

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 871 380

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

②① N° d'enregistrement national :

04 06240

⑤① Int Cl⁷ : A 61 K 35/78, A 61 K 7/48, A 61 P 17/00 // (A 61 K 35/78)

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 09.06.04.

③① Priorité :

⑦① Demandeur(s) : LABORATOIRE NUXE Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : LECLERE JACQUES.

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 16.12.05 Bulletin 05/50.

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

⑥① Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET SUEUR ET L'HEL-GOUALCH.

⑤④ COMPOSITION COMPRENANT UN EXTRAIT VEGETAL A EFFET DECONTRACTANT DE LA PEAU.

⑤⑦ L'invention concerne une composition à base d'extrait végétal.

La composition comprend une quantité efficace d'un extrait de lotus bleu (*Nymphaea caerulea*), obtenu à partir des graines, de préférence par macération hydro-glycolique de graines pulvérisées.

Application au traitement ou à la prévention des signes du vieillissement cutané par effet décontractant.

FR 2 871 380 - A1



La présente invention concerne une nouvelle composition cosmétique et/ou dermatologique destinée à prévenir et traiter les signes du vieillissement cutané, et plus particulièrement une composition à base de lotus bleu à effet décontractant de la peau, capable d'agir efficacement contre les contractions musculaires faciales responsables des signes du vieillissement cutané et en particulier les rides d'expression.

La peau constitue un véritable organe comprenant plusieurs couches intégrées, allant de la couche superficielle, l'épiderme, jusqu'aux couches plus profondes, le derme et l'hypoderme, et chacune possède des propriétés spécifiques permettant à l'ensemble de réagir et de s'adapter aux conditions de son environnement.

L'épiderme, principalement composé de kératinocytes (90% des cellules épidermiques), de mélanocytes (2 à 3% des cellules épidermiques) et des cellules de Langerhans, a une épaisseur variable selon les différentes parties du corps. Etant donné qu'il constitue la couche externe de la peau, l'épiderme joue un rôle fondamental pour assurer la protection et le maintien d'une bonne trophicité. C'est pourquoi de nombreuses compositions ont été mises au point afin de le protéger et d'améliorer ses fonctions, et notamment de renforcer son élasticité et sa fermeté.

Le derme, plus épais, solide, riche en nerfs, en vaisseaux sanguins et en glandes sudoripares, se compose principalement de collagène, d'élastine et de protéoglycanes. Ces trois types de molécules sont synthétisés par les fibroblastes dermiques. Les fibres de collagène, qui représentent 70% du poids sec du derme, assurent la résistance mécanique et la texture de la peau, l'élastine est responsable de l'élasticité, et les protéoglycanes jouent un rôle majeur de structure et d'hydratation de la peau. D'autres cellules comme les macrophages et les leucocytes sont également présentes dans la couche du derme.

L'hypoderme, qui est la couche la plus profonde de la peau, contient les adipocytes qui produisent des lipides pour que le tissu sous-cutané fabrique une couche grasse protégeant les muscles, les os et les organes internes contre les chocs.

5 Le vieillissement de la peau peut être intrinsèque, ou extrinsèque c'est-à-dire provoqué par l'environnement.

L'un des premiers signes de vieillissement de la peau est une perte d'élasticité et la formation de rides et ridules, qui sont le résultat direct de la détérioration de la couche
10 du derme de soutien. L'apparition de marques pigmentaires, la diminution de l'épaisseur de la peau et son affaissement sont également des changements observés au cours du vieillissement.

De nombreux facteurs contribuent à accélérer la dégradation du collagène du derme, et en particulier l'exposition
15 au soleil, les radicaux libres, certains changements hormonaux associés à la vieillesse et le tabac.

Les premiers signes du vieillissement de la peau, tels que les rides et ridules, sont généralement provoqués par le stress et les changements biologiques et physiologiques,
20 accélérés par l'environnement extérieur. En fait, la capacité de la peau à remplacer le collagène endommagé diminue avec le temps, et des espaces et des irrégularités apparaissent dans le réseau du collagène. A l'échelle de la peau, le vieillissement provoque notamment une diminution des synthèses
25 protéiques (collagène, élastine), une diminution de la synthèse des protéoglycanes entre autres, ainsi qu'une élévation des métalloprotéinases de type MMP3.

