivées par 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) qui se fixe aux groupements carbonyle.
- Le taux de carbonylation est ensuite mesuré sur plaques ELISA (OxyELISA™ Oxidized Protein Quantitation Kit, Millipore) à 450 nm.

Résultats :

- La figure 9 montre que le taux de carbonylation des protéines des kératinocytes augmente significativement après irradiation UV/visible. Cette augmentation est significativement diminuée (P-value < 0,01) par l'ajout de l'extrait SBE ou d'acétate de tocophérol qui
- 30 protège les protéines contre l'oxydation. Cette protection est similaire (P-value > 0,01) pour SBE et acétate de tocophérol bien que l'extrait SBE soit 100 fois moins concentré.

- Bien que légèrement moins fort, le potentiel de protection du protéome par le SBE est du même ordre que celui observé via le test des comètes et de l'ordre de 100 fois celui de
- 35 l'acétate de tocophérol, ce qui correspond aux résultats obtenus ci-dessus basés sur la mesure de l'activité de la phosphatase alcaline (PA).

La protection des cellules observée via le test des comètes semble donc principalement portée par la capacité de SBE à protéger le protéome.

4/ Composition cosmétique contenant l'extrait SBE

5

Les compositions cosmétiques comprennent typiquement de 0,0001 à 0,01 % en poids de l'extrait (sec) selon l'invention.

10 Une crème peut présenter la composition suivante (en % massique), l'actif constitué par l'extrait selon l'invention étant avantageusement intégré dans l'isononyl isononanoate.

Nom INCI	% pondéral
Aqua	78,290000
Xanthan Gum	0,100000
Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer & Aqua	0,800000
Glycerin	5,000000
Butylene Glycol	2,000000
Phenoxyethanol	0,350000
Disodium EDTA	0,200000
Chlorphenesin	0,260000
Steareth-21	1,160000
Steareth-2	1,840000
Dimethicone	2,000000
Glyceryl Dibehenate & Tribehenin & Glyceryl Behenate	0,500000
Isononyl Isononanoate	5,000000
Acacia Decurrens/Jojoba/Sunflower Seed Wax/Polyglyceryl-3 Esters	1,000000
Cetyl Alcohol	1,500000

De manière caractéristique, ces compositions peuvent présenter une couleur allant du rosé clair au rouge, en raison de la couleur de l'extrait selon l'invention.

15

Ces exemples de réalisation démontrent que le choix particulier de la bactérie *Arthrobacter agilis* comme source de caroténoïdes (présentes dans de nombreuses espèces, notamment plantes algues, cyanobactéries, champignons, ...) présente des avantages inattendus dans le cadre des applications visées :

20

- Culture de la bactérie et préparation de l'extrait relativement aisés (contrairement à beaucoup d'organismes extrémophiles, notamment halobacter);
- Synergie entre les différentes fractions de l'extrait ;
- Contribution des différentes isoformes à l'activité globale de l'extrait
5 (contrairement par exemple à la seule déinoxanthine de *Deinococcus radiodurans*) ;
- Très forte activité anti-radicalaire et anti-UV par rapport aux antioxydants connus ;
- Synergie avec les antioxydants connus ;
- 10 - Effet protecteur encore jamais révélé vis-à-vis du protéome, qui va au-delà du potentiel antioxydant : Le potentiel antioxydant de l'extrait SBE est 4 fois supérieur à celui du Trolox, alors que sa capacité à protéger les protéines est 100 fois plus forte que celle du Trolox, et ce aussi bien dans le cadre de tests biochimiques que sur cultures cellulaires.

15

REVENDICATIONS

1/ Composition cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire comprenant un extrait riche en caroténoïdes de la bactérie *Arthrobacter agilis*.

5

2/ Composition selon la revendication 1, **caractérisée** en ce que l'extrait est obtenu par culture de la bactérie dans un milieu constitué de 1% en poids de tryptone et 0,5% en poids d'extrait de levure.

10

3/ Composition selon la revendication 1 ou 2, **caractérisée** en ce que l'extrait est obtenu à partir de cellules en phase stationnaire.

4/ Composition selon l'une des revendications 1 à 3, **caractérisée** en ce que l'extrait correspond à la phase apolaire obtenue à partir du culot bactérien.

