



(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication :
MA 38901 A1

(51) Cl. internationale :
A61K 8/97

(43) Date de publication :
31.10.2017

(21) N° Dépôt :
38901

(22) Date de Dépôt :
09.03.2016

(71) Demandeur(s) :
MASCIR (MORROCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH), RUE MOHAMED EL JAZOULI, MADINAT AL IRFANE RABAT 10100 (MA)

(72) Inventeur(s) :
MERGHOUB Nawal ; WAHBY Imane

(74) Mandataire :
ABDELHAQ AMMANI

(54) Titre : **UTILISATION DE COMPOSITION A BASE D'EXTRAITS ISSUS DE MICRO-ALGUES POUR LE SOIN DES PEAUX ACNEIQUES**

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation d'une composition cosmétique ou dermepharmaceutique comprenant à titre d'ingrédient actif des extraits trans-estérifiés issus de microalgues pour le soin des affections dermiques des peaux acnéiques. Les extraits de microalgues trans-estérifiés la dite composition, possèdent une activité antibactérienne contre les bactéries responsable de l'acné notamment Propionibaeterium aenes et Staphyloeoccus epidermidis ainsi qu'une activité anti-oxydante.

UTILISATION DE COMPOSITION A BASE D'EXTRAITS DE MICRO-ALGUES TRANS-ESTERIFIES
POUR LE SOIN DES PEAUX ACNEIQUES.

5 **Abrégé :**

La présente invention concerne l'utilisation d'une composition cosmétique ou dermo-pharmaceutique comprenant à titre d'ingrédient actif des extraits trans-estérifiés issus de microalgues pour le soin des affections dermatiques des peaux acnéiques. Les extraits de microalgues trans-estérifiés la dite composition, possèdent une activité antibactérienne contre
10 les bactéries responsable de l'acné notamment *Propionibacterium acnes* et *Staphylococcus epidermidis* ainsi qu'une activité anti-oxydante.

15

20

**UTILISATION DE COMPOSITION A BASE D'EXTRAITS ISSUS MICRO-ALGUES POUR LE SOIN DES
PEAUX ACNEIQUES.**

Domaine de l'invention :

[0001] La présente invention a pour objet une composition à base d'extraits trans-estérifiés issus de microalgues destinés à la prévention, le soin de l'acné et des dermatites séborrhéiques acnéiques. La composition englobe des extraits trans-estérifiés de microalgues ayant une activité antibactérienne contre les bactéries *Propionibacterium acnes* et *Staphylococcus epidermidis* ainsi qu'une activité antioxydante.

Etat de l'art :

[0002] La réaction de trans-estérification des huiles végétales avec de l'éthanol permet la production d'esters alkyliques dont les applications industrielles sont, à ce jour, essentiellement pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques.

[0003] La réaction de trans-estérification des extraits de microalgues est réalisée avec un alcool plus particulièrement l'éthanol (éthanolyse). Cette réaction conduit entre autre à la formation d'esters alkyliques d'acides gras et de glycérol (Figure 1).

[0004] Après la réaction de trans-estérification des extraits avec de l'alcool, quelques intermédiaires réactionnels peuvent se retrouver dans la composition finale du milieu réactionnel. Des diglycérides et des monoglycérides peuvent se retrouver dans la phase enrichie en ester en fin de réaction. Ces monoglycérides et diglycérides d'acides gras sont produits par une réaction de trans-estérification de triglycérides avec du glycérol en présence d'un catalyseur enzymatique, acide ou basique [Corma A. et al. 1998. Journal of Catalysis; 173(2), 315-321].

[0005] La production d'esters alkyliques par trans-estérification d'huile végétale génère un autre coproduit, le glycérol ou glycérine qui est un composé visqueux, non toxique, incolore, inodore soluble dans l'eau et l'éthanol. Le glycérol est très largement utilisé dans les formulations en industrie pharmaceutique, ou en cosmétologie comme agent hydratant, solvant et additif de lubrification et rentre dans la compositions de certains produits cosmétiques, crèmes hydratantes, dentifrices, produits capillaires, bains de bouche, et savons à la glycérine.

[0006] Récemment, il a été démontré que certains acides gras méthyles esters extraits à partir *Salicornia brachiata*, une plante de la famille des *Chenopodiaceae* ont démontré une activité antibactérienne et antifongique [Chandrasekaran M. et al. 2008, Z. Naturforsch. 63c, 331-336]. Une autre étude a rapporté l'activité antibactérienne d'acides gras méthyles esters isolées à partir de macroalgues [Anantharaj M. et al., 2004, Res. Utiln. 26, 87-92]. Il a été également démontré que des acides gras méthyles esters extraits à partir d'une espèce de microalgues marine, *Nannochloropsis oculata* possédaient une activité antibactérienne vis-à-vis de certaines bactéries Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) et Gram- (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) [Surendhiran et al. 2014, Journal of Coastal Life Medicine, 2(11): 859-863]. A la connaissance des inventeurs, aucun travail précédent ne décrit l'activité antibactérienne des acides gras éthyles esters notamment vis-à-vis des bactéries responsables de l'acné à savoir *Propionibacterium acnes* ainsi que *Staphylococcus epidermidis*.