Ce vieillissement de la peau s'accompagne de sensations de pesanteur, de pression durant le sommeil et aussi de
30 contraction des muscles faciaux, déterminant des rides d'expression, notamment autour des yeux et de la bouche, ou la modification de microrelief épidermique en raison notamment du stress. En particulier, les rides d'expression sont provoquées par de multiples contractions et crispations que subissent
35 quotidiennement les traits du visage sous l'action des muscles

sous-cutanés du visage qui se contractent et se relâchent successivement de manière incessante suivant le rythme des émotions.

Pour lutter contre ces signes du vieillissement, il est donc nécessaire de diminuer les forces de contraction des muscles faciaux en exerçant une inhibition de la libération des neuromédiateurs. Ce phénomène d'inhibition a pour conséquence de provoquer une décrispation des traits du visage et de réduire la profondeur des rides faciales.

On connaît certains traitements qui peuvent avoir pour effet de limiter ou d'inhiber les contractions musculaires faciales. Ainsi, on sait qu'il est possible d'effectuer un traitement esthétique par injection de toxine botulique au niveau des rides afin de figer les cellules en contact avec la toxine, donnant à la peau un aspect plus lisse. Certaines compositions cosmétiques contiennent des substances exerçant une action exfoliante comme les alpha-hydroxy acides, par exemple l'acide lactique et l'acide glycolique, facilitant l'élimination des cellules mortes et stimulant la formation de collagène et d'élastine. Le brevet US 5.925.348 décrit une composition cosmétique comprenant un extrait de graines de lotus sacré comme source de méthyl transférase destinée à lutter contre le vieillissement cutané. On connaît aussi des compositions à base d'acide rétinoïque ou de rétinol qui peuvent agir contre les signes du vieillissement cutané tels que la sécheresse, la perte d'élasticité de la peau et la formation de rides, ainsi que des crèmes décontractantes à base de magnésium ou de manganèse inhibant le flux de calcium dans les cellules, à l'origine de la contraction musculaire, afin de réduire les microcrispations de la peau et de ralentir l'apparition des rides d'expression.

Cependant, il existe toujours un besoin de pouvoir disposer de nouvelles compositions topiques alternatives permettant de lutter efficacement contre les effets du vieillissement cutané, et notamment des compositions topiques à

base d'extraits végétaux appropriés provenant plus particulièrement de plantes connues pour leurs propriétés favorables.

Suivant la présente invention, on a trouvé qu'il était possible d'agir efficacement contre les contractions musculaires faciales responsables des signes du vieillissement cutané et en particulier les rides d'expression, en utilisant des compositions topiques à base d'extraits de lotus bleu (*Nymphaea caerulea*).

La présente invention a donc pour objet une nouvelle composition cosmétique et/ou dermatologique à base de plantes, et plus particulièrement à base d'extrait de lotus bleu (*Nymphaea caerulea*) présentant des effets d'inhibition des contractions musculaires faciales incontrôlées à l'origine des rides d'expression.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un extrait de lotus bleu (*Nymphaea caerulea*) pour la préparation d'une composition topique destinée à lutter contre les signes du vieillissement cutané, et en particulier les rides d'expression provoquées par les contractions musculaires faciales incontrôlées.

La présente invention a encore pour objet un procédé cosmétique pour combattre les signes du vieillissement de la peau, et plus particulièrement les rides d'expression résultant des contractions musculaires faciales, consistant à appliquer sur les zones de la peau affectées une composition contenant une quantité efficace de la composition topique selon la présente invention.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un extrait de lotus bleu (*Nymphaea caerulea*) pour la préparation d'un médicament dermatologique pour la prévention et le traitement des contractions musculaires faciales incontrôlées.

Les compositions suivant la présente invention se distinguent en ce qu'elles comprennent un extrait de lotus bleu (*Nymphaea caerulea*) en une quantité efficace pour lutter contre les signes du vieillissement cutané, et plus particu-

lièrement les rides d'expressions, ainsi que des supports et excipients acceptables en dermatologie et en cosmétologie.

