

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 986 155**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **12 50912**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 8/97 (2013.01), A 61 Q 17/04**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 31.01.12.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 02.08.13 Bulletin 13/31.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : LABORATOIRES BLC THALGO COS-
METIC Société anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : SIROP JEAN-CLAUDE et PRADINES
ROBERT DOMINIQUE.

⑦3 Titulaire(s) : LABORATOIRES BLC THALGO COS-
METIC Société anonyme.

⑦4 Mandataire(s) : CABINET WEINSTEIN Société civile.

⑤4 COMPOSITION COSMETIQUE PHOTOPROTECTRICE COMPRENANT DEUX EXTRAITS ALGAUX,
UTILISATION D'EXTRAITS ALGAUX POUR LA FABRICATION D'UNE TELLE COMPOSITION.

⑤7 L'invention concerne une composition cosmétique
photoprotectrice, comprenant un agent absorbant des ra-
diations ultra-violettes et un agent antiradicalaire, les deux
agents étant des extraits d'algues marines.

L'invention concerne également l'utilisation d'extraits al-
gaux pour la fabrication d'une composition cosmétique pho-
toprotectrice.

L'invention trouve application dans le domaine cosmé-
tique.

FR 2 986 155 - A1



La présente invention concerne une composition cosmétique photoprotectrice.

La protection de la peau vis-à-vis du soleil est rendue nécessaire du fait des radiations relativement nocives qu'il génère.

Le soleil émet des radiations électromagnétiques qui vont des rayons cosmiques aux ondes radio et seule une partie de ce spectre (lumière visible, rayonnements UV et infra-rouge) pénètre dans l'atmosphère terrestre.

Toutefois, les rayonnements UV représentent 10% des radiations arrivant à la surface de la peau et ce sont les plus énergétiques et donc les plus biologiquement actifs. Ces rayonnements sont divisés en trois zones : les UVA (400-320 nm), les UVB (320-280 nm) et les UVC (280-200 nm). La couche d'ozone arrête les UVC et les UVB les plus courts.

Les rayonnements qui atteignent notre épiderme sont donc les rayons UVA et les UVB les plus longs.

Les UVB sont majoritairement arrêtés par la couche cornée et seulement 10% atteignent le derme.

Par contre, la majorité des UVA traverse la couche cornée et 20 à 30% atteignent le derme papillaire et réticulaire.

Les rayons UVA sont responsables de l'apparition de radicaux libres qui attaquent eux mêmes l'ADN cellulaire.

Les rayonnements UVB sont responsables de l'apparition de l'érythème solaire, effet le plus visible, mais ils provoquent aussi une immunodépression et sont impliqués dans l'apparition de cancers cutanés par leur action au niveau de l'ADN. Cette action néfaste est en outre potentialisée par les UVA.

Les radiations UVA et UVB créent un excès de radicaux libres notamment oxygénés (ROS) qui ont des effets nocifs sur tous les composants cellulaires,

notamment l'ADN telles que des lésions directes de l'ADN correspondant à des modifications de la double hélice.

La cellule met en place des mécanismes de réparation mais si les dommages sont trop importants, elle entre en apoptose, c'est à dire en suicide cellulaire pour éviter la multiplication de cellules anormales et potentiellement cancéreuses.

Ainsi, une composition cosmétique protectrice capable de protéger la peau des radiations ultra violettes doit lutter contre ces divers phénomènes.

Différents agents photoprotecteurs ont été développés pour protéger la peau mais ceux-ci, issus de synthèses chimiques sont de moins en moins attractifs pour les consommateurs notamment pour ceux souffrant d'allergies ou craignant des effets secondaires néfastes.

En outre, ces filtres solaires chimiques présentent une photostabilité insatisfaisante après avoir été exposés au soleil, obligeant les utilisatrices à racheter une nouvelle crème solaire à chaque séjour au soleil.

Et d'autres, d'origine naturelle, ne sont pas particulièrement efficaces.

L'invention vise à pallier ces inconvénients.

A cet effet, l'invention a pour objet une composition cosmétique photoprotectrice, comprenant un agent absorbant des radiations ultra-violettes et un agent antiradicallaire, les deux agents étant des extraits d'algues marines.

L'invention peut également présenter l'une ou l'autre des caractéristiques suivantes :

- l'agent absorbant des radiations ultra-violettes est un extrait d'une algue marine comprenant des acides aminés de type mycosporines (MAAs).

5 - les acides aminés de type mycosporines (MAAs) de l'algue marine comprennent la mycosporine-aurine, la mycosporine-glycine, la palythine, la parphyra-334, la shinorine et/ou la palythène,

10 - l'agent absorbant des radiations ultra-violettes comprend un extrait de l'algue *Polysiphonia lanosa*,

15 - l'extrait de l'algue *Polysiphonia lanosa* présente un pic d'absorption maximale situé entre 290 et 360 nm,

20 - l'extrait de l'algue *Polysiphonia lanosa* présente un pic d'absorption maximale situé entre 320 et 360 nm,

25 - l'extrait de l'algue *Polysiphonia lanosa* est aqueux ou hydrosoluble,

30 - l'agent antiradicallaire est un extrait d'une algue marine comprenant de l'astaxanthine,

35 - l'agent antiradicallaire est un extrait de la forme rouge non mobile de l'algue *Haematococcus pluvialis*,

40 - l'extrait de la forme rouge de l'algue *Haematococcus pluvialis* est lipidique ou liposoluble,

45 - la composition peut comprendre :
entre 1 à 10% en poids, de préférence 3 à 8% en poids d'un extrait de *Polysiphonia lanosa* comme agent absorbant des radiations ultra-violettes,

entre 0,01 à 5% en poids, de préférence 0,01 à 3% en poids d'un extrait d'*Haematococcus pluvialis*.