[0007] L'acné est une dermatose chronique, fréquente chez l'adolescent atteignant principalement le visage. C'est une affection provoquée par l'obstruction des follicules pilo-sébacés suite à une production excessive de sébum et la présence de cellules mortes. L'acné est une affection étroitement liée à une super-sécrétion sébacées androgénodépendante (hyperséborrhée), une rétention sébacée avec l'hyperkératinisation du canal folliculaire, une inflammation liée à la colonisation du follicule sébacé par *Propionibacterium acnes* et *Staphylococcus epidermidis*.

[0008] La prévalence de l'acné est de l'ordre de 80 % dans la majorité des pays du monde des personnes âgées de 11 à 35 ans. L'acné modérée à sévère représente 20 % [Dréno B., 2010. *Ann Dermatol Venereol.*, 137, 2, 49- 51]. Le pic de fréquence se situe entre 15 et 18 ans, un peu plus rapidement chez la fille (12 à 16 ans) [Bhate K. et Williams H.C., 2013, *British Association of Dermatologists*, 168, 474-485].

[0009] Ce processus inflammatoire, multifactoriel, est le résultat direct ou indirect de la prolifération de bactéries comme *P. acnes*. Cette bactérie est un germe commensal de la flore cutanée. Dans la peau normale, *P. acnes* se développe au fond du follicule pilo-sébacé et gagne la surface épidermique par le sébum. Au cours de l'acné, l'accumulation anormale de cornéocytes

et l'excès de sébum dans le canal du follicule représente un environnement idéal pour son développement. Sa multiplication conduit au processus inflammatoire au cours de la pathologie.

[0010] La flore anaérobie des follicules sébacés telle que *Propionibacterium acnes* est responsable du processus inflammatoire par divers mécanismes. Cette bactérie sécrète des lipases qui hydrolysent, dans le canal pilo-sébacé, les triglycérides du sébum et les transforment en glycérol et acides gras libres qui présentent une activité pro-inflammatoire et chimiotactique pour les polynucléaires. Des métalloprotéases sont produites entraînant la rupture de la paroi du follicule pilo-sébacé diffusant ainsi l'inflammation en profondeur [Schaller et al. 2005, Br J Dermatol. 153(1):66-71].

[0011] Le traitement actuel pour l'acné mineure à modérée ou inflammatoire correspond à une application topique d'actifs antibactériens agissant contre la colonisation bactérienne notamment par *P. acnes* [Shalita A., J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2001 ; 15 : 43]. Les médicaments topiques comprennent : les rétinoïdes topiques qui agissent à la fois sur les lésions rétentionnelles et inflammatoires, le peroxyde de benzoyle, des antibiotiques locaux (érythromycine, clindamycine). Ces derniers doivent être utilisés en association avec l'un des deux autres pour éviter l'apparition de bactéries résistantes sur la peau.

[0012] La recherche de nouvelles molécules naturelles pour le traitement des diverses affections cutanées ou autres constitue une alternative intéressante pour le traitement et la prévention des affections cutanées impliquées dans l'acné. De nombreux documents proposent des formulations pour lutter contre l'acné à base de substances d'origine naturelle, telles que les extraits de plantes, huiles essentielles, extraits de micro-organismes, et extraits de macroalgues.

[0013] Les microalgues constituent un gisement prometteur de molécules d'intérêts pour plusieurs domaines comme, le secteur agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique et nutraceutique. Du fait de leurs chimio-diversité, les molécules extraites des microalgues sont de nature variée : les polysaccharides, acides gras polyinsaturés, composés aromatiques, pigments, protéines et lipides. Certaines espèces de microalgues sont capables de synthétiser des substances d'intérêts ayant des activités bactéricides, bactériostatiques ou antifongiques, ou de posséder des vertus thérapeutiques, notamment des activités anticancéreuse, anti-oxydante, anti-inflammatoire, antivirale et immunomodulatrice.

[0014] Ces dernières années ont vu naître un grand intérêt concernant l'utilisation des microalgues dans le domaine cosmétique et dermo-cosmétique. De nombreux brevets ont décrits différentes utilisations de ces microalgues pour leurs propriétés antioxydantes, lipolytiques (FR 2987262- A1-2012), stimulatrice de la croissance capillaire et modulation de la pigmentation de la peau (EP 2168570- B1- 2013), protection contre les UV (WO 2012093388-A2-2012), prévention du vieillissement (anti-âge) (DE 102010016210-A1-2011), propriétés hydratantes et amélioration de l'apparence de la peau (WO 2013023786- A1-2013 ; CA 2739440-A1-2009 ; CA 2815271- A1- 2012).