Le lotus bleu (*Nymphaea caerulea*) était déjà utilisé en Egypte antique pour son parfum suave, et sa racine était
5 consommée comme produit alimentaire. Les *Nymphaea*, et en particulier le lotus, ainsi que les nénuphars contiennent, dans toutes leurs parties, de la nymphéine et de la nupharine (qui sont des alcaloïdes) ainsi que d'autres composants mal définis.

10 Ainsi, les compositions topiques de l'invention peuvent être utilisées avantageusement en dermatologie et en cosmétologie pour le traitement ou la prévention des dommages liés au vieillissement de la peau, plus particulièrement pour prévenir ou réduire les rides d'expression résultant des contractions
15 musculaires faciales incontrôlées.

Les extraits végétaux de lotus bleu des compositions suivant la présente invention ont montré dans des tests in vitro des effets d'inhibition des neurotransmetteurs capables de générer les contractions musculaires réflexes, grâce à des
20 neuropeptides dont la modulation est liée à la production d'acétyl choline et d'adrénaline. Les tests ont été réalisés sur une culture de ganglion dorsal de fœtus de souris.

Les résultats, détaillés ci-après, ont mis en évidence, selon les concentrations utilisées :

- 25
- une diminution jusqu'à 41% de la substance P,
 - une diminution jusqu'à 36% de la CGRP (Calcitonine Gene Related Protein),
 - une diminution jusqu'à 37% de l'acétyl choline,
 - une diminution jusqu'à 30% de l'affinité du récepteur
30 de la substance P au niveau des kératinocytes humaines en culture,
 - une inhibition de -24% de la réception de l'adrénaline sur le récepteur adrénergique.

Ces résultats ont été obtenus avec un extrait de lotus
35 bleu (*Nymphaea caerulea*), et confirment que, en application

topique, un extrait de lotus bleu, ou une composition le contenant, présente un effet de relaxation musculaire.

Les essais effectués par la demanderesse ont montré que, parmi les diverses parties de la plante, il est préférable
5 d'utiliser les graines mures, dont l'approvisionnement et la conservation ne soulèvent généralement pas de difficulté technique.

Suivant une forme avantageuse de réalisation, l'extrait utilisable dans l'invention est obtenu par macération hydro-
10 alcoolique ou hydroglycolique de graines pulvérisées, et de préférence dans un mélange propylène glycol / eau dans un rapport (v/v) voisin de 50/50.

L'extrait se présente sous la forme d'un liquide brun - noir, et se caractérise par :

15	- matières sèches	2 à 2,5%
	- densité	1,019
	- indice de réfraction	1,393
	- pH	6,2 à 6,6

Les tests ont été effectués en utilisant des échantillons
20 dosés respectivement à 0,1%, 0,5% et 1% d'extrait.

Les résultats sont explicités à l'Exemple 4 ci-après.

L'extrait de lotus bleu suivant la présente invention peut être utilisé seul ou en association avec d'autres principes actifs compatibles c'est-à-dire non susceptibles de
25 réagir les uns sur les autres ou de masquer ou limiter leurs effets respectifs.

Suivant une forme avantageuse de réalisation, l'extrait de lotus bleu est complété par des principes actifs ou ingrédients auxiliaires choisis pour leurs propriétés complé-
30 mentaires, afin de renforcer l'effet d'inhibition des contractions musculaires faciales ou compléter les effets anti-âge de la composition. Ainsi il est particulièrement avantageux de le combiner avec des quantités appropriées de protéines de graines d'amarante (*Amarantus caudatus*) ou des globulines de
35 pois afin d'obtenir un effet tenseur de la peau, d'huile de

Calophyllum afin de renforcer l'effet anti-rides, d'Imperata cylindrica, par exemple MOIST 24® de la société Sederma, afin de favoriser l'hydratation de la peau par modification de la pression osmotique, de l'huile d'Echium pour son effet anti-
5 inflammatoire, ou encore un palmitoyl pentapeptide-3 tel que le Matrixyl® ou des dérivés tels que le palmitoyl GHK (possédant la chaîne Glycyl-Histidyl-Lysine) et le palmitoyl GQPR (Glycyl-Glutamyl-Prolyl-Arginine) ou le palmitoyl VGVAPG (Valyl-Glycyl-Valyl-Alanyl-Prolyl-Glycine) associé à un céra-
10 mide-2, ainsi que d'une manière générale toute association avec un céramide.