5 - comprendre en outre un ou plusieurs agents de formulation ou additifs tels que des filtres UV, des tensioactifs, des agents épaississants, des huiles, des conservateurs, des parfums, des actifs comme des vitamines.

10 - elle peut se présenter sous la forme d'une émulsion, d'une huile, d'un gel, d'une lotion, d'un spray, d'un aérosol.

15 L'invention concerne également l'utilisation de deux extraits d'algues ayant respectivement une action antiradicallaire et une action d'absorption des rayonnements UV, pour la fabrication d'une composition cosmétique photoprotectrice.

20 L'invention concerne également l'utilisation d'un extrait de l'algue *Haematococcus pluvialis* et d'un extrait de l'algue *Polysiphonia lanosa* pour la fabrication d'une composition cosmétique photoprotectrice.

25

L'invention sera maintenant décrite en référence à la description suivante et aux figures annexées, parmi lesquelles :

30 - la figure 1 représente un graphique illustrant le spectre d'absorption ultraviolet de l'extrait de *Polysiphonia lanosa* de la composition selon l'invention, en conditions normales (figure 1a), après irradiation solaire (figure1b) et après autoclavage (figure 1c),

- la figure 2 représente une photographie des noyaux cellulaires contrôles non irradiés (figure 2a) et irradiés à 9 J/ cm² pendant 2 minutes (figure 2b),

5 - la figure 3 représente une photographie des noyaux cellulaires non irradiés (figure 3a) et irradiés en présence de l'extrait de *Polysiphonia lanosa* à 5% (figure 3b),

- La figure 4 représente l'effet anti-radicalaire de l'extrait d'*Haematococcus pluvialis* dans le test au DPPH, par des histogrammes obtenus pour un mélange d'astaxanthine d'origine algale, d'huile et de tocopherol qui est un antioxydant de type connu (histogramme vierge), l'huile seule (histogramme hachuré), et le tocopherol seul (histogramme pointillé).

15

La composition cosmétique photoprotectrice selon l'invention contient à la fois un agent absorbant des radiations ultra-violettes et un agent antiradicalaire qui sont tous deux issus d'algues marines et plus particulièrement d'extraits d'algues marines.

20

La combinaison d'un agent absorbant les radiations ultra-violettes avec un agent antiradicalaire permet d'obtenir une protection contre les UV eux-mêmes et les espèces radicalaires qu'ils génèrent, et l'origine algale de ces agents leur confère un faible risque de causer des allergies puisque d'une part d'origine naturelle et n'ayant d'autre part aucun besoin d'être utilisé dans des concentrations excessive du fait de leur efficacité à l'état brut. En outre, les minéraux naturellement contenus dans les algues participent au soin et à la régénération de la peau soumise à une exposition solaire.

Le choix des algues dont sont issus ces agents absorbant des radiations ultra-violettes et antiradicalaire, s'effectue en fonction de leur

35

aptitude à produire des extraits algaux riches en acides aminés de type mycosporines (MAAs) et/ou en astaxanthine.

Les travaux de la demanderesse ont effectivement permis de mettre en évidence que ces deux agents font partie des plus efficaces dans leurs domaines respectifs, et qu'ils peuvent être présents au sein d'extraits de différentes algues marines.

En outre, ils agissent en synergie lorsqu'utilisés ensemble puisque les MAAs du premier extrait algal absorbent une majeure partie voire la totalité des rayons UV et l'infime partie des rayons UV restant et qui n'aurait pas été absorbée par les MAAs voit ses effets néfastes sur la peau amoindris grâce à l'astaxanthine du deuxième extrait algal puisque celle-ci piège l'oxygène singulet et/ou d'autres radicaux libres.

L'astaxanthine agit en outre comme un inhibiteur d'Arnox, enzyme reconnue comme intervenant dans le vieillissement biologique et confère ainsi à la composition selon l'invention un effet de ralentissement du vieillissement des cellules de la peau.

Ces deux espèces ont une action coordonnée sur la peau et la composition cosmétique selon l'invention qui les contient, permet ainsi d'obtenir une protection efficace contre les effets néfastes du soleil.

Et parmi les extraits d'algues marines contenant des MAAs et/ou de l'astaxanthine, la demanderesse a identifié ceux de l'algue *Polysiphonia lanosa* et de l'algue *Haematococcus pluvialis* respectivement comme les plus aptes à former lorsque associés l'un l'autre, une protection de la peau des effets néfastes du soleil.

L'invention concerne donc, plus particulièrement, une composition contenant un extrait de *Polysiphonia lanosa* et un extrait d'*Haematococcus pluvialis*.

La composition selon l'invention contient préférentiellement:

- de l'ordre de 1 à 10% en poids, de préférence 3 à 8% en poids, et tout préférentiellement de 4 % à 5% en poids d'extrait de *Polysiphonia lanosa*,

- de l'ordre de 0,01 à 5% en poids, de préférence 0,01 à 3% en poids, et tout préférentiellement de 0,01% à 0,5% en poids d'extrait d'*Haematococcus pluvialis*.

10

Elle est obtenue par les étapes suivantes :

- préparation d'une émulsion d'huile dans eau ou eau dans huile à 70°C,

- incorporation dans l'émulsion des extraits des algues ci-dessus dans les proportions précitées, à une température inférieure à 40°C, afin de ne pas les dénaturer

15

L'espèce *Polysiphonia lanosa* est une algue rouge qui appartient à la classe des Floridophyceae et à l'ordre des Ceramiales.