[0015] Certains brevets décrivent des formulations incluant des composants d'origine algale pour le traitement de l'acné. Des surnageants de culture de microalgues du genre *Nostoc* ont démontré une activité antibactérienne, pour le traitement des affections cutanées (FR 2977799-A1-2013). Un autre exemple concerne une composition incluant un extrait de la macroalgue *Fucus spiralis* et la microalgue *Tetraselmis chui* issue d'une culture enrichie en Zinc ayant une activité anti-séborrhéique destinés à limiter les désordres cutanés liés à la peau à tendance grasse et/ou acnéique (FR 2980698-A1-2013).

[0016] D'autres demandes de brevets revendiquent l'utilisation d'extraits de microalgues pour l'usage dermatologiques antiacné, cependant seule l'activité antioxydante a été démontrée (BRPI1004637A2 ; JP2002069443A).

[0017] Une demande de brevet précédemment déposée, revendique l'utilisation d'une composition à base d'extraits de microalgues pour le traitement et la prévention de l'acné, ayant une activité antibactérienne contre les bactéries *Propionibacterium acnes* et *Staphylococcus epidermidis*, une activité antioxydante, une activité anti-inflammatoire, et une propriété stimulatrice de la régénération des cellules de la peau (WO/2015/084136A1).

[0018] Une réaction de trans-estérification réalisée sur les extraits de microalgues obtenus selon la demande de brevet antérieur (WO/2015/084136A1), induit une amélioration de l'activité antibactérienne de ces extraits vis-à-vis des bactéries responsables de l'acné *Propionibacterium acnes* et *Staphylococcus epidermidis*, et plus particulièrement vis-à-vis de *Propionibacterium acnes*.

[0019] A la connaissance des inventeurs, aucun travail précédent ne décrit une formule à base d'extraits trans-estérifiés issus de microalgues ayant une action antibactérienne contre les bactéries responsables de l'acné. L'acné est aujourd'hui considérée comme une maladie chronique nécessitant un traitement d'attaque et d'entretien. L'utilisation d'une formule antibactérienne à base d'extraits de microalgues trans-estérifiés pour la prévention et le soin des peaux acnéiques en association avec des traitements antiacnés, peut constituer une solution de choix. Ces extraits de microalgues trans-estérifiés ne présentent aucune cytotoxicité *in vitro* de cellules de fibroblastes en culture, les rendant potentiellement utilisables en dermo-cosmétique, ce qui fait l'objet de la présente invention.

Description de l'invention

[0020] La présente invention concerne une composition dermo-cosmétique comprenant une formule à base d'extraits trans-estérifiés issus de microalgues ayant une activité antibactérienne contre les bactéries responsable de l'acné notamment *P. acnes* et *S. epidermidis*, pour le soin et la prévention de l'acné.

[0021] Dans un mode de réalisation, les extraits de microalgues utilisés, pour la préparation de ladite composition, sont issus d'espèces de microalgues choisies parmi une Chlorophyceae, une Cyanophyceae, une Bacillariophyceae, une Xantophyceae ou une Chrysophyceae.

[0022] Dans un mode de réalisation préféré, les espèces de microalgues utilisées pour la préparation des extraits sont choisies, plus particulièrement, parmi le genre *Nannochloropsis* et *Dunaliella*.

[0023] Selon un deuxième mode de réalisation, les microalgues utilisées pour la préparation des extraits objet de cette invention pourraient être choisies parmi les microalgues dont les extraits possèdent des propriétés antibactériennes contre les bactéries de l'acnés, telles que les microalgues du genre *Isochrysis*, *Chaetoceros*, *Chlamydomonas*, *Phaeodactylum*.

[0024] Les microalgues utilisées pour la préparation des extraits sont cultivées individuellement dans les conditions optimales. Les cultures sont réalisées dans l'eau de mer enrichie en nutriments, essentiellement l'azote, phosphore et potassium, le fer et autres micro-éléments, les chélateurs et les tampons pour le contrôle du pH (Tris, MES, HEPES, MOPS, phosphate mono-,

di- ou tri-basique, etc.). La température de croissance est comprise entre 20 et 25°C selon les espèces objet de cette invention.

[0025] Les microalgues ont été cultivées dans des bioréacteurs de 20L, contenant de l'eau de mer filtrée, stérilisée et enrichie avec le milieu de croissance f/2 (Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975). Toutes les cultures ont été agitées par bullage en utilisant de l'air pur, et l'intensité lumineuse a été réglée à $65 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ sous un régime d'éclairage continu.

[0026] Dans certains modes de réalisations les cultures de microalgues sont arrêtées et les biomasses soumises à l'extraction durant la phase stationnaire durant laquelle la croissance s'arrête et commence l'accumulation de biomolécules.

[0027] Dans un mode de réalisation précis, les extraits de microalgues sont préparés à partir de culture ayant entre 15 et 25 jours dans les conditions optimales.

[0028] Dans un autre mode de réalisation, les microalgues sont récoltées et la biomasse est séparée du milieu de culture par centrifugation. La biomasse récoltée est séchée par lyophilisation ou autre méthode de séchage. La biomasse est par la suite soumise à un prétraitement qui consiste à un ou plusieurs traitements mécaniques, selon la nature des microalgues (presse, billes en verre, choc thermique, ultrasons ou autres méthodes connues).