Les compositions selon la présente invention peuvent se présenter sous toutes les formes galéniques usuelles adaptées à une application topique.

15 Elles peuvent comprendre entre 0,2% et 10% en poids d'extrait de lotus bleu, tel que défini ci-dessus, par rapport au poids total de la composition, et de préférence entre 0,5 et 5% en poids. Le choix de la dose dans la composition peut être fait en fonction de l'utilisation envisagée. Pour un
20 traitement anti-rides prolongé, on utilise de préférence des doses plus faibles, de l'ordre de 0,5 à 1% tandis qu'un traitement ponctuel peut nécessiter des doses plus élevées.

Les compositions conformes à la présente invention peuvent être présentées sous les formes classiquement
25 utilisées pour une application topique, c'est-à-dire sous forme de gel, lotion, émulsion (en particulier crème ou lait), masque ou pommade, contenant des excipients et supports usuels compatibles et pharmaceutiquement acceptables. Elles peuvent aussi se présenter sous forme de lingettes imbibées d'une
30 solution contenant l'extrait de lotus suivant l'invention. Ces formes d'administration par voie topique sont préparées par les techniques connues, et par exemple, dans le cas d'une crème, par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse pour obtenir une émulsion huile dans eau, ou
35 inversement pour préparer une émulsion eau dans huile. Dans le

cas de crèmes, on préfère utiliser des émulsions à structure lamellaire contenant peu de produits éthoxylés ou n'en contenant pas du tout.

Les compositions topiques selon l'invention peuvent par exemple comprendre des excipients appropriés pour une administration topique externe, en particulier des excipients acceptables sur le plan dermatologique et cosmétologique. Ces excipients appropriés pour la formulation sont bien connus de l'homme du métier et comprennent en particulier les épaississants tels que les gommes naturelles et les polymères de synthèse ; les émollients et les tensioactifs tels que l'octanoate de cétéaryle, le myristate d'isopropyle, l'isononanoate de cétéaryle, la diméthicone, la cyclométhicone, le 3-diisostéarate de polyglycéryle, le polyisobutène hydrogéné, l'alcool cétylique, le palmitate cétylique, le phosphate cétylique ; les émulsifiants ; les conservateurs tels que le phénoxyéthanol, le parahydroxybenzoate de méthyle (méthylparaben), le parahydroxybenzoate d'éthyle (éthylparaben), le parahydroxybenzoate de propyle (propylparaben) et le Phenonip® associant du phénoxyéthanol et des parahydroxybenzoates de méthyle, éthyle, butyle et isobutyle ; les colorants ; les parfums ; etc. D'autres ingrédients peuvent être utilisés dans les compositions : les agents hydratants tels que le propylène glycol, la glycérine, le butylène glycol et également les vitamines antioxydantes telles que la vitamine E, par exemple l'acétate de tocophérol ou le tocotriénol, la vitamine C, les polyphénols naturels. On peut également ajouter à la composition des agents conditionneurs de la peau tels que le nylon.

Les exemples suivants illustrent plus en détail l'invention sans en limiter la portée. Dans tous les exemples de compositions qui suivent, les parties sont exprimées en poids, sauf indication contraire.

Exemple 1

Suivant les techniques classiques, on prépare une lotion décrispante des muscles faciaux ayant la composition pondérale suivante.

5	Extrait de graines de lotus bleu	3,0
	Glycérine	5,0
	2-méthyl 1,3-propane diol	5,0
	Phenonip®	0,5
	Panthénol	0,2
10	Allantoïne	0,1
	PEG 40 huile de ricin	1,5
	Dipropylène glycol	1,0
	Parfum	0,5
	Eau déminéralisée	qsp 100,0

15 L'extrait de graines de lotus bleu utilisé dans la composition ci-dessus est un extrait hydro-glycolique obtenu par macération de graines pulvérisées dans un mélange propylène glycol / eau 50/50 (v/v) ayant les caractéristiques indiquées plus haut.

20 La lotion ayant la composition indiquée ci-dessus est utilisée en application sur le visage, une à deux fois par jour.

Exemple 2

25 Suivant les techniques classiques, on prépare une crème décrispante des muscles faciaux ayant la composition pondérale suivante.

