



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 33969 B1** (51) Cl. internationale : **A61Q 19/00; A61K 8/97**
- (43) Date de publication : **01.02.2013**

-
- (21) N° Dépôt : **34032**
- (22) Date de Dépôt : **15.07.2011**
- (71) Demandeur(s) : **UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH, Université sidi Mohamed ben abdellah, INPMA, commune Mezraoua Taounate (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **Dallila BOUSTA ; jamal BENJILALI ; Abdeslam ENNABILI ; El houssaine HARKI**
- (74) Mandataire : **DALILA BOUSTA**

-
- (54) Titre : **Formulation d'une crème anti-inflammatoire/anti-oedémateuse naturelle topique à base d'extrait hydro-alcoolique d'agave americana L. en provenance du Maroc**
- (57) Abrégé : LA PRÉSENTE INVENTION CONCERNE LA FORMULATION D'UNE CRÈME ANTI-INFLAMMATOIRE NATURELLE À BASE D'EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE DE L'AGAVE (AGAVE AMERICANA L.) ORIGINAIRE DU MAROC. CE PHYTOMÉDICAMENT EST OBTENU PAR EXTRACTION AU SOXHLET DE CETTE PLANTE SÉLECTIONNÉE SOIGNEUSEMENT À LA BASE D'ENQUÊTES ETHNOPHARMACOLOGIQUES DÉCRITES ANTÉRIEUREMENT DANS LE LIVRE DE BELLAKHDAR [1]. LA CRÈME ÉLABORÉE EST DOSÉE À 15% DE L'EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE DE L'AGAVE. LE POUVOIR ANTI-INFLAMMATOIRE DE CETTE ESPÈCE EST ÉVALUÉ PAR APPLICATION LOCALE SUR L'APONÉVROSE PLANTAIRE DES RATS WISTAR. NOUS AVONS NOTÉ DES POURCENTAGES D'INHIBITION DE L'INFLAMMATION ÉQUIVALENTS À CEUX DU DICLOFÉNAC 1% À 4,5 ET 6 HEURES APRÈS L'INDUCTION DE L'INFLAMMATION PAR LA CARRAGÉNINE À 0,5 %, AVEC UN POUVOIR ANTI-INFLAMMATOIRE PRONONCÉ RESPECTIVEMENT DE L'ORDRE DE 71,69%, 65,04% ET 56,52%, EN COMPARAISON À CELUI DU DICLOFÉNAC, QUI EST DE L'ORDRE DE 74,812%, 68,69% ET 0% RESPECTIVEMENT À 4,5 ET 6 HEURES APRÈS L'INDUCTION DE L'INFLAMMATION. CETTE CRÈME EST UN PUISSANT ANTI-INFLAMMATOIRE NATUREL, ÉLABORÉ À PARTIR D'UNE PLANTE ORIGINAIRE DU MAROC, À USAGE TRADITIONNEL RECONNU. L'ACTION ANTI-INFLAMMATOIRE DE L'AGAVE EST TRÈS FORTE; ELLE EST COMPARABLE À CELLE DU DICLOFÉNAC

AVEC UNE UNE RAPIDITÉ D'ACTION ANTI-OEDÉMATEUSE ET UN MEILLEUR EFFET CONTINU DANS LE TEMPS.

01 FEV 2013

**Formulation d'une crème anti-inflammatoire/
anti-œdémateuse naturelle topique à base
d'extrait hydroalcoolique d'*Agave americana* L.
originaire du Maroc.**

Dalila BOUSTA, Jamal BENJILALI, Abdeslam ENNABILI, EL Houssaine HARKI

ABREGÉ

La présente invention concerne la formulation **d'une crème anti-inflammatoire naturelle** à base d'extrait **hydroalcoolique** de **l'agave** (*Agave americana* L.) originaire du Maroc. Ce phytomédicament est obtenu par extraction au soxhlet de cette plante sélectionnée soigneusement à la base d'enquêtes ethnopharmacologiques décrites antérieurement dans le livre de Bellakhdar [1].

La crème élaborée est dosée à 15% de l'extrait hydroalcoolique de l'agave. Le pouvoir anti-inflammatoire de cette espèce est évalué par application **locale** sur l'aponévrose plantaire des rats Wistar. Nous avons noté des pourcentages d'inhibition de l'inflammation équivalents à ceux du Diclofénac 1% à 4, 5 et 6 heures après l'induction de l'inflammation par la carragénine à 0.5 %, avec un pouvoir anti-inflammatoire prononcé respectivement de l'ordre de 71,69 %, 65,04 % et 56,52 %, en comparaison à celui du Diclofénac, qui est de l'ordre de 74,812%, 68,69% et 0% respectivement à 4, 5 et 6 heures après l'induction de l'inflammation.