[0029] Dans un autre mode de réalisation la biomasse microalgale est soumise à une extraction chimique en utilisant un solvant qui peut être à des proportions de 80% à 100%.

[0030] Dans un mode de réalisation préféré la biomasse est prétraitée par ultrason entre 5 et 10 min pour la rupture des membranes et la libération du contenu cellulaire.

[0031] Dans un mode de réalisation, la préparation des extraits issus de biomasses microalgales se réalise par macération dans des solvants comme l'éthanol ou autre.

[0032] Dans un mode de réalisation préféré, l'extraction se fait à l'aide d'extracteur automatisé à savoir ASE (Accelerated Solvent Extractor) ou bien par soxhlet, par extraction supercritique, ou autres méthodes connues pour l'extraction de biomasse.

[0033] Dans un autre mode de réalisation, les extraits éthanoliques obtenus sont filtrés en utilisant des filtres $0,2 \mu\text{m}$ (filtres de nitrocellulose ou PVDF) afin d'éliminer toute trace de résidus de biomasse.

[0034] Dans un mode de réalisation, les solvants contenus dans les extraits de microalgues sont évaporés à sec en utilisant une méthode qui peut être un rotavapeur ou autres méthodes connues pour le séchage d'extraits.

[0035] Dans un autre mode de réalisation, la réaction de trans-estérification des extraits de microalgues, objet de cette invention, peu se faire plus particulièrement avec de l'éthanol en présence d'un catalyseur (généralement NaOH, KOH ou $\text{Ca}(\text{OH})_2$) assisté par des ultrasons.

[0036] Dans un second mode de réalisation, la préparation d'extraits de microalgues de trans-estérifiés peut se faire en deux réactions successives, à savoir extraction éthanoliques de la biomasse microalgale suivie d'une réaction trans-estérification des extraits obtenus, ou bien en une seule étape de extraction/transesterification de la biomasse (fraîche ou sèche) sous ultrason en présence d'éthanol et du catalyseur basique.

[0037] Dans un mode de réalisation, les extraits éthanoliques des microalgues subissent une réaction de trans-estérification avec l'éthanol par un procédé continu ou discontinu, préférablement par un procédé discontinu en réacteur batch.

[0038] Dans un mode de réalisation, la réaction de trans-estérification des lipides contenus dans les extraits éthanoliques peut se réaliser selon le rapport molaire éthanol/Extraits éthanolique de 3% , 6%, 9%.

[0039] Dans un autre mode de réalisation, pour obtenir un rendement réactionnel maximal, la quantité de catalyseur basique utilisé (NaOH, KOH ou $\text{Ca}(\text{OH})_2$, éthylate de sodium, peroxyde de potassium) peut être au ration de 1%, 2% ou 3% par rapport à la masse initiale de lipides contenus dans l'extrait éthanolique de microalgues.

[0040] Dans un autre mode de réalisation, la réaction de trans-estérification d'extraits de microalgues peut se réaliser par trans-estérification acide, assistée par ultrason.

[0041] Dans un autre mode de réalisation, la réaction de trans-estérification d'extraits de microalgues peut se réalisé par trans-estérification enzymatique (lipase immobilisée).

[0042] Selon un autre mode de réalisation, les esters alkyliques de la composition de l'invention peuvent être fabriqués selon le procédé décrit dans le document US 2007/0073070 A1.

[0043] Dans un mode de réalisation, la formule d'extraits trans-estérifiés, issus microalgues, destinée pour le traitement et /ou la prévention de l'acné et le soin de la peau, a été testée pour son activité antibactérienne sur les bactéries responsables de l'acné à savoir *P. acnes* et *S. epidermidis*.

[0044] Un autre mode de réalisation, la formule à base d'extraits de microalgues montre une activité antioxydante en plus de l'activité antimicrobienne.

[0045] Dans un autre mode de réalisation la formule à base d'extraits de microalgues, montre un effet hydratant dû à la présence de glycérol (produit de la trans-estérification) dans la dite composition.

[0046] Dans certains modes de réalisation, la formule peut être préparée à partir de l'extrait d'une seule espèce de microalgues ou en combinant plusieurs extraits trans-estérifié issues de plusieurs espèces de microalgues à des concentrations comprises entre 0,01 % à 5% ou plus, en poids par rapport au poids total de la formule.

[0047] Les compositions, selon l'invention, peuvent également consister en des préparations solides constituant des savons ou des pains de nettoyage. Elles peuvent être également utilisées sous forme de solutions aqueuses, alcooliques ou hydroalcooliques, ou sous forme de crèmes, de gels, d'émulsions, de lotions, de mousses ou savon liquide.

[0048] Dans certains mode de réalisation, la composition dermo-cosmétique ou pharmaceutique selon l'invention peut également contenir d'autres constituants qui sont couramment utilisés dans le domaine industriel des produits cosmétiques et pharmaceutiques, à titres d'exemple, contenir des additifs, des conservateurs, des agents tensio-actifs (moussant, émulsionnant, nettoyant), des stabilisants, des gélifiants, des agents complexant, des épaississants, des colorants, des émoulliants ou des parfums.