20

Cette espèce algale se développe sur des thalles de Fucacées, principalement *Ascophyllum nodosum* et *Fucus serratus*, dans des zones fortement à modérément exposées aux vagues.

25

Elle subit sans dommage le stress de la dessiccation lors des marées. Vivant sous une gamme d'irradiations très large, elle tolère des intensités de plein soleil montrant par là une acclimatation étonnante aux fortes irradiations, ce qui implique une résistance remarquable à la photo inhibition (protection des composants des photosystèmes) et une forte capacité photosynthétique.

30

L'extrait de *Polysiphonia lanosa* utilisé selon l'invention est un extrait hydrosoluble obtenu par

35

macération des thalles préalablement séchés et broyés par des techniques classiques pour l'homme du métier, dans un solvant ou un mélange aqueux ou un mélange de solvants organiques par exemple des alcools tels que le propylène glycol, suivi d'une filtration ou d'une centrifugation pour éliminer les particules.

L'extrait de *Polysiphonia lanosa* utilisé selon l'invention est caractérisé par son spectre d'absorption ultraviolet avec un maximum d'absorption correspondant à une bande d'absorption localisée dans la région des UVA et des UVB entre 300 et 360 nm.

Cet extrait est caractérisé par son contenu en acides aminés mycosporine-like (MAAs) présentant une absorption ultra-violette maximale entre 320 et 360 nm.

Le nom générique mycosporine est donné à une molécule extraite de champignons, soluble dans l'eau et absorbant au niveau des radiations ultra-violettes à 310 nm. Du point de vue structural, une mycosporine est constituée d'un chromophore cyclohexénique conjugué au substituant de l'atome d'azote d'un acide aminé ou d'un alcool aminé. Les MAAs présents dans les organismes marins sont des dérivés imino-carbonyle du chromophore cyclohexénique de mycosporine. Plus d'une vingtaine de MAAs a été identifiée à ce jour. Ils absorbent chacun à une longueur d'onde spécifique située en majorité dans la région des UVB mais aussi dans une partie des UVA : Mycosporine- taurine (longueur d'onde d'absorption maximale : 296 nm), Mycosporine-2 glycine (longueur d'onde d'absorption maximale : 303 nm), Mycosporine-glycine (longueur d'onde d'absorption maximale : 310 nm), Palythine (longueur d'onde d'absorption maximale : 320 nm), Porphyra -334 (longueur d'onde d'absorption maximale : 334 nm), Shinorine (longueur d'onde

d'absorption maximale : 334 nm), Palythène (longueur d'onde d'absorption maximale : 360 nm).

L'extrait de *Polysiphonia lanosa* selon l'invention contient l'ensemble de ces MAAs. Et leur concentration
5 reste constante depuis la fabrication de ces extraits.

D'autres algues marines permettent également la fabrication d'extraits contenant des MAAs qui peuvent l'un et/ou l'autre être utilisés comme agent d'absorption des rayons UV d'origine algale au sein de
10 la composition selon l'invention. Parmi celles-ci, on trouve :

- des algues vertes : *Codium adherens*, *Codium fragile*, *Chaetomorpha area*,
- des algues rouges : Helionori® (*Porphyra umbilicalis*), Orosea® (extrait aqueux de *Risoella verruculosa*), *Asparagopsis armata*, *Palmaria palmata*, *Gelidium sesquipedale*, *Porphyra purpurca-violacea* (1,4 mg de MAAs par gramme d'extrait sec de cette algue), *Gymnogongrus griffithsiae* (7,8 mg de MAAs par gramme
15 d'extrait de cette algue,
- et des algues brunes : *Stypocaulon scoparium*, *Padina gymnospora*).

La microalgue *Haematococcus pluvialis* appartient à
25 la classe des Chlorophyceae et à l'ordre des Volvocales. C'est une algue cosmopolite que l'on trouve sur tous les continents sauf l'Antarctique. L'espèce *pluvialis* est trouvée dans l'eau douce claire. C'est une algue unicellulaire ovoïde ou ellipsoïdale portant deux fouets
30 égaux et entourée d'une membrane très ample.

Quand les conditions environnementales se dégradent (dessèchement lent, conditions extrêmes de pH, raréfaction des nutriments et forte illumination), les algues perdent leurs deux flagelles, présentent de
35 nombreuses vacuoles et se transforment en des formes

rouges. Ces formes ont une paroi cellulaire épaisse et produisent de grandes quantités d'astaxanthine quand elles sont fortement éclairées par le soleil.

L'extrait d'*Haematococcus pluvialis* utilisé selon
5 l'invention provient de la forme rouge non mobile de l'algue. Il est obtenu par macération des cellules broyées par les techniques classiquement utilisées par l'homme du métier dans de l'huile de tournesol ou de
10 toute autre huile végétale suivie d'une étape de centrifugation puis de filtration pour éliminer les particules. On obtient alors un liquide rouge limpide de densité égale à 0,91 à 0,92.

Le spectre d'absorption ultraviolet de l'extrait d'*Haematococcus pluvialis* utilisé selon l'invention est
15 similaire à celui d'une solution d'Astaxanthine ($1,5 \cdot 10^{-5}$ M), ce dont on peut déduire que la concentration de l'extrait en astaxanthine est également de $1,5 \cdot 10^{-5}$ M.

D'autres algues marines permettent également la fabrication d'extraits contenant de l'astaxanthine qui
20 peuvent l'un et/ou l'autre être utilisés comme agent antiradicalaire d'origine algale au sein de la composition selon l'invention, telles que la *Dinophyceae*, l'*Eustigmatophyceae* et la *Chlorophyceae*.