Cette crème **est un puissant anti-inflammatoire naturel**, élaboré à partir d'une plante originaire du Maroc, à usage traditionnel reconnu. L'action anti-inflammatoire de l'agave est très forte; elle est comparable à celle du **diclofénac** avec une rapidité d'action anti-œdémateuse et un meilleur effet continu dans le temps.

DESCRIPTION

- Contexte

Cette invention concerne l'élaboration d'une crème anti-inflammatoire topique cutanée à base d'*Agave americana*, sélectionnée pour son usage traditionnel dans l'inflammation à partir d'enquêtes ethnopharmacologiques décrites antérieurement [1].

Cette espèce est récoltée dans le jardin expérimental de l'Institut National des Plantes

5 Médicinales et Aromatiques, province de Taounate.

Il faut signaler que dans la majorité des cas, le traitement de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires, des médicaments destinés à traiter une réaction inflammatoire, et les maladies qui en résultent, telles les manifestations rhumatismales, les fractures et les lésions génitales et urinaires.

10 Comme c'est le cas pour tous les médicaments, ils peuvent provoquer des effets secondaires et peuvent être à l'origine d'intoxications, notamment par surdosage ou par interaction avec d'autres médicaments, ainsi que d'allergies. Il existe deux types : les anti-inflammatoires stéroïdiens appelés aussi AIS, et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

15 Les AIS comme le cortisol ont une action anti-œdémateuse et surtout anti-inflammatoire générale en empêchant la sortie hors des vaisseaux des cellules chargées de déclencher l'inflammation et d'en diminuer l'afflux. Ils sont très puissants, utilisés de façon très large en rhumatologie. Les AINS sont des médicaments aux propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires « non stéroïdien », utilisés pour les distinguer des

20 glucocorticoïdes (parmi un large éventail d'effets) ayant une semblable action anti-inflammatoire ; les deux plus connus sont l'aspirine et l'ibuprofène. D'une manière générale, l'utilisation de ces médicaments de synthèse entraîne dans l'organisme humain des effets secondaires incontrôlables (complications digestives, risque infectieux, manifestations neuropsychiques, complications oculaires, complications

25 tendineuses, cancer, etc.) ; d'où l'objet de notre présente invention, ayant pour finalité de développer un anti-inflammatoire naturel, dépourvu de conservateurs et autre adjonction chimique qui pourraient être nuisibles à la santé.

La présente invention se rapporte au domaine de la santé et particulièrement à celui des anti-inflammatoires dermiques. Elle apporte une originalité à l'existant en matière de
30 l'inflammation par l'élaboration d'un anti-inflammatoire naturel topique avec une bonne pénétration et une meilleure efficacité, en comparaison à celles du diclofénac 1%.

- **Etat de la technique antérieure**

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait hydroalcoolique de l'*Agave americana* n'a jamais été étudiée antérieurement. Les investigations toxico-pharmacologiques au stade
35 préclinique, en général, et anti-inflammatoire en particulier de l'extrait hydroalcoolique de l'espèce sélectionnée dans cette invention n'ont fait l'objet d'aucun travail scientifique. Néanmoins, cette espèce a été démontrée active pour d'autres effets biologiques.

En médecine traditionnelle, l'agave est utilisée dans le traitement de la gale, des tumeurs, de la syphilis et de la dysenterie, et comme insecticide. Il est également une
40 source de fibres et de saponosides et de sapogénines stéroïdiens [1].

L'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de l'*Agave americana* sur la muqueuse gastrique du rat a été démontré [3]. En outre, les génines (sapogénines stéroïdiques totaux, hécogénine et tigogénine) dans l'extrait aqueux exercent un effet principalement anti-œdémateux [2]. D'autres études ont été réalisées sur le pouvoir antioxydant en
45 utilisant le test DPPH des polyphénols totaux et des flavonoïdes de l'*Agave americana* [3]. Des travaux ont démontré aussi que l'exposition à la sève de l'*Agave americana* provoque des dermatites de contact [4 et 5]. Deux nouveaux glycosides Spirostanol nommés « Agamenoside A et B », ont été isolés à partir des feuilles fermentées de l'*Agave americana* [6].

50 **Description détaillée de l'invention**

L'activité anti-inflammatoire de l'agave, étudiée dans la présente invention, concerne des investigations toxicologiques et pharmacologiques *in vivo* au stade préclinique.