15

5/ Composition selon la revendication 4, **caractérisée** en ce que le culot bactérien est extrait, avantageusement par de l'acétone et/ou du méthanol, et que la phase apolaire est obtenue par ajout d'un solvant apolaire, avantageusement de l'hexane, et d'une solution saturée en sels, avantageusement une solution de NaCl.

20

6/ Composition selon l'une des revendications précédentes, **caractérisée** en ce qu'elle comprend en outre un agent antioxydant, avantageusement choisi dans le groupe suivant :

- Vitamine E ou l'un de ses dérivés, tels que le Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylic acid) ;
- N-Acétyl-Cystéine (NAC) ;
- Butyl-Hydroxy-Anisole (BHA) ;
- Vitamine C ;
- Glutathion ;
- Acide caféique ou acide (E) 3-(3,4-dihydroxyphényl)prop-2-énoïque ;
- Curcumine ou diféruloylméthane ;
- Quercétine ou quercétol ;
- Lycopène ;
- Coenzyme Q10 (Q10) ;
- Acide urique.

35

7/ Composition selon l'une des revendications précédentes, **caractérisée** en ce que l'extrait représente de 0,0001 à 0,01% en poids sec de la composition.

8/ Composition selon l'une des revendications précédentes, *caractérisée* en ce qu'elle se présente sous forme de lotion, de crème, de gel, de spray, de solutions, de gélules ou de comprimés.

5 9/ Procédé de traitement cosmétique, avantageusement pour lutter contre le stress oxydant, et notamment le vieillissement cellulaire de la peau, consistant à appliquer sur la peau la composition selon l'une des revendications 1 à 8.

10 10/ Extrait tel que défini à l'une des revendications 1 à 5 pour son utilisation comme agent anti-UV.

11/ Utilisation d'un extrait tel que défini à l'une des revendications 1 à 5 comme agent de protection contre la lumière visible, en particulier dans le domaine du bleu-violet..

15 12/ Utilisation d'un extrait tel que défini à l'une des revendications 1 à 5 comme agent anti-radicalaire ou antioxydant.

13/ Utilisation d'un extrait tel que défini à l'une des revendications 1 à 5 comme agent protecteur des protéines.

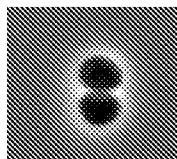
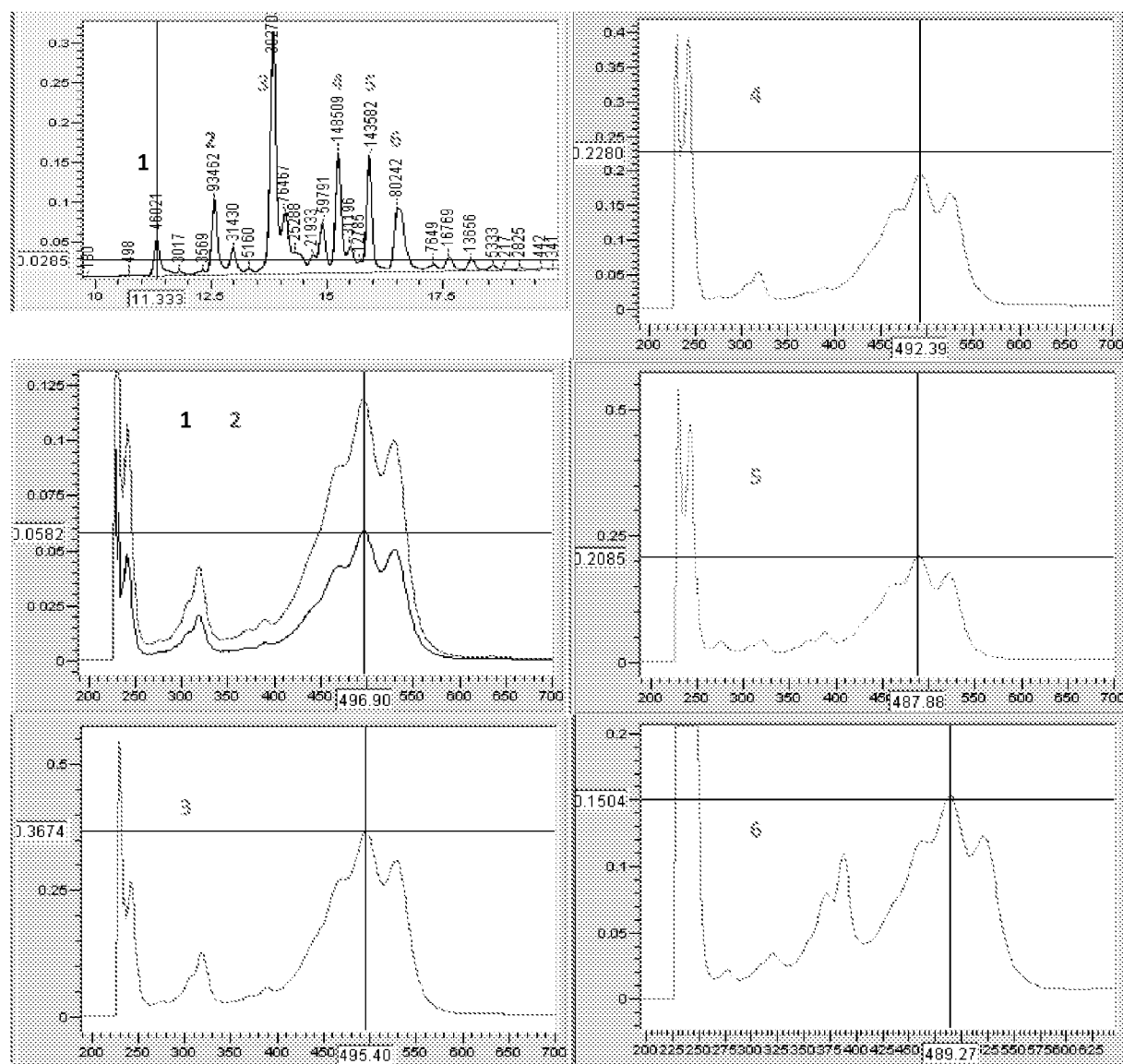
20