[0049] Dans d'autres modes de réalisation, les extraits de microalgues constituants de la composition selon l'invention peut être utilisée seule ou en association avec un autre extrait d'origine naturelle parmi un extrait de plante, un extrait de macroalgues, un extrait de micro-organismes, ou tout autres agents antiacné utilisé dans le traitement conventionnel tels que un antibiotique, un agent antiacné, un agent keratoprotecteur ou kératolytique et un sébo-régulateur.

Brève description des Figures :

[0050] Figure 1 : Réaction de trans-estérification de triglycérides avec un alcool (R-OH)

FIGURE 2. Activité anti-oxydante des extraits trans-estérifiés issus microalgues objet de cette invention. Les résultats sont représentés par la moyenne de trois expériences indépendantes, réalisées en triplicate. Extrait 1 : Extrait éthanolique de *Nannochloropsis sp.* Extrait 2 : Extrait éthanolique de *Dunaliella sp.*

Exemples :

[0051] Après la description détaillée de l'invention, les exemples spécifiques cités ci-dessous sont donnés pour illustrer certains aspects non limitatifs de l'invention.

Exemple 1. Préparation des extraits de microalgues utilisés pour la formulation selon la présente invention.

[0052] Les cultures des microalgues sélectionnées sont réalisées dans des bioréacteurs en verre, entre 5 et 20 L, préalablement stérilisés, contenant de l'eau de mer filtrée, stérilisée et enrichie avec le milieu de croissance f/2 (Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975). Toutes les cultures ont été agitées par bullage, et l'intensité lumineuse a été réglée à $65 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ sous un régime d'éclairage continu.

[0053] Durant la phase stationnaire, les espèces de microalgues sont récoltées par centrifugation. La biomasse ainsi récupérée est soumise à une extraction. L'extraction se fait par macération de la biomasse avec de l'éthanol suivi d'un traitement mécanique (presse, ultrasons ou autres méthodes connues), préférentiellement par ultrason pendant 10 min pour la rupture des cellules et la libération du contenu cellulaire microalgale. L'extraction est suivie d'une centrifugation pendant 5 min pour séparer les phases de l'extrait des résidus et débris cellulaires. La phase organique est récupérée et filtrée à l'aide de filtres en nitro-cellulose (0,2 μm). Les extraits ainsi obtenus sont évaporés à sec sous vide à l'aide d'un Rotavapeur, afin d'éliminer toutes traces de solvant.

[0054] Les extraits éthanoliques des microalgues subissent une réaction de trans-estérification avec l'éthanol par un procédé discontinu en réacteur batch, en deux étapes successives. La

réaction de trans-estérification des lipides contenus dans les extraits éthanoliques peut se réaliser selon le rapport molaire éthanol/Extraits éthanolique de 6%. La quantité de catalyseur basique utilisé (KOH, éthylate de sodium, peroxyde de potassium) peut être au ratio de 1 % par rapport à la masse initiale de lipides contenus dans l'extrait éthanolique de microalgues. Cette réaction est assistée par ultrason, l'embout de la sonotrode est placé dans le milieu réactionnel. La puissance ultrasonore de 160 W et une fréquence d'onde de 20 kHz, sous pression atmosphérique et une durée de réaction de 45 min. Les extraits trans-estérifiés sont par la suite séchés par rotavapeur afin d'évaporer l'excès d'éthanol.

Afin de déterminer la composition du milieu réactionnel de trans-estérification: le profil d'esters éthyliques formés, le calcul du rendement et la sélectivité de la réaction, la méthode analytique en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS) est utilisée.

[0055] La caractérisation des extraits de microalgues, objet de la présente invention, a été déterminée en mesurant le teneur en caroténoïdes et en composés phénoliques par des méthodes spectro-photométrique. Une analyse par GC/MS de ces extraits trans-estérifiés issus des deux espèces de microalgues, *Nannochloropsis sp.* et *Dunaliella sp.* a également été réalisée. Les résultats obtenus ont confirmé la présence de nombreux composés tels que les acides gras éthyles esters, phénols, esters, alcools et alcanes comme composés majoritaires. Les acides gras majoritaires contenus dans ces extraits et qui sont en partie responsables de l'activité antimicrobienne sont: acide heptadécanoïque éthyle ester, linoléique éthyle ester, acide hexadécanoïque éthyle ester, acide pentadécanoïque éthyle ester, acide tétradécanoïque éthyle ester et l'acide eicosapentaénoïque éthyle ester.

Exemple 2. Etude de l'activité antibactérienne des extraits trans-estérifiés, issus de microalgues, vis-à-vis des bactéries responsables de l'acné *Propionibacterium acnes* et *Staphylococcus epidermidis*.

[0056] L'acné est essentiellement causé par deux bactéries *Propionibacterium acnes* et *Staphylococcus epidermidis*. L'activité inhibitrice des extraits de microalgues contre ces bactéries est recherchée pour démontrer leur activité antiacné. L'activité antibactérienne des extraits trans-estérifiés a été réalisée vis-à-vis de *Propionibacterium acnes* (CRL.6919 - ATCC) et *Staphylococcus epidermidis* (CRL.14990 - ATCC), par la méthode de micro-dilution en présence de différentes concentrations d'extraits de microalgues.