	Extrait de graines de lotus bleu	5,0
	Glycérine	5,0
	Phénoxyéthanol	0,5
30	EDTA tétrasodique	0,05
	Butylène glycol	1,0
	Carbomer	0,2
	Tocophérol libre	0,7
	Alcool béhénique auto-émulsionnable	5,0

	Octyl dodécanol	4,0
	Palmitate de cétyle	2,0
	Huile de rosier Muscat	1,0
	Trométamine	0,2
5	Matrixyl®	3,0
	Conservateurs	0,3
	Parfum	0,2
	Eau déminéralisée	qsp 100,0
10	L'extrait de graines de lotus bleu utilisé dans la composition ci-dessus est identique à celui de l'exemple 1.	

Exemple 3

On prépare une lingette décrispante des muscles faciaux imbibée d'une lotion ayant la composition pondérale suivante.

	Extrait de graines de lotus bleu	5,0
15	Glycérine	5,0
	PEG 400	4,0
	Sorbitol à 70%	2,0
	Butylène glycol	4,0
	Phenonip®	0,5
20	Parfum hydrosoluble	1,0
	Eau déminéralisée	qsp 100,0

Exemple 4

L'étude des effets de l'extrait de lotus bleu suivant la présente invention a été faite sur des ganglions de la racine dorsale de rats, comme indiqué plus haut.

Protocole expérimental

Les cultures de ganglions de la racine dorsale ont été établies à partir de prélèvements effectués sur des fœtus de rat après 14 jours de gestation. Les ganglions qui ont été
30 prélevés le plus stérilement possible, sont conservés dans un tampon sous antibiotique. Les ganglions ont été cultivés dans du milieu DMEM contenant du sérum de veau fœtal pendant 17

jours. Pendant cette durée de culture, les ganglions ont émis des prolongements de dendrites qui sécrètent les neuro-peptides.

Après 17 jours de culture, le milieu a été éliminé et du milieu frais a été ajouté, soit seul, soit additionné de différentes concentrations de l'extrait suivant l'invention. Les boîtes ont été mises à incuber pendant 24 heures à 37°C dans une étuve à 95% d'oxygène et 5% de CO₂.

A la fin de la période d'incubation (24 heures), le milieu de culture a été récupéré. Les neuropeptides (substance P, CGRP, adrénaline et acétylcholine) ont été dosés grâce à un anticorps monoclonal spécifique.

Dosage de la substance P

Les cultures primaires de cellules nerveuses sont établies à partir de prélèvements effectués au niveau du ganglion dorsal de fœtus de souris comme indiqué ci-dessus. Les cellules sont incubées en présence ou en l'absence du produit à l'étude. A la fin du temps d'incubation, le milieu est prélevé, puis la substance P est dosée par réaction immunologique avec des anticorps monoclonaux spécifiques à ce neuropeptide.

L'essai est conduit en triplicate après 24 heures de traitement.

- lot 1 : témoin négatif
- lot 2 : témoin positif (induction par la Capsaïcine)
- lot 3 : traité par le produit Extrait de Lotus Bleu (3 concentrations)

Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

	Substance P (pg/ml)	Pourcentage
Témoin	42,8 ± 7,4	-
Témoin positif Capsaïcine (25µM)	64,5 ± 11,4	+51
Extrait de lotus bleu (0,1%)	36,8 ± 12**	-14
Extrait de lotus bleu (0,5%)	31,8 ± 7,8*	-25

Extrait de lotus bleu (1%)	25,2 ± 8,2*	-41
----------------------------	-------------	-----

* Significativement différent par rapport au témoin $p \leq 0,05$ (Wilcoxon Rank Sum Test).

** Significativement différent par rapport au témoin $p \leq 0,01$ (Wilcoxon Rank Sum Test).

5 Dosage de la CGRP

Les cultures primaires de cellules nerveuses sont obtenues de la même façon que pour la substance P et le dosage de la CGRP est fait par réaction immunologique avec des anticorps monoclonaux spécifiques de la CGRP

10 L'essai est conduit en triplicate après 24 heures de traitement.

- lot 1 : témoin négatif
- lot 2 : témoin positif (induction par la Capsaïcine)
- lot 3 : traité par le produit Extrait de Lotus Bleu (3

15 concentrations)

Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

	CGRP (pg/ml)	Pourcentage
Témoin	290 ± 15,8	-
Témoin positif Capsaïcine (25µM)	345 ± 9,7	+19
Extrait de lotus bleu (0,1%)	215 ± 15,8*	-25
Extrait de lotus bleu (0,5%)	202 ± 22*	-30
Extrait de lotus bleu (1%)	185 ± 34*	-36

* Significativement différent par rapport au témoin $p \leq 0,01$ (Wilcoxon Rank Sum Test).