14/ Extrait pour son utilisation selon la revendication 10 ou utilisation selon les revendications 11 à 13 *caractérisé* en ce que l'extrait est associé à un autre agent antioxydant, avantageusement choisi dans la liste suivante :

- 25 - Vitamine E ou l'un de ses dérivés tels que le Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylic acid) ;
- N-Acétyl-Cystéine (NAC) ;
- Butyl-Hydroxy-Anisole (BHA) ;
- Vitamine C ;
- Glutathion ;
- 30 - Acide caféique ou acide (E) 3-(3,4-dihydroxyphényl)prop-2-énoïque ;
- Curcumine ou diféruloylméthane ;
- Quercétine ou quercétol ;
- Lycopène ;
- Coenzyme Q10 (Q10) ;
- 35 - Acide urique.

15/ Utilisation des caroténoïdes, avantageusement issues de la bactérie *Arthrobacter agilis*, pour la protection du protéome.

1 / 5

**Figure 1****Figure 2**

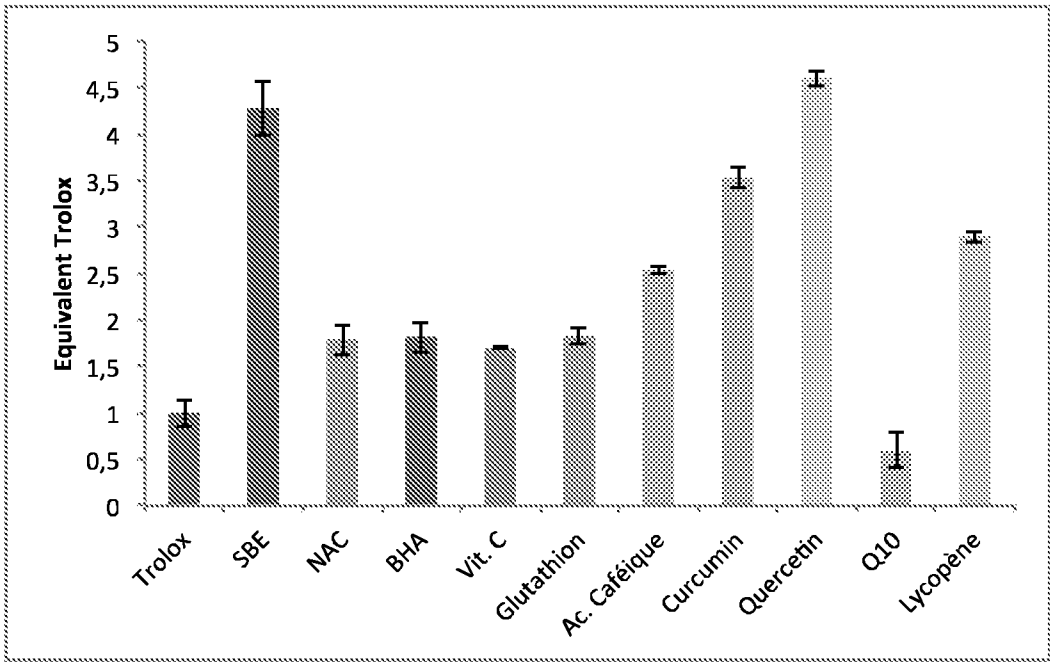


Figure 3

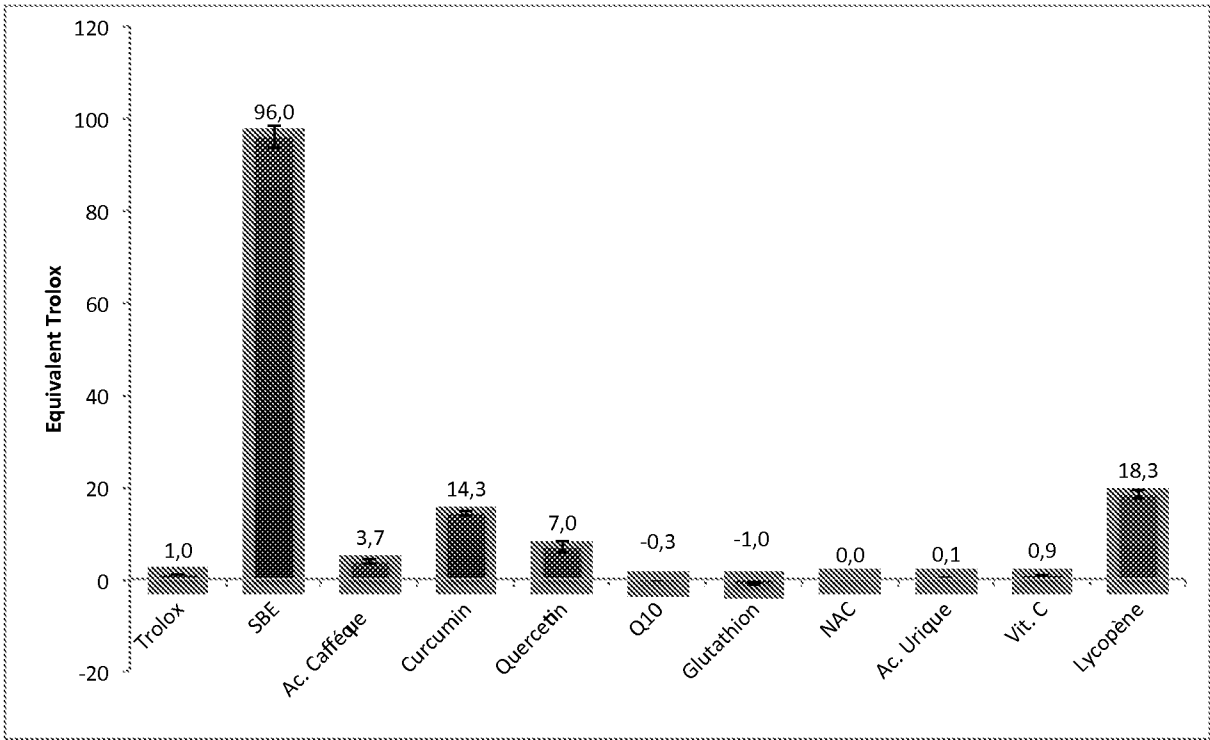


Figure 4A

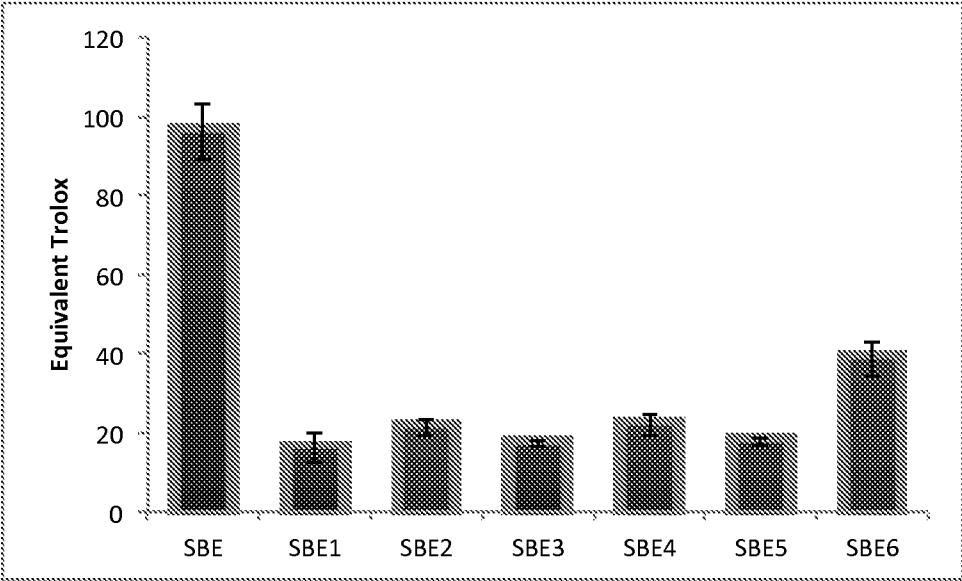


Figure 4B

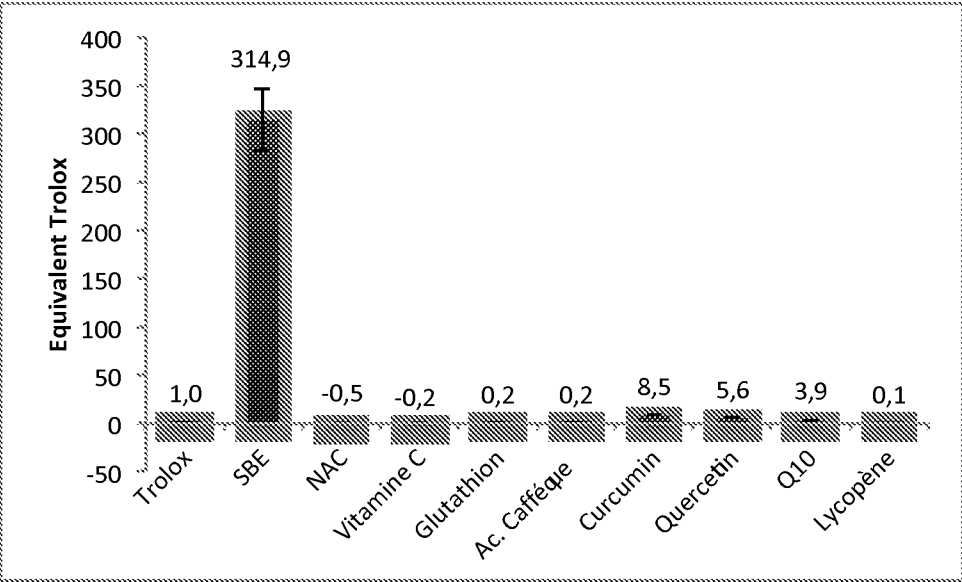