25 Les compositions selon l'invention peuvent comprendre un ou plusieurs agents de formulation ou d'additifs d'usage connu et conventionnel dans les compositions cosmétiques tels que, à titre d'exemple et de façon non exhaustive, des filtres UV supplémentaires,
30 des tensioactifs, des agents épaississants, des huiles, des conservateurs, des parfums, des actifs comme des vitamines.

Les compositions selon l'invention peuvent se
35 présenter sous toutes les formes galéniques connues de

l'homme du métier dans le domaine de la cosmétologie. De manière optimale, les compositions selon l'invention se présentent sous la forme d'une émulsion, d'une huile, d'un gel, d'une lotion, d'un spray, ou d'un aérosol.

5

Elles sont utilisées comme formule protectrice des effets nocifs de radiations UV.

Et pour lutter contre les effets nocifs des radiations UV, elles sont appliquées et étalée sur les parties de peau exposées au soleil, en une couche fine sur la peau. Cette couche de composition selon l'invention est capable de réduire ou d'arrêter les effets nocifs précédemment décrits des radiations UV sur la peau.

10
15

Cet effet protecteur de la peau peut être mis en évidence grâce aux méthodes utilisées dans les exemples suivants.

20

Ils mettent en avant la capacité d'absorption des radiations UV et l'évaluation de l'effet protecteur de l'ADN par l'extrait de *Polysiphonia lanosa* ainsi que l'effet antiradicalaire de l'extrait d'*Haematococcus pluvialis*.

25

I. EVALUATION DE LA CAPACITE D'ABSORPTION DES RADIATIONS ULTRA-VIOLETTES PAR L'EXTRAIT DE POLYSIPHONIA LANOSA

Il s'agit d'évaluer la capacité de l'extrait de *Polysiphonia lanosa* à absorber les radiations UV.

30

Pour cela, il a été réalisé le spectre d'absorption ultra-violet de l'extrait de *Polysiphonia lanosa* .

35

1. Méthode

L'extrait de *Polysiphonia lanosa* a été dilué à 2,5% et à 5% dans l'eau avec une densité optique DO maximale comprise entre 3,6 et 4,2.

2. Résultats

Comme visible sur la figure 1a, la zone d'absorption de l'extrait de *Polysiphonia lanosa* dilué à 2,5% dans l'eau se situe entre 275 et 364 nm. Cette zone couvre donc une partie des zones UVB et UVA.

Les solutions contenant les extraits de *Polysiphonia lanosa* à 5% ont été exposées pendant 2 heures aux radiations solaires (voir figure 1b) et pendant 20 minutes à 120°C en autoclave (figure 1c) sans que cela n'entraîne une diminution de l'efficacité d'absorption puisque le pic d'absorption maximal est toujours situé autour de 334 nm et présente la même amplitude.

De plus, des résultats expérimentaux ont permis de mettre en évidence qu'après un stockage prolongé (3 mois et plus) il n'y a pas de baisse de la capacité d'absorption à la température ambiante.

II. EVALUATION DE L'EFFET PROTECTEUR DE L'ADN NUCLEAIRE PAR L'EXTRAIT DE POLYSIPHONIA LANOSA VIS A VIS DES RADIATIONS ULTRA-VIOLETES PAR LE TEST DES COMETES.

Il s'agit d'évaluer l'effet de l'extrait de *Polysiphonia lanosa* sur la protection de l'ADN nucléaire vis à vis des radiations UV.

La protection de l'ADN est évaluée par le test des comètes sur des primo-cultures de mélanocytes humains normaux. Son but est de mesurer les cassures directement

induites par les rayonnements UVB/UVA/VISIBLE (290-800 nm). C'est un test d'électrophorèse en gel d'agarose de cellules isolées. Après électrophorèse, les noyaux dont l'ADN a subi les cassures prennent une forme de comète et les noyaux dont l'ADN n'est pas endommagé restent ronds.

1. Matériel et méthode

1.1 Matériel

Les cultures de mélanocytes humains normaux (MHN) sont réalisées à partir de prépuces d'enfants et de nouveau-nés ayant un phimosis. Les mélanocytes obtenus à partir de fragments de peau sont placés dans le milieu MCDB 153 (Sigma St Louis, MO, USA) supplémenté avec 30 µg/ml d'extrait pituitaire bovin (BPE) (Life Technologies, Paisley, Angleterre), 2% de sérum de veau fœtal (SVF) (Dominique Dutscher, Brumath, France), 16 nM de phorbol-12-myristate-13-acétate (Sigma), 5 µg/ml d'insuline et 1 µg/ml d'hydrocortisone (Sigma). Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C et sous atmosphère contenant 5% de CO₂. Des cultures pures de mélanocytes sont obtenues au bout de 2 à 3 semaines.

Les milieux utilisés sont les suivants :

- Milieu MCDB 153 supplémenté non irradié
- Milieu MCDB 153 supplémenté irradié
- Milieu MCDB 153 supplémenté non irradié + extrait de *Polysiphonia lanosa* à 5%
- Milieu MCDB 153 supplémenté irradié + extrait de *Polysiphonia lanosa* à 5%

L'extrait de *Polysiphonia lanosa* est ajouté 120 minutes avant l'irradiation.