Dosage de l'acétylcholine

20 Les cellules nerveuses sontensemencées comme précédemment. Les cellules sont incubées en présence ou en l'absence de l'extrait de lotus bleu suivant l'invention. A la fin du temps d'incubation, le milieu est prélevé, puis l'acétylcholine est dosée par réaction immunologique avec des

25 anticorps monoclonaux spécifiques.

L'essai est conduit en triplicate après 24 heures de traitements.

- lot 1 : témoin négatif
- lot 2-4 : traité par le produit Extrait de Lotus (3 concentrations)

Le dosage de l'acétylcholine est déterminé à l'aide du kit Amplex™ Red (Acétylcholine/Acetylcholinesterase) qui fournit une méthode ultrasensible. Les utilisations potentielles de ce kit incluent le criblage des inhibiteurs d'acétylcholine estérase et la mesure de la libération de l'acétylcholine des synaptosomes.

Le dosage de l'acétylcholine est évalué à l'aide d'un lecteur de microplaque en utilisant une excitation à 560 nm et une détection de la fluorescence à 590 nm.

Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

	Acétylcholine (μ M)	Pourcentage
Témoin	23,5 $\pm$ 2,8	-
Extrait de lotus bleu (0,1%)	20,8 $\pm$ 0,7	-11 (ns)
Extrait de lotus bleu (0,5%)	16,7 $\pm$ 2,5*	-29
Extrait de lotus bleu (1%)	14,8 $\pm$ 3,2*	-37

* Significativement différent par rapport au témoin $p \leq 0,01$ (Wilcoxon Rank Sum Test).

Evaluation de l'affinité vis-à-vis du récepteur de la substance P au niveau des kératinocytes humains en culture

Les kératinocytes sont incubés en présence ou en l'absence du produit à l'étude ou de ligand non radioactif (Sar9, Met(O2)11)-SP, avec la 3H (Sar9, Met(O2)11)-SP.

Après incubation, la radioactivité est dosée pour déterminer le potentiel du produit à l'étude à rentrer en compétition avec la substance P.

L'essai est conduit en triplicate après 24 heures de traitement.

- lot 1 : témoin négatif

- lot 2-4 : traité par le produit Extrait de Lotus Bleu (3 concentrations)

Cette étude est basée sur la compétition de l'Extrait de Lotus Bleu avec la substance P marquée. Ce résultat se traduit par une diminution de la fixation spécifique de la substance P marquée sur son récepteur quand le produit rentre en compétition.

Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

	Cpm	Pourcentage
Témoin	1580 ± 124	-
Extrait de lotus bleu (0,1%)	1205 ± 32*	-23
Extrait de lotus bleu (0,5%)	1212 ± 102*	-23
Extrait de lotus bleu (1%)	1113 ± 135*	-30

* Significativement différent par rapport au témoin $p \leq 0,01$ (Wilcoxon Rank Sum Test).

Ainsi, les résultats exposés ci-dessus, montrent que le produit testé :

- inhibe la libération de la substance P, aux concentrations 0.5% et 1% respectivement de 25% et 41% par rapport au témoin non traité.
- inhibe la libération de CGRP, aux concentrations 0.5% et 1% respectivement de 30% et 36% par rapport au témoin non traité.
- inhibe la libération de la substance P sur son récepteur aux concentrations 0.1% ; 0,5% et 1% respectivement de 23% et 30%.
- inhibe la libération de l'Acétylcholine, aux concentrations 0.5% et 1% respectivement de 29% et 37% par rapport au témoin non traité.

Ces résultats montrent que le produit testé peut éliminer l'activité de la substance P et la CGRP, en inhibant leur libération et en entrant en compétition avec la substance P avec de son récepteur. Cette activité au niveau des neuropeptides et plus précisément l'inhibition de leur libération peut être due à l'inhibition de l'Acétylcholine.