Figure 5

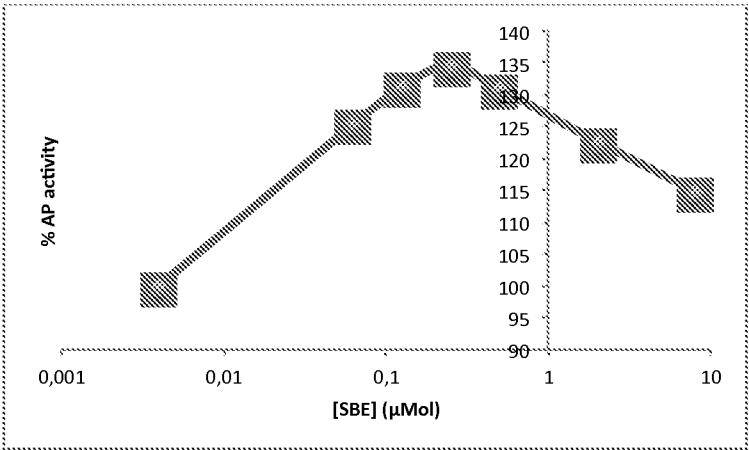


Figure 6

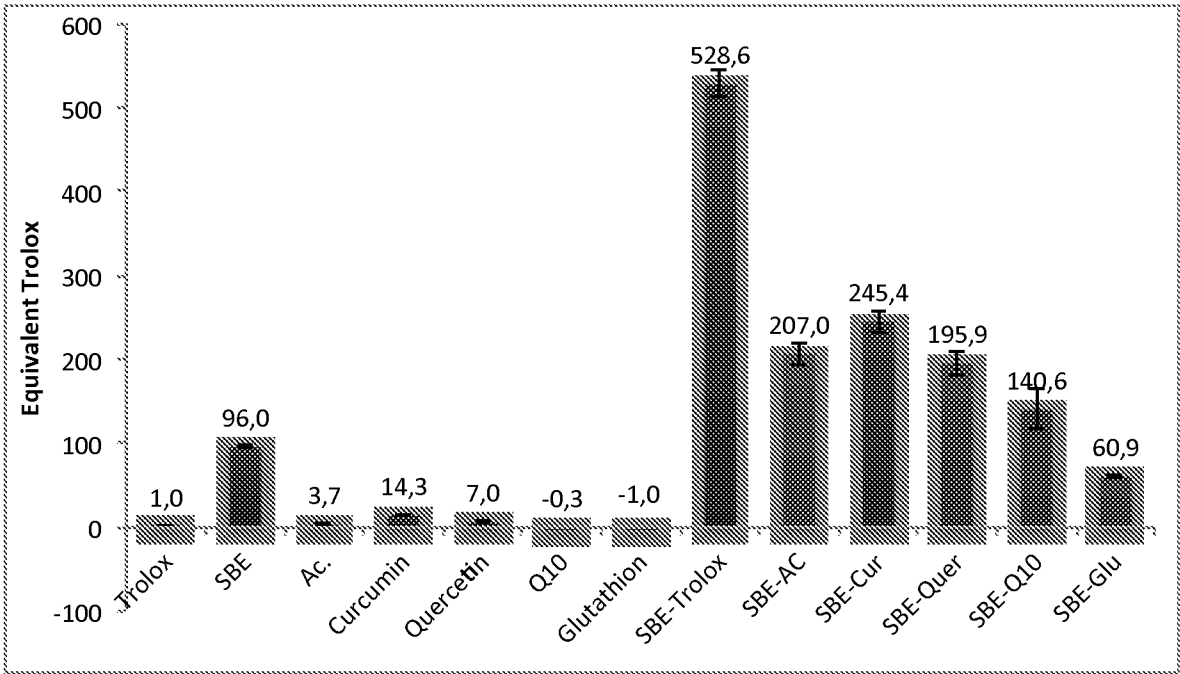


Figure 7

5 / 5

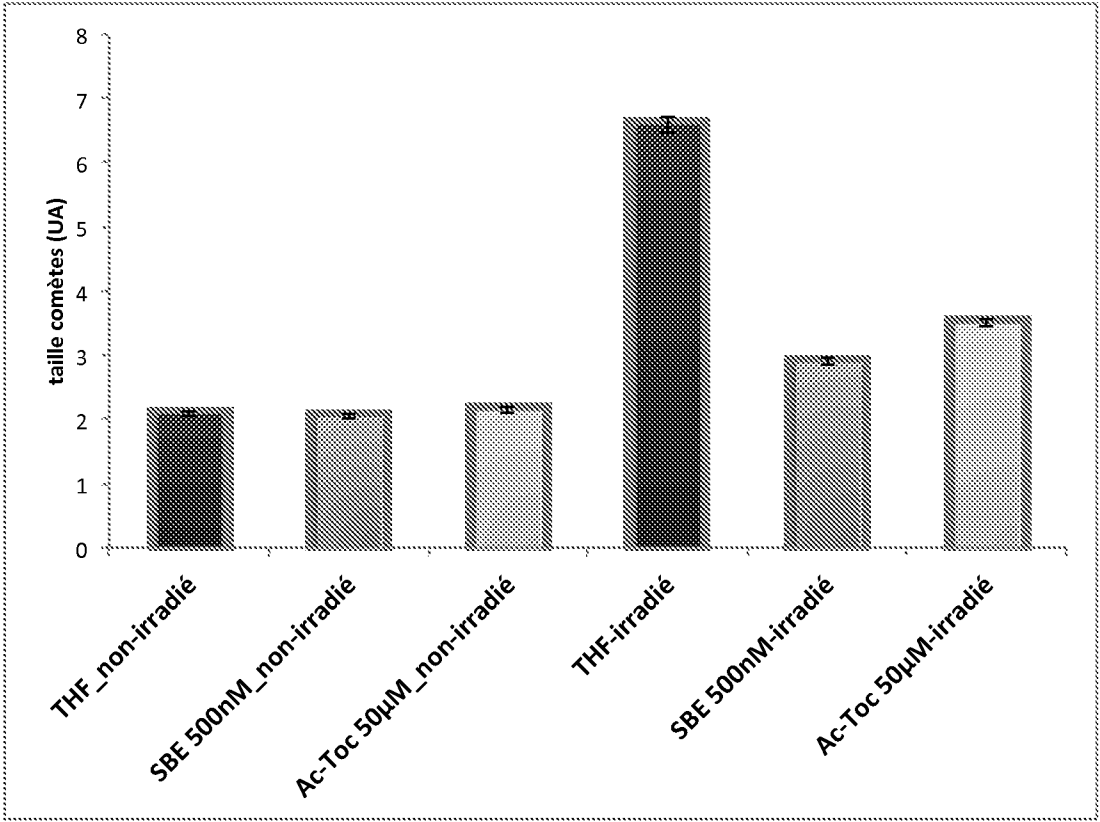


Figure 8

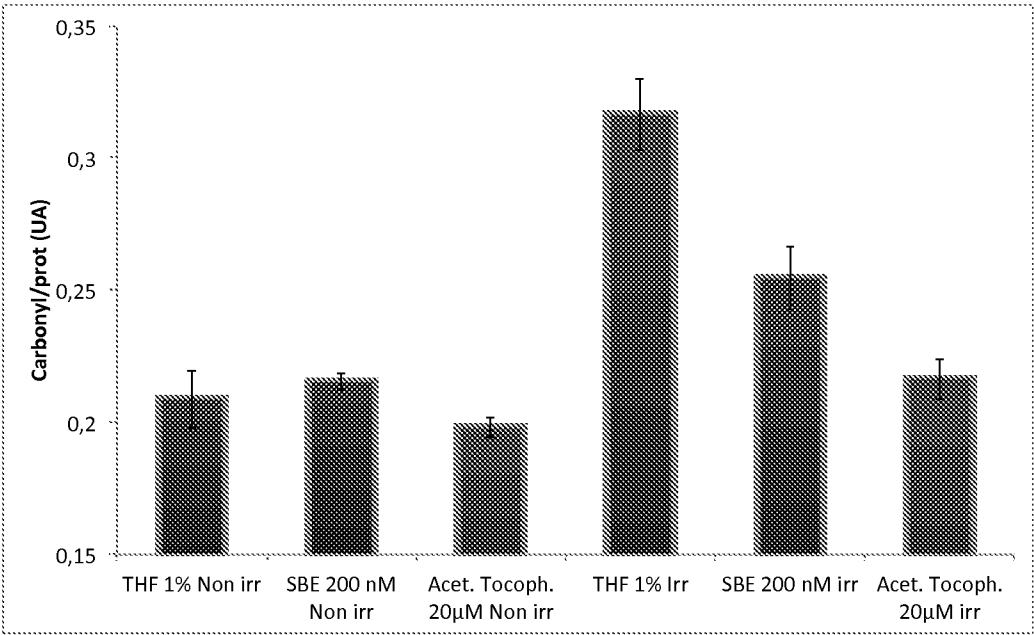


Figure 9