Les irradiations UVA, UVB et visible sont générées par un simulateur solaire Suntest CPS+ (Atlas Material testing Technology BV, Moussy le Neuf, France). Cet appareil est équipé d'une lampe au Xénon d'une
5 puissance modulable entre 265 W/m² et 765 W/m² et d'un filtre de quartz à revêtement infra-rouge. Pour l'irradiation UVB/UVA/Visible (290-800 nm), l'appareil est muni d'un filtre supplémentaire (réf. : 56052371X). La dose totale d'irradiation est de 9,0 J/cm² pour une
10 période de 2 minutes soit une dose de 0,06 J/cm² (UVB), 0,96 J/cm² (UVA) et 8,04 J/cm² (visible). Les irradiations sont effectuées sur une plaque thermostatée à 4°C par un bain circulant de 10% de polypropylène glycol.

15

1.2 Méthode

Après un traitement avec un mélange Trypsine/EDTA (0,05%/0,02%) pendant 2 à 3 minutes, les cellules sont
20 récupérées par centrifugation et placées dans un tampon PBS sans Ca⁺⁺ et sans Mg⁺⁺ (Sigma). Après une deuxième centrifugation, les cellules (4,5-5,0 X 10⁴ cellules) sont placées en suspension dans 0,5% d'agarose Low Melting Point, LMP ((Sigma).

25 Le mélange est directement déposé sur des lames de microscope recouvertes d'une pré-couche d'agarose (1,6%) séchée pendant une nuit à température ambiante et fraîchement précoatée avec une seconde couche d'agarose (0,8%). Une quatrième couche d'agaroseLMP est enfin
30 déposée pour emprisonner les mélanocytes.

Le protocole du test des comètes est celui de De Meo et coll. (De Meo M, Laget M, Castegnaro M, Duménil G. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. Mutation Res. 1991 ; 260 ; 295-306) en
35 incorporant la technique des « lames sèches » (Klaud M,

Ericksson S, Nygren J, Annstrong G. The comet assay : mechanism and technical consideration. Mutation Res. 1996 ; 363 ; 89-96).

Les lames sont placées après les irradiations
5 dans un bain de lyse (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 10, 1% de sodium sarcosinate, 1% de Triton X-100 et 10% de DMSO). La lyse cellulaire s'effectue à 4°C pendant 60 minutes suivie par la dénaturation de l'ADN à température ambiante pendant 20 minutes dans une
10 solution fortement alcaline (1 mM Na₂EDTA et 300 mM NaOH, pH>13,0).

Après une électrophorèse (25V, 300mA) pendant 20 minutes, les lames sont neutralisées par le tampon Tris-HCl (0,4M ; pH 7,4) et déshydratées dans de l'éthanol ou
15 du méthanol absolu.

Les lames sont colorées par une solution de bromure d'éthidium (75 µl de 2 µl/ml) et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence BH2-RFL (Olympus, Japon) équipé d'un filtre dichroïque 20BG-W
20 (excitation : 515-560 nm ; émission : 590 nm) et d'un objectif Apo D-Plan 20x. L'analyse d'image s'effectue avec une caméra CCD monochrome haute sensibilité (Cohu 4912-5000) couplée à une carte d'acquisition Matrox IP-8. L'ensemble est piloté par le logiciel Fenestra Komet
25 (Kinetic Imaging, Liverpool, RU, version 3.1)

3. Résultats

Un total de 100 cellules par échantillon (50
30 cellules /lame) est analysé. Le paramètre utilisé est « Olive Tail Moment » (OTM) qui est défini comme le produit du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète par la distance entre les barycentres de la tête et de la queue (µm).

Pour chaque série d'expériences, un contrôle négatif (cellules non irradiées) et un contrôle positif (cellules irradiées sans écran) sont inclus.

5 Comme visible par comparaison des figure 2a et 2b, l'ADN extrait des cellules non irradiées intact, non fragmenté (figure 2a) subit une dégradation nette visible suite à son exposition à une irradiation, puisque le noyau cellulaire est alors accompagné d'une « queue de comète ».

10 Par contre, lorsque les cellules ont été traitées par l'extrait de *Polysiphonia lanosa* à 5%, tel que le met en évidence une comparaison des figures 3a et 3b, même si une légère dégradation de l'ADN se devine, elle n'a rien de comparable à la dégradation nette obtenue
15 suite à une irradiation sans écran de la figure 2b.

Cet extrait protège donc efficacement l'ADN des radiations ultra-violettes.

20 4. Conclusion

Dans les conditions expérimentales exposées, l'extrait de *Polysiphonia lanosa* protège les cellules cutanées contre les méfaits des radiations UV sur l'ADN.
25 Cette protection permet d'éviter des dommages à la peau conduisant à la cancérogénèse et au photovieillissement prématuré.

III. EVALUATION DE L'EFFET ANTIOXYDANT DE L'EXTRAIT D'HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS

1. Matériel et méthode

5

1.1 Matériel

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) permet d'étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. « Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity ». *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 1995, 28, 25-30). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le radical provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH• avec l'antioxydant en question, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

15

20

1.2 Méthode

25

La solution de DPPH• à 63.4 μ M (25 mg dans 100 ml de méthanol 90%) est préparée à l'avance (au moins 1-2 heures) car la solubilisation est difficile, et elle ne se conserve pas plus de 4-5 jours à -5°C et à l'obscurité.

30

Un standard est réalisé à l'aide d'une solution 1mM de Tocophérol (Sigma).

35

L'extrait d'*Haematococcus pluvialis* est dissous dans une solution de 70% éthanol-30% eau distillée aux concentrations de 0,1%, 0,5%, 1%, 2% et 3% (ces

solutions étant nommées par la suite solutions à tester).

Des solutions d'huile de Tournesol à 1 et à 2% sont dissoutes dans une solution de 70% éthanol-30% eau distillée.