[0057] Les tests d'activité ont été réalisés en milieu liquide dans des microplaques de 96 puits. Les puits sontensemencés par 10^5 UFC/mL à partir d'une culture bactérienne en phase de

croissance exponentielle (pré-culture bactérienne de 18 à 24h). Les extraits de microalgues sont testés à différentes concentration et incubés à 37°C pendant 24h. Une mesure de la turbidité par mesure de densité optique (DO) à la longueur d'onde 600 nm est réalisée. Les CMI (concentration minimale inhibitrice) sont déterminées à partir de 3 essais indépendants. L'érythromycine est utilisée comme contrôle positif de l'activité antibactérienne.

[0058] L'activité antibactérienne des extraits trans-estérifiés a été évaluée (Tableau 1). La CMI correspond à la plus faible concentration en extrait pour laquelle une inhibition de la croissance bactérienne. Les résultats sont représentés par la moyenne de trois expériences indépendantes, réalisées en triplicate. L'ensemble des résultats obtenus montrent que les extraits des microalgues trans-estérifiés ont montré des activités inhibitrices remarquables vis-à-vis des deux espèces bactériennes par rapport aux extraits de microalgues non trans-estérifiés, avec des CMI de 0,125 mg/mL pour les extraits de *Nannochloropsis sp.* et les extraits de *Dunaliella sp.*, vis-à-vis de *Propionibacterium acnes*. Les extraits de microalgues ayant subi une réaction de trans-estérification sont 10 fois plus actifs contre la bactérie *P. acnes* par rapport aux extraits non trans-estérifiés. Pour *Staphylococcus epidermidis*, ces mêmes extraits ont montré une activité antibactérienne avec une CMI de 1,5 à 2 mg/ml. La composition préparée à partir des ces extraits de microalgues pourrait donc constituer une alternative à certains agents antiacnés de synthèse chimique.

Tableau 1.

Activité antibactérienne des extraits trans-estérifiés de microalgues pour la préparation de la composition antiacné contre les bactéries *Propionibacterium acnes* et *Staphylococcus epidermidis*. La CMI (concentration minimale inhibitrice) est exprimée en (mg/mL) pour les extraits et en (µg/ml) pour l'Erythromycine. Extrait 1 : *Nannochloropsis sp.*; Extrait 2 : *Dunaliella sp.*

	CMI	
	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Extrait 1	1,670	>2,5
Extrait 2	1,517	>2,5
Extrait 1 trans-estérifié	0,125	1,5

Extrait 2 trans-estérifié	0,125	2
Erythromycine	0,5	0,6

Exemple 3 : Etude de l'activité antioxydante des extraits de microalgues.

[0059] L'activité antioxydante des extraits de microalgues trans-estérifiés objet de cette invention, a été réalisée par le test de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle). 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•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

[0060] Des solutions d'extraits à tester (20 μ l) dissous dans du méthanol à la concentration de 1mg/ml sont ajoutées à 180 μ l de la solution méthanolique du DPPH. La mesure de l'absorbance est réalisée à 520nm, après 60 min d'incubation. Les antioxydants tels que le BHT (hydroxytoluène butylé) l'acide gallique et l'acide ascorbique (vitamine C) sont utilisés comme contrôles positifs. Le test a été réalisé en triplicate en 3 essais indépendants. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH (%).

$$I\% = [(DO \text{ contrôle} - DO \text{ test}) / DO \text{ contrôle}] \times 100.$$

[0061] Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits trans-estérifiés testés montrent des pourcentages d'inhibition du radical DPPH de 50% et 47% respectivement pour les extraits de *Nannochloropsis sp.* et *Dunaliella sp.*, à la concentration de 1mg/mL après 1 heure d'incubation (Figure 2). Les extraits éthanoliques de *Nannochloropsis sp.* et *Dunaliella sp.* présentent des activités de 54% et 50%. Ces résultats montrent qu'après trans-estérification l'activité antioxydante des extraits de microalgues est similaire à celles des extraits non trans-estérifiés. Les compositions antiacnés contenant les extraits de microalgues trans-estérifiés selon la présente invention auront des propriétés anti-radicalaires importantes.

Exemple 3. Exemples non limitatifs de composition antiacné à base d'extraits de microalgues

[0062] Un exemple non limitatif de formule d'une composition selon la présente invention, à titre d'illustration, comprenant comme principe actif des extraits de microalgues trans-estérifiés, et plus particulièrement les microalgues des genres, *Nannochloropsis sp.*, et *Dunaliella sp.*. L'excipient mentionné dans la formule va dépendre de la forme (Savon, lotion, gel...) :

Composition 1 :

- Extrait *Nannochloropsis sp.* trans-estérifié..... (0,1 – 2%).
- Excipient.....QSP 100g ou 100mL.
- Conservateurs et parfum.