En effet il a été montré que l'acétylcholine peut activer les fibres C nociceptives avec, pour conséquence, une augmentation de la concentration du CGRP et de la substance P.

Dosage de l'adrénaline

5 Les résultats obtenus après traitement des mêmes cellules que dans les essais ci-dessus par l'extrait de lotus bleu de l'invention montrent une compétition de l'extrait avec l'adrénaline vis-à-vis du récepteur adrénergique. Cette fixation sur le récepteur adrénergique peut réguler le
10 mécanisme de la contractilité via la calmoduline. L'affinité du complexe calcium - calmoduline pour l'ATPase de la myosine dépend du degré de phosphorylation d'une kinase des chaînes légères de la myosine. Lorsque celle-ci est phosphorylée sous l'action de la protéine kinase A, l'affinité du complexe
15 calcium - calmoduline pour l'ATPase de la myosine diminue, aboutissant à une relaxation des fibres musculaires.

Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

	[¹²⁵ I]-Adrénaline (Cpm)	Pourcentage
Témoin	3850 ± 270	-
Extrait de lotus bleu (0,1%)	3415 ± 211	-11
Extrait de lotus bleu (0,5%)	3218 ± 198*	-16
Extrait de lotus bleu (1%)	2915 ± 153*	-24

* Significativement différent par rapport au témoin $p \leq 0,05$ (Wilcoxon Rank Sum Test).

20 Ces résultats mettent en évidence l'effet relaxant des fibres musculaires exercé par l'extrait de lotus bleu de l'invention.

REVENDECATIONS

1. Composition cosmétique et/ou dermatologique pour application topique, destinée à lutter contre les signes du vieillissement cutané, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité efficace d'un extrait de lotus bleu (*Nymphaea caerulea*).
5

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrait est obtenu à partir de graines de lotus bleu (*Nymphaea caerulea*).

3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'extrait est obtenu par macération hydro-glycolique de graines pulvérisées.
10

4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'extrait est obtenu par macération de graines pulvérisées dans un mélange propylène glycol / eau.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'extrait de lotus bleu (*Nymphaea caerulea*) est un liquide brun - noir se caractérisant par :
15

- matières sèches	2 à 2,5%
- densité	1,019
- indice de réfraction	1,393
- pH	6,2 à 6,6

20

6. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend entre 0,2 et 10% en poids d'extrait de lotus bleu.
25

7. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre des protéines de graines d'amarante (*Amarantus caudatus*) ou des globulines de pois, de l'huile de *Calophyllum*, de l'*Imperata cylindrica*, de l'huile d'*Echium*, un palmitoyl pentapeptide-3 ou des dérivés tels que le palmitoyl GHK et le palmitoyl GQPR ou le palmitoyl VGVAPG associé à un céramide-2, ainsi qu'un céramide.
30

8. Utilisation d'un extrait de lotus bleu (*Nymphaea caerulea*) pour la préparation d'une composition topique destinée à lutter contre les signes du vieillissement cutané.

5 9. Procédé cosmétique pour combattre les signes du vieillissement de la peau, consistant à appliquer sur les zones de la peau affectées une composition contenant une quantité efficace de la composition topique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10 10. Utilisation d'un extrait de lotus bleu (*Nymphaea caerulea*) pour la préparation d'un médicament dermatologique pour la prévention et le traitement des contractions musculaires faciales incontrôlées.



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 651147
FR 0406240

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 6 468 564 B1 (BABCOCK THOMAS ET AL) 22 octobre 2002 (2002-10-22)	1-6,8,9	A61K35/78 A61K35/60 A61K7/48 A61P19/00
Y	* colonne 4, ligne 13 - ligne 62 *	7	

X	US 2002/098253 A1 (RILEY PATRICIA A) 25 juillet 2002 (2002-07-25)	1-6	
Y	* alinéas [0052] - [0054] *	1-9	

Y	US 5 925 348 A (BABCOCK THOMAS ET AL) 20 juillet 1999 (1999-07-20)	1-9	
	* colonne 4, ligne 14 - ligne 52 *		

Y	US 6 296 859 B1 (STOLTZ CORINNE) 2 octobre 2001 (2001-10-02)	7	
	* colonne 3, ligne 32 - ligne 40 *		