Des volumes de 0.1 ml des solutions à tester ont été mélangés avec la solution du DPPH• (3.9 ml; absorbance de 0.68 ± 0.03 à 515 nm). Le mélange réactionnel est agité vigoureusement pendant 10 secondes. Le contenu est ensuite transféré dans un micro-tube de 4 ml, puis incubé dans la cavité du spectrophotomètre pendant le temps nécessaire pour atteindre le plateau avec ce type d'échantillon. A des intervalles de temps réguliers, les absorbances à 515 nm ont été enregistrées (contre le méthanol) sur un spectrophotomètre UV-VIS.

Les écart-types ont été calculés à partir de trois séries d'expériences. Une erreur moyenne de $\pm 3\%$ sur les concentrations restant à l'équilibre $[DPPH\bullet]_{eq}$ a été obtenue.

2. Résultats

Les résultats sont donnés en pourcentage d'inhibition de la coloration due au piégeage du radical DPPH• (Figure 4).

3. Conclusion

Dans les conditions expérimentales exposées, l'extrait d'*Haematococcus pluvialis* est capable, à toutes les concentrations testées, de piéger les radicaux libres avec lesquels il est en contact. A la concentration de 2%, 95% des radicaux libres présents sont piégés par l'extrait d'*Haematococcus pluvialis*.

IV. EXEMPLES DE COMPOSITIONS OBJET DE L'INVENTION

1. EMULSION PHOTOPROTECTRICE

	%
5	C12-15 ALKYL BENZOATE3,00
	CYCLOMETHICONE5,00
	STEARATE D'ETHYLHEXYLE5,00
	HUILE DE GERME DE BLE3,00
10	ALCOOL CETEARYLIQUE1,00
	PEG-100 STEARATE1,50
	STEARATE DE GLYCERYLE1,50
	OCTOCRYLENE7,00
	METHOXYCINNAMATE D'ETHYLHEXYLE7,50
15	METHOXYBUTYL DIBENZOYLMETHANE2,00
	EXTRAIT DE POLYSIPHONIA LANOSA5,00
	EXTRAIT D'HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS2,00
	CARBOMER0,10
	PARFUM0,30
20	EAU OSMOSEEQ.S.P. 100,00

2. GEL PHOTOPROTECTEUR

	DERIVE DE POLYVINYL PYRROLIDONE2,00
25	DERIVE DE CELLULOSE2,00
	C12-15 ALKYL BENZOATE3,00
	OCTOCRYLENE3,00
	METHOXYCINNAMATE D'ETHYLHEXYLE7,50
	METHOXYBUTYL DIBENZOYLMETHANE2,00
30	EXTRAIT DE POLYSIPHONIA LANOSA5,00
	EXTRAIT D'HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS2,00
	PARFUM0,30
	ALCOOLQ.S.P. 100,00

L'invention telle que décrite ci-dessus présente différents avantages parmi lesquels :

- 5 - la définition d'une composition photoprotectrice à partir d'ingrédients d'origine naturelle, qui sont des algues marines,
- ces algues contiennent intrinsèquement et naturellement la concentration suffisante en MAAs, astaxanthine et en minéraux, et l'extrait qui en est obtenu n'a aucunement besoin d'être concentré,
- 10 - la combinaison au sein d'une même composition d'une action photoprotectrice et de ralentissement du vieillissement des cellules de la peau grâce aux MAAs et à l'astaxanthine.

REVENDEICATIONS

1. Composition cosmétique photoprotectrice,
5 comprenant un agent absorbant des radiations ultra-
violettees et un agent antiradicallaire, les deux agents
étant des extraits d'algues marines.

2. Composition selon la revendication 1, dans
10 laquelle l'agent absorbant des radiations ultra-
violettees est un extrait d'une algue marine comprenant
des acides aminés de type mycosporines (MAAs).

3. Composition selon la revendication 2, dans
15 laquelle les acides aminés de type mycosporines (MAAs)
de l'algue marine comprennent la mycosporine-aurine, la
mycosporine-glycine, la palythine, la parphyra-334, la
shinorine et/ou la palythène.

20 4. Composition selon la revendication 2 ou 3,
dans laquelle l'agent absorbant des radiations ultra-
violettees comprend un extrait de l'algue *Polysiphonia*
lanosa.

25 5. Composition selon la revendication 4, dans
laquelle l'extrait de l'algue *Polysiphonia lanosa*
présente un pic d'absorption maximale situé entre 290 et
360 nm.

30 6. Composition selon la revendication 5, dans
laquelle l'extrait de l'algue *Polysiphonia lanosa*
présente un pic d'absorption maximale situé entre 320 et
360 nm.

7. Composition selon l'une des revendications 4 à 6, dans laquelle l'extrait de l'algue *Polysiphonia lanosa* est aqueux ou hydrosoluble.

5 8. Composition selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle l'agent antiradicallaire est un extrait d'une algue marine comprenant de l'astaxanthine.

10 9. Composition selon la revendication 8, dans laquelle l'agent antiradicallaire est un extrait de la forme rouge non mobile de l'algue *Haematococcus pluvialis*.

15 10. Composition selon la revendication 9, dans laquelle l'extrait de la forme rouge de l'algue *Haematococcus pluvialis* est lipidique ou liposoluble.

20 11. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant :

- entre 1 à 10% en poids, de préférence 3 à 8% en poids d'un extrait de *Polysiphonia lanosa* comme agent absorbant des radiations ultra-violettes,

25 - entre 0,01 à 5% en poids, de préférence 0,01 à 3% en poids d'un extrait d'*Haematococcus pluvialis*.

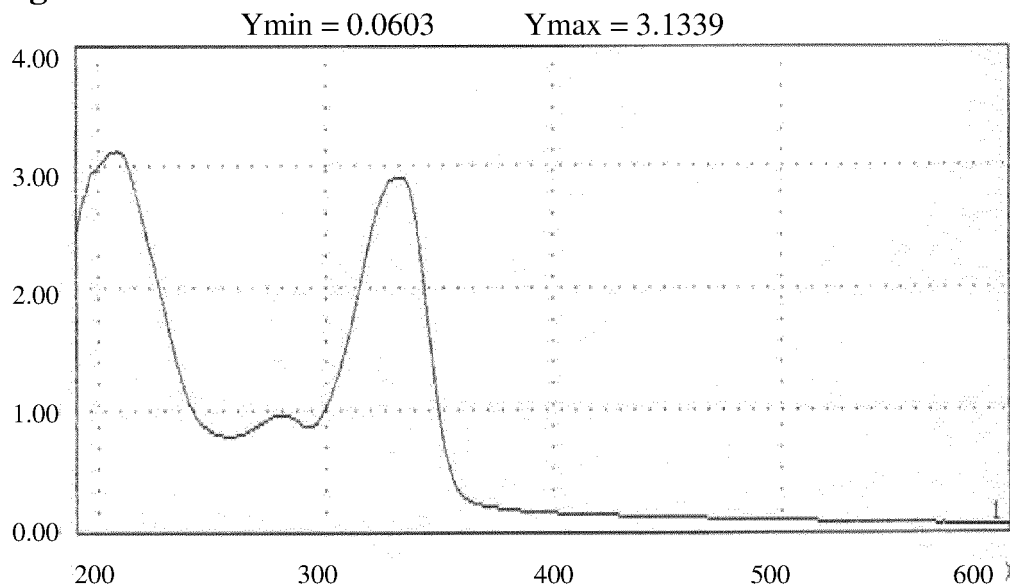
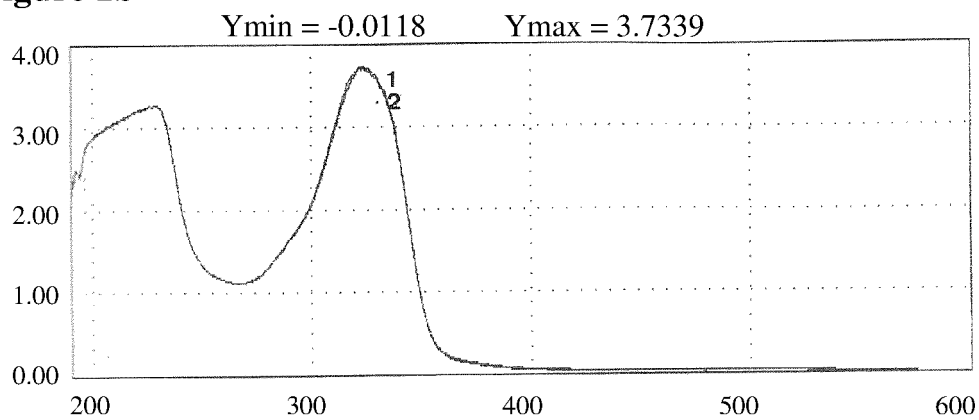
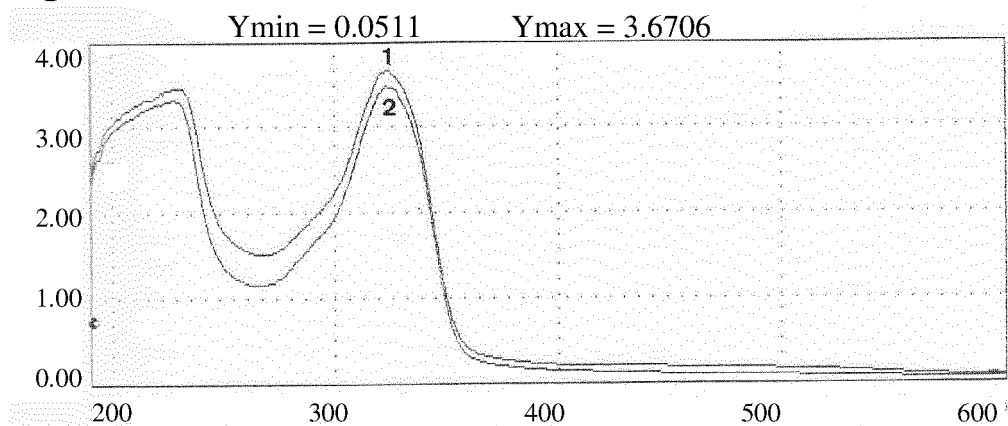
30 12. Composition cosmétique selon l'une des revendications précédentes, comprenant en outre un ou plusieurs agents de formulation ou additifs tels que des filtres UV, des tensioactifs, des agents épaississants, des huiles, des conservateurs, des parfums, des actifs comme des vitamines.

35 13. Composition cosmétique selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle

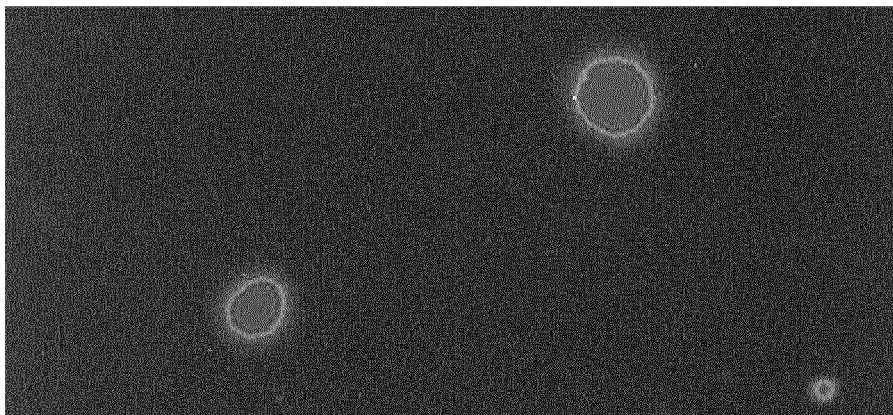
se présente sous la forme d'une émulsion, d'une huile, d'un gel, d'une lotion, d'un spray, d'un aérosol.

- 5 14. Utilisation d'un extrait de l'algue *Haematococcus pluvialis* et d'un extrait de l'algue *Polysiphonia lanosa* pour la fabrication d'une composition cosmétique photoprotectrice.

1/4

Figure 1**Figure 1a****Figure 1b****Figure 1c**

2/4

Figures 2**Figure 2a****Figure 2b**

3/4

Figures 3

Figure 3a

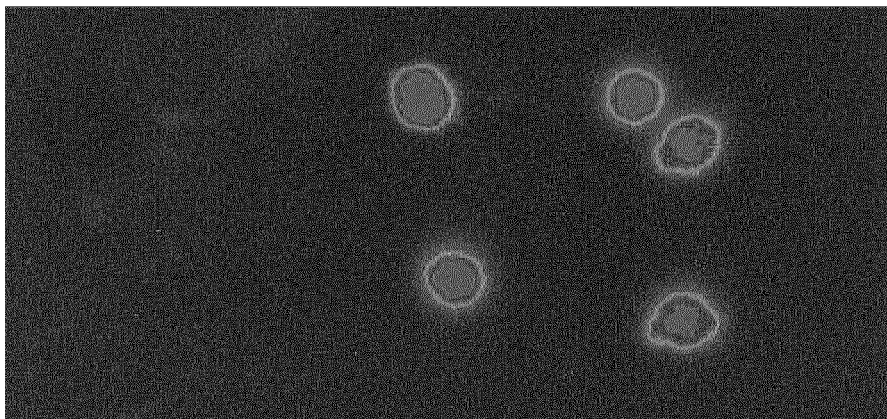
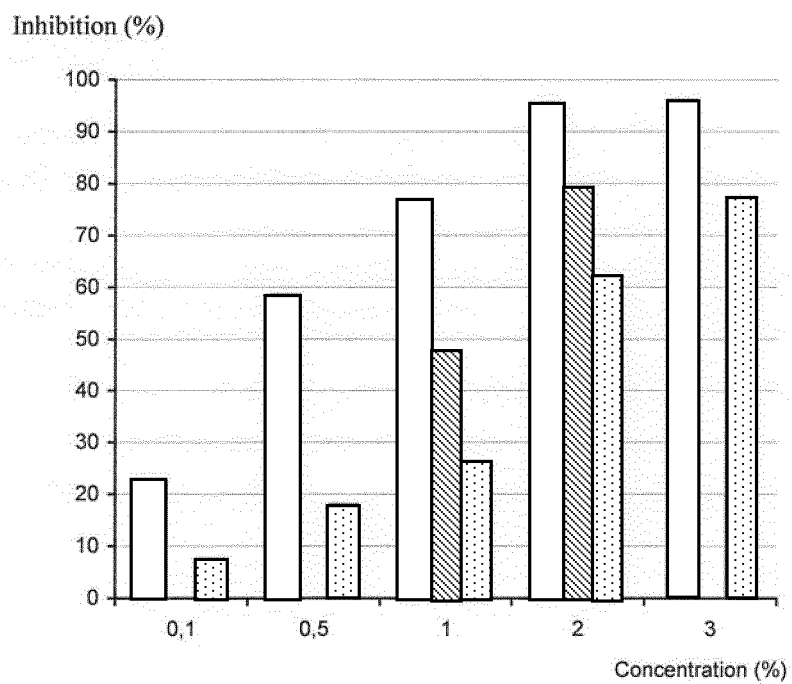


Figure 3b



4/4

Figure 4





**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

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

FA 762210
FR 1250912

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	Thalgo cosmetic: "Caroten sun - Rezepte für eine gesunde Bräune", , mars 2011 (2011-03), XP002685072, Extrait de l'Internet: URL:http://www.thalgo.de/uploads/media/PM_Ella_Bache_Caroten_2011_final.pdf [extrait le 2012-10-10] * page 1, ligne 11 - ligne 23 *	1-14	A61K8/97 A61Q17/04
X	----- DATABASE GNPD [Online] MINTEL; avril 2011 (2011-04), "Body Sun Lotion SPF 30", XP002685073, Database accession no. 1531517 * section ingredients *	1-14	
X	----- FR 2 803 200 A1 (BREV LICENCES ET COMMERCIALISA [FR]) 6 juillet 2001 (2001-07-06) * revendications 1, 8-9 *	1-14	
A	----- LORENZ R T ET AL: "Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 18, no. 4, 1 avril 2000 (2000-04-01), pages 160-167, XP004194004, ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/S0167-7799(00)01433-5 * le document en entier *	1-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K A61Q
		----- -/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
11 octobre 2012		Briand, Benoit	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement
national

FA 762210
FR 1250912

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		
A	KARSTEN U ET AL: "An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions", 19980101, vol. 41, no. 5, 1 janvier 1998 (1998-01-01), pages 443-453, XP001086657, * le document en entier * -----	1-14	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		11 octobre 2012	Briand, Benoit
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1250912 FA 762210**

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 **11-10-2012**

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2803200	A1	06-07-2001	AUCUN