D'autres évaluations d'ordre phytochimique et spectrophotométrique de l'extrait sec de l'agave ont été entreprises. Enfin, une élaboration de crème à 15% de l'extrait hydroalcoolique a été réalisée.

- Design expérimental

Exemple 1 : Récolte et identification de l'*Agave americana* L.:

L'agave a été récoltée le mois de décembre 2010 dans le jardin expérimental de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques, identifiée et herborisée à l'herbier dudit Institut (exsiccata n°INP222).

Exemple 2 : Séchage, broyage et extraction hydroalcoolique de plante d'*Agave americana*

L'agave est ensuite séchée à 40°C dans l'étuve pendant 48 heures ; elle a été broyée et réduite en poudre. La poudre est délipidée au Soxhlet pendant 15 heures avec l'Hexane. Ensuite, l'extrait est obtenu avec de l'éthanol à 70% pendant 48 heures. L'extrait a été filtré avec un papier filtre Whatman N°1. Ensuite, le filtrat a subi une rota-évaporation (BÜCHI Rotavapor R-205), puis récupéré avec un rendement de 32 %.

Exemple 3 : Criblage phytochimique de l'extrait sec

Ces essais consistent à mettre en évidence la présence d'un certain nombre de groupes chimiques de l'extrait sec de l'agave par le biais des techniques décrites par [8, 9, 10, 11, 12]. Les réactifs de caractérisation utilisés nous ont permis de mettre en évidence les groupes chimiques suivants : les flavonoïdes (réaction à la cyanidine), tanins (test au chlorure ferrique), coumarines (test à l'ammoniac), anthraquinones et anthocyanes (test à l'hydroxyde de potassium), saponines (indice de mousse), sapogénines stéroïdiques (test à l'acide sulfurique), glycosides cardiaques (test à l'acide sulfurique), quinones libres (test à l'hydroxyde de sodium), Mucilages (test à l'alcool absolu), oses et holosides (test à l'acide sulfurique et au thymol).

Nous avons noté que le macérât contient un certain nombre de familles chimiques tels
 80 les flavonoïdes, les tanins, les mucilages, les anthraquinones, les coumarines, les oses et
 les holosides, connus généralement par leur effet anti-inflammatoire (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Criblage phytochimique de l'extrait de l'Agave americana L.
 (+) : présence, (-) : absence.

Constituants chimiques	Extrait
Flavonoïdes	+
Saponosides	+
Tannins	-
Anthraquinones libres	-
Sapogénines stéroïdiques	+
Glycosides cardiaques	+
Mucilages	+
Oses et holosides	+

**Exemple 4 : Dosage spectrophotométrique des flavonoïdes, composés
 connus par leur pouvoir anti-inflammatoire :**

85

Nous avons également évalué le taux des flavonoïdes dans l'extrait hydroalcoolique de
 l'agave. Dans ce sens, nous avons noté un taux qui est de l'ordre de **0,55 mg EQ/g E.**
 (Figure 1)

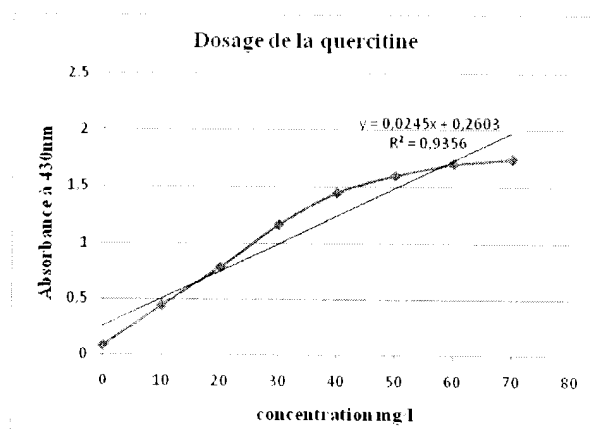
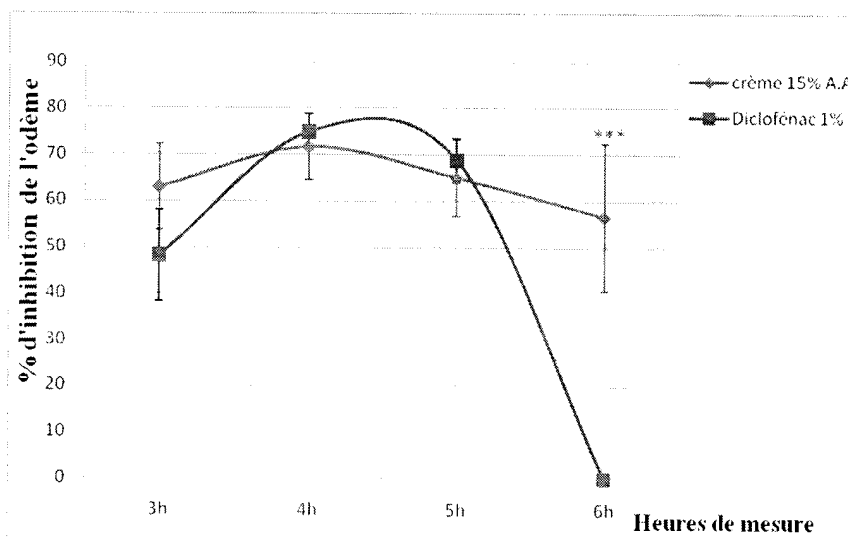