Composition 2 :

- Extrait *Dunaliella sp.* trans-estérifié (0,1 – 2%).
- Excipient.....QSP 100g ou 100mL.
- Conservateurs et parfum.

Revendications :

- 1- Composition dermo-cosmétique pour le soin antiacné **caractérisée en ce que** l'actif de ladite composition est un extrait trans-estérifié de microalgues possédant une activité antibactérienne contre les bactéries responsables de l'acné *Propionibacterium acnes* et *Staphylococcus epidermidis*, ainsi qu'une activité anti-oxydante.
- 2- Composition selon la revendication 1 **caractérisée en ce que** l'extrait trans-estérifié de microalgues, ingrédient de base pour la composition anti-acné, contiennent parmi ces actifs, des esters alkyliques obtenu par trans-estérification basique, acide, ou enzymatiques (lipase immobilisée), et plus particulièrement une trans-estérification basique par ultrasons utilisant de l'éthanol et du l'hydroxyde de potassium (KOH).
- 3- Composition selon les revendications 1 et 2, **caractérisée en ce que** les esters alkyliques peuvent représenter de 0,1 à 99 % du poids total de l'extrait trans-estérifié de microalgue, ingrédient de base pour la composition antiacné, de préférence de 1 à 50 %.
- 4- Composition selon les revendications 1 à 3, **caractérisée en ce que** les espèces de microalgues utilisées pour la préparation des extraits trans-estérifiés de microalgues sont avantageusement du genre *Nannochloropsis* et *Dunaliella*.
- 5- Composition selon les revendications 1 à 4, **caractérisée en ce que** l'actif est un extrait obtenu à partir de biomasses microalgales par une extraction à chaud ou à froid, en utilisant des solvants choisis parmi l'eau, les alcools, le propylène glycol, la glycérine, le polyéthylène glycol, les éthers éthyliques ou éthyliques, ou autres solvants organiques, ou tout mélange de ces solvants.
- 6- Composition selon les revendications 1 à 5 **caractérisée en ce que** les extraits sont obtenus par extraction de biomasses micro-algales utilisant un solvant organique, soit par macération, soit extraction par soxhlet, soit assisté par ultrason ou utilisant un extracteur automatisé, ou bien à l'aide extraction par un fluide supercritique.

- 7- Composition selon les revendications 1 à 6 **caractérisée en ce que** l'extrait micro-algal contenu dans la composition dermo-cosmétique soit obtenu à partir d'une espèce ou de la combinaison d'extraits issus de plusieurs espèces de microalgues ayant une activité antiacné.
- 8- Composition selon les revendications 1 à 7 **caractérisée en ce que** la concentration des extraits trans-estérifiés de microalgues soit comprise entre 0.1% et 50% du poids total de la composition dermo-cosmétique, préférentiellement entre 0.5 et 10% dans le produit fini.
- 9- Composition selon les revendications 1 à 8 **caractérisée en ce que** l'extrait trans-estérifié de microalgues est utilisé seul ou en combinaison avec un autre extrait ou molécule naturelle ou chimique parmi un extrait de plante, un extrait de macroalgues, un extrait de micro-organismes, un antibiotique, un micro-élément, un agent kérato-régulateur ou kératolytique ou un sébo-régulateur.
- 10- Composition selon les revendications 1 à 9, **caractérisée en ce que** ladite composition est destinée pour l'utilisation topique sous forme de Gel, lotion, crème, pommade, solution lavante, ou autres formes d'usage topique.