Y	FR 2 805 161 A (SEDERMA SA) 24 août 2001 (2001-08-24)	7	
	* page 3 *		

Y	US 5 985 300 A (CROTTY BRIAN ANDREW ET AL) 16 novembre 1999 (1999-11-16)	7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
	* colonne 2, ligne 29 *		A61K

A	FOSSON T ET AL: "Flavonoids from blue flowers of Nymphaea caerulea" PHYTOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 51, no. 8, août 1999 (1999-08), pages 1133-1137, XP004290945 ISSN: 0031-9422	1-10	
	* le document en entier *		

A	WO 2004/017924 A (JUVENTUS BIOSCIENCE LLC ; ZHU ALEX (US)) 4 mars 2004 (2004-03-04)	10	
	* page 17 *		

Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 janvier 2005		Bochelen, D	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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 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			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0406240 FA 651147

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 17-01-2005

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6468564 B1	22-10-2002	US 2002098253 A1	25-07-2002
US 2002098253 A1	25-07-2002	US 6468564 B1	22-10-2002
		US 5925348 A	20-07-1999
		US 5948443 A	07-09-1999
US 5925348 A	20-07-1999	US 2002098253 A1	25-07-2002
		US 5948443 A	07-09-1999
US 6296859 B1	02-10-2001	FR 2775595 A1	10-09-1999
		DE 69907163 D1	28-05-2003
		DE 69907163 T2	05-02-2004
		EP 1061895 A1	27-12-2000
		WO 9945899 A1	16-09-1999
		JP 2002506016 T	26-02-2002
FR 2805161 A	24-08-2001	FR 2805161 A1	24-08-2001
		AU 3190201 A	03-09-2001
		WO 0162218 A1	30-08-2001
US 5985300 A	16-11-1999	US 5935596 A	10-08-1999
		AT 229318 T	15-12-2002
		AT 222091 T	15-08-2002
		AT 240714 T	15-06-2003
		AU 725041 B2	05-10-2000
		AU 6729298 A	20-10-1998
		AU 731691 B2	05-04-2001
		AU 6830898 A	20-10-1998
		AU 7041798 A	20-10-1998
		BR 9808271 A	16-05-2000
		BR 9808272 A	16-05-2000
		BR 9808397 A	23-05-2000
		CA 2282442 A1	01-10-1998
		CA 2283808 A1	01-10-1998
		CA 2284659 A1	01-10-1998
		CN 1255847 T	07-06-2000
		CN 1257420 T	21-06-2000
		CN 1258216 T	28-06-2000
		CZ 9903328 A3	16-02-2000
		CZ 9903332 A3	12-04-2000
		DE 69807197 D1	19-09-2002
		DE 69807197 T2	05-12-2002
		DE 69810090 D1	23-01-2003
		DE 69810090 T2	02-10-2003
		DE 69814835 D1	26-06-2003
		DE 69814835 T2	11-03-2004

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0406240 FA 651147**

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 17-01-2005

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5985300 A		EA 1889 B1	22-10-2001
		EA 2132 B1	24-12-2001
		WO 9842302 A1	01-10-1998
		WO 9842303 A1	01-10-1998
		WO 9842304 A1	01-10-1998
		EP 0971684 A1	19-01-2000
		EP 0969806 A1	12-01-2000
		EP 0969808 A1	12-01-2000
		ES 2189148 T3	01-07-2003
		ES 2182291 T3	01-03-2003
		ES 2199439 T3	16-02-2004
		HU 0001934 A2	28-12-2000
		ID 24270 A	13-07-2000
		ID 23787 A	11-05-2000
		ID 23437 A	20-04-2000
		IN 188778 A1	09-11-2002
		JP 2001517235 T	02-10-2001
		JP 2002510285 T	02-04-2002
		JP 2001518113 T	09-10-2001
		PL 335763 A1	22-05-2000
		PL 335764 A1	22-05-2000
		PL 335816 A1	22-05-2000
		TW 483760 B	21-04-2002
		US 5993838 A	30-11-1999

WO 2004017924 A	04-03-2004	US 2004037895 A1	26-02-2004
		WO 2004017924 A2	04-03-2004

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82