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de la quercétine en mg/l, un flavonoïde de type flavanol.

90 **Exemple 5 : Formulation de la crème et évaluation anti-inflammatoire à usage topique :**

Les animaux ont été randomisés en groupes témoins et traités, et divisés en 3 groupes de 11 animaux chacun. Les animaux du groupe N°1 ont été traités avec une solution saline normale (0,9% de NaCl). Les animaux du groupe N°2 ont été traités avec l'extrait hydroalcoolique de l'agave dosé à 15 %. L'application du Diclofénac à 1% a été
 95 réalisée sur les animaux du groupe N°3.

La crème exerce un effet anti-inflammatoire/anti-œdémateux important de l'ordre de **71,69%**, 4 heures après l'induction de l'inflammation par la carragénine à 0.5 % (Figure 2). En outre, la crème représente le meilleur pourcentage d'inhibition de
 100 l'inflammation, **56,52%** contre **0%** du Diclofénac, particulièrement **6 heures** après l'induction de l'œdème. Dans ce sens, la crème élaborée démontre bien une meilleure efficacité continue dans le temps ; ceci minimisera certainement le nombre d'applications par jour.



105 **Figure 2 : Pouvoir anti-inflammatoire de la crème par rapport à celui du Diclofénac en fonction du temps, N=11. ***: p<0.001. A.A: *Agave americana* L.**

Exemple 6 : Contrôles toxicologiques de l'application unique et réitérée de la crème d'agave.

Cette invention ne montre aucun effet indésirable après un traitement unique et réitéré à la crème pendant 7 jours (Tableau 1, Figure 3).

110 Les paramètres étudiés sont :

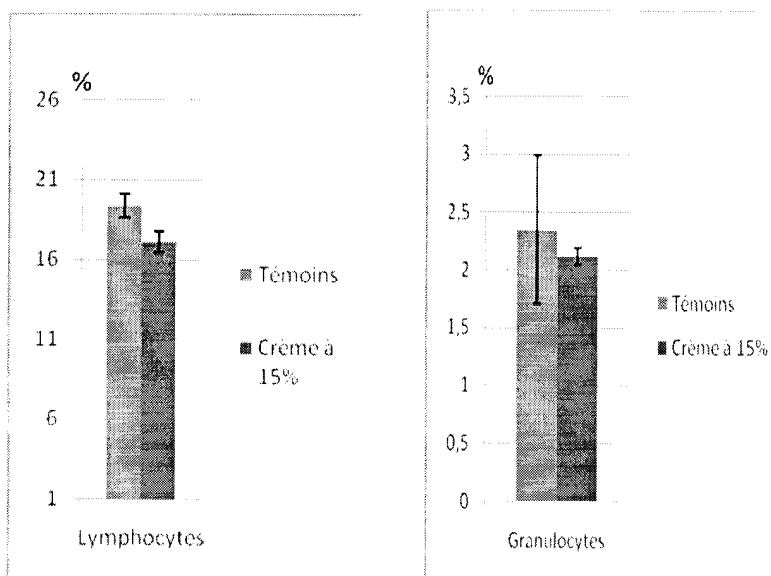
Le comportement général de l'animal,

- Le poids,
- Le pourcentage relatif leucocytaire (lymphocytes et granulocytes),
- La surface cutanée,
- 115 L'aspect morphologique du foie, de l'estomac et des reins,
- Les poids relatifs des organes en comparaison avec le lot contrôle.

Tableau 1 : Effet de la crème formulée sur le poids relatif du foie, de la rate, de l'estomac et des reins. N=5 pour chaque groupe

Poids des organes	Foie	Rate	Estomac	Reins
Contrôle	28,666 ± 2,133	1,968 ± 0,243	6,487 ± 0,152	2,347 ± 0,678
Traité	28,529 ± 1,086	1,549 ± 0,222	7,259 ± 0,425	2,967 ± 0,258

NB : résultats présentés en moyenne ± SEM



120 **Figure 3 : Effet de la crème sur le pourcentage relatif des sous populations leucocytaires évalué par cytométrie en flux. N= 6 pour chaque groupe.**

REVENDEICATIONS

1. Le choix d'élaboration de la crème d'*Agave americana* L. est basé sur des études ethnopharmacologiques décrites antérieurement.
2. La plante récoltée, selon la revendication 1, est préconisée dans le traitement des maladies accompagnées de symptômes inflammatoires, traitées par la médecine
5 traditionnelle.
3. Utilisation selon les revendications 1 et 2, caractérisée en ce que les feuilles de l'*Agave americana*, ont été récoltées dans le jardin expérimental de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatique, province de Taounate, séchées trois jours dans l'étuve a 40°C et réduites en poudre.
- 10 4. Utilisation selon la revendication 1 à 3, caractérisée en ce que l'extraction des principes actifs du broyat a été réalisée par Soxhlet avec 10g de la poudre pour 100 ml de solvant (70 % d'éthanol et 30% d'eau).
5. Utilisation selon la revendication 1 à 4, caractérisée en ce que la délipidation de la poudre dans le Soxhlet avec l'hexane pendant 15 heures.
- 15 6. Utilisation selon la revendication 1 à 5, caractérisée en ce que la poudre séchée et extraite au Soxhlet avec l'éthanol dilué à 70% pendant 48 heures.
7. Utilisation selon la revendication 1 à 6, caractérisée en ce que l'extrait hydroalcoolique est filtré et évaporé sous pression (BÜCHI Rotavapor R-205).
8. Utilisation selon les revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le résidu sec est
20 récupéré avec un rendement de **32 %**.
9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le résidu sec a subi un ensemble de tests phytochimiques et spectrophotométriques.
10. Le résidu sec, selon la revendication 8, est mis dans l'eau distillée à une concentration de 1g/l.

25 11. Utilisation selon la revendication 8 et 10, caractérisée en ce que 1 ml de la solution est mélangé à 1 ml d'une solution méthanolique d'AlCl₃ (2 %).

12. Utilisation selon les revendications 8 à 11, caractérisée en ce que le mélange est incubé pendant 20 min à l'obscurité ; l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre sous UV à 430 nm (JENWAY 6505 UV/Vis Spectrophotometer) (Lamaison & Carnat,
30 1991), et le taux des flavonoïdes a été évalué (**0,55 mg EQ/g E**).

13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le Tween 20 est ajouté à l'extrait hydroalcoolique dosé à 15%.

14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la vaseline est chauffée au bain-marie à 50° C pendant 10 min.

35 15. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que la vaseline est ajoutée à 15% de sa masse en extrait hydroalcoolique, et agitée pendant 30min,

16. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'inflammation a été induite par injection de la carragénine 0.5 % sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite du rat Wistar [13].

40 17. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que la crème est administrée par application locale sur l'aponévrose de la patte postérieure droite du rat Wistar, une heure avant l'induction de l'inflammation.

18. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'effet anti-inflammatoire de la crème est évalué par la mesure de la circonférence
45 de la patte avant et après l'injection de la carragénine à 3, 4, 5 et 6 heures à l'aide d'un fil de coton enroulé sur la patte.

19. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le pourcentage d'inhibition de l'inflammation est calculé selon la formule suivante :
% inhibition= [(St -S0) contrôle - (St -S0) traité]/ (St -S0) contrôle

50 20. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le pourcentage d'inhibition de l'inflammation de la crème est de l'ordre de 71,69% à 4 heures après l'induction de l'œdème.

21. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les études de sécurité préclinique de la crème, objet de cette invention, ne montrent
55 aucune modification significative ni du comportement général ni de l'aspect morphologique ni du poids relatif des rats et de leurs organes (foie, estomac, reins et rate) après une administration unique et répétée pendant 7 jours. L'étude morphologique et le poids relatif des organes ont été réalisés selon la formule suivante :

$$\text{ROW} = (\text{poids d'organe/poids corporel}) \times 1000.$$

60 22. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la crème, objet de l'invention est caractérisée par une couleur verte pale, un pH de 4.11; elle peut être conservée pendant 1 mois à 4°C.

23. La crème objet de l'invention est dosée à 15% ; théoriquement, elle peut être utilisée chez un homme de 60 kg à une dose journalière admissible de l'ordre d'une
65 seule application voire deux applications par jour, jusqu'à la disparition totale des symptômes inflammatoires, sans risque pour la santé.