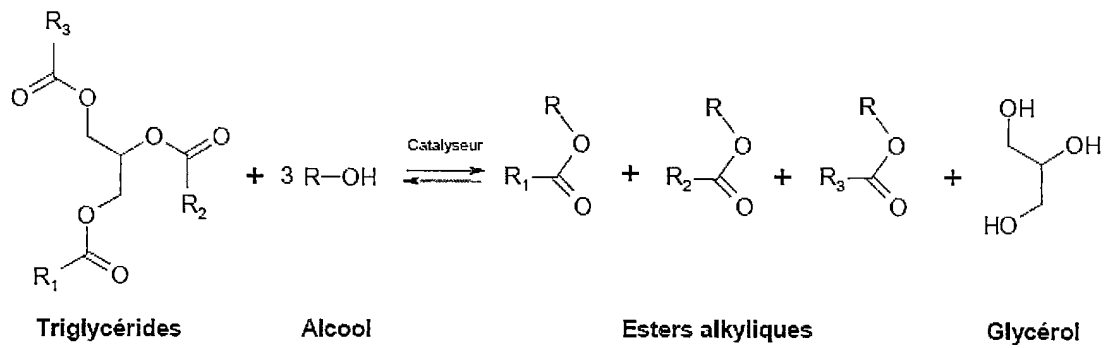


Figure 1

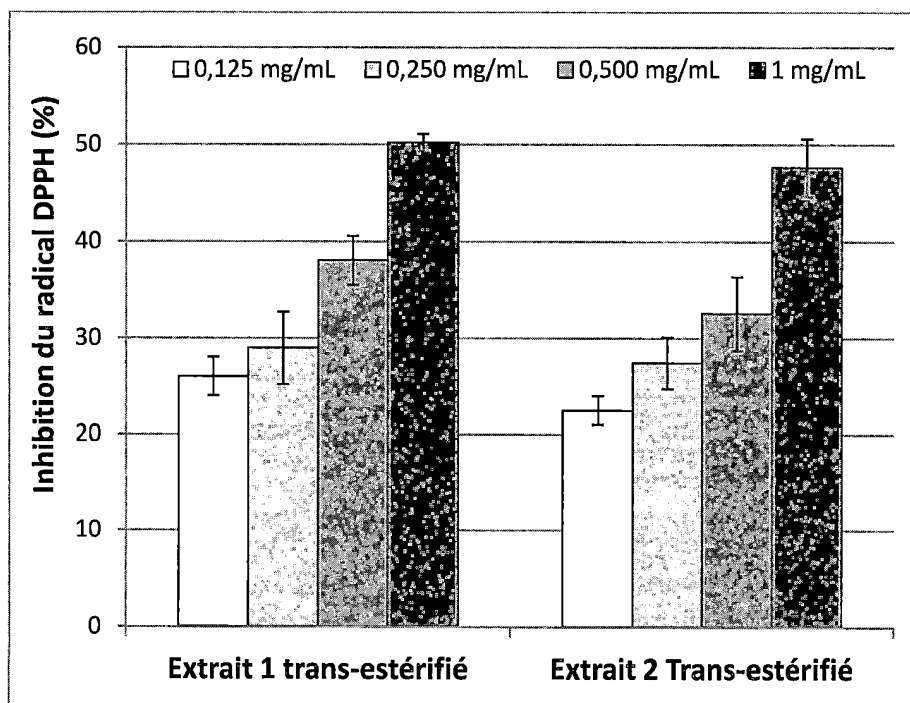


Figure 2



**RAPPORT DE RECHERCHE
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et
complétée par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 38901	Date de dépôt : 09/03/2016
Déposant : MASCIR (MORROCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH)	
Intitulé de l'invention : UTILISATION DE COMPOSITION A BASE D'EXTRAITS ISSUS DE MICRO-ALGUES POUR LE SOIN DES PEAUX ACNEIQUES	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents cités par l'examineur dans la partie rapport de recherche sont joints au présent document	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité <input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée <input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: S.BENCHEKROUN	Date d'établissement du rapport : 20/07/2016
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	



Partie 1 : Considérations générales		
<i>Cadre 1 : base du présent rapport</i>		
Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :		
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Description</u> 13 Pages • <u>Revendications</u> 10 • <u>Planches de dessin</u> 1 Page 		
Partie 2 : Rapport de recherche		
Classement de l'objet de la demande :		
CIB : A61K36/02, A61Q19/00 , A61P17/18, A61P31/04, A61P17/10		
Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :		
EPOQUE, Orbit		
Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
A	BRPI1004637, univ fed do parana, 26/06/2012	1-10
A	WO 1998010656; Algues Et Mer; 19/03/1998 Tout le document	1-10
*Catégories spéciales de documents cités :		
<p>-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>-« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs</p> <p>-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté</p>		

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité*Cadre 4 : Remarques de clarté*

1- La revendication 1 manque de clarté, car il existe un grand nombre de micro algues, et il incombe à l'homme métier de fournir un effort excessif pour déterminer lesquelles de ces nombreuses espèces aurait à la fois des propriétés antimicrobiennes, et les propriétés anti oxydante.

2- La revendication 4 n'est pas claire, car les micros algues définis comme avantageusement du genre Dunaliella, Nanochloropsis peuvent également appartenir à n'importe quels autres genres de microphyta

Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté (N)	Revendications 1-10 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1-10 Revendications aucune	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-10 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : **WO 1998010656**

1. Nouveauté (N) :

Aucun des documents ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques des revendications 1-10, d'où l'objet desdites revendications est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive (AI) :

Le document D1 qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 divulgue les extraits de micro algues pour la prévention et le traitement de l'acné (voir abrégé) possédant une activité antibactérienne contre les bactéries responsables de l'acné (P. acnés ou S.epidermidis).

Par conséquent l'objet de la revendication 1 diffère de D1 par l'étape de la trans-estérification.

L'effet technique de cette différence réside en ce que la réaction de trans-estérification réalisé sur les extraits de micro algues permet une amélioration de l'activité antibactérienne de ces extraits vis-à-vis des bactéries responsables de l'acné.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme étant le traitement de l'acné par l'utilisation d'extrait trans-estérifié de micro algues, présentant une activité antibactérienne et anti-oxydante.

La solution proposée par la demande n'est pas évidente à l'égard de l'art antérieur, l'homme de métier confronté au problème ci-dessus ne peut pas prédire l'activité antibactérienne à partir des extraits trans-estérifié, aucun document ne l'incite à arriver à ce résultat.

Par conséquent, Les revendications 1-10 de la présente demande impliquent une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible