

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication :
MA 38022 B1

(51) Cl. internationale :
**A61K 31/05; A61K 36/18;
A61K 36/88**

(43) Date de publication :
30.04.2018

(21) N° Dépôt :
38022

(22) Date de Dépôt :
21.04.2015

(71) Demandeur(s) :
**UNIVERSITE MOHAMMED V, Angle avenue Allal El Fassi et Mfadel Cherkaoui Al
Irfane 8007. N.U RABAT (MA)**

(72) Inventeur(s) :
BOUATIA MUSTAPHA

(74) Mandataire :
KARTIT ZAID

(54) Titre : **L'EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE DE LA GRAINE DE JUNCUS MARITIMES L.
MAROC A ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE**

(57) Abrégé : Une espèce de la famille Juncaceae est utilisée en médecine traditionnelle dans divers pays. La présente invention porte sur l'étude des propriétés antioxydantes des graines de Juncus maritimus (connu au Maroc sous le nom de « gl° » \sim » $\text{3}\backslash$ -3-=-_ep) de l'extrait hydroéthanolique. Le pouvoir antioxydant a été évalué par les tests diphényl-picrylhydrazyl (DPPH), pouvoir réducteur du fer (FRAP). Les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes sont les suivantes : 25,25 mg Equivalent en Acide Gallique/gramme et 5,11 mg Equivalent en Quercétine/gramme de matière sèche.

Titre : L'extrait hydroalcoolique de la graine de *Juncus maritimus* L. du Maroc à activité antioxydante

Description

le *Juncus maritimus* appartient à la famille du Juncaceae. Il peut être utilisé comme source pour la production de nouveaux médicaments. Notre invention concerne une plante de la flore marocaine.

En effet, le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux.

Notre invention concerne l'activité antioxydante de l'extrait hydroalcoolique de la graine de *Juncus maritimus*.

Matériels et Méthodes

1 Matériel végétal

Les échantillons ont été récoltés dans la région de Témara en Juillet 2014. L'extrait utilisé a été obtenu à partir des fruits (graine) du *Juncus*. La plante a été identifiée au laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

2 Méthode

2.1 Préparation des extraits hydroéthanoliques de la graine

La préparation a été effectuée conformément à la méthode décrite par Nawaz et al. (2006). En apportant une légère modification, 30 g de poudre de matière sèche ont été mélangés à 100 ml d'éthanol 70%. Le mélange est agité pendant 5 min puis laisser en incubation à la température ambiante dans l'obscurité pendant 1 heure. Ensuite le mélange est filtré une fois sur papier de Wattman 3 mm. Le filtrat est évaporé à pression réduite et à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif BUCHI. L'extrait évaporé a servi aux différents tests réalisés.

2.2 Dosage des phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (FC) en apportant quelques modifications [(Mahmoudi) : 250 µl

d'extrait sont mélangés avec 1250 µl du réactif FC (dilué 10 fois) et 1000 µl de Na₂CO₃ à 7,5 % (m/v). Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température de 40° C pendant 30 minutes et l'absorbance est mesurée à 765 nm par un spectrophotomètre UV-visible. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

2.3 Dosage des flavonoïdes

La détermination des flavonoïdes a été effectuée comme suit: 1500 µl de chaque extrait ou étalon sont ajoutés à 1500 µl de chlorure d'aluminium (2%, m/v). Le mélange est agité puis incubé à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 min. Le blanc est réalisé par remplacement de l'extrait par du méthanol et l'absorbance est mesurée à 430 nm en utilisant un spectrophotomètre UV Visible. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine /g de matière sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine.

2.4 Détermination de l'activité antioxydante

Pouvoir réducteur

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par Kholkhal et al. avec une légère modification : 500 µl de l'extrait sont ajoutés à 1250 µl de tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 1250 µl de ferricyanure de potassium (1%, m/v) ; puis incubé à 50°C pendant 20 min. Un volume de 1250 µl du mélange est ajouté à 1250 µl d'eau et 250 µl de chlorure ferrique (0.1%). L'ensemble est incubé à la température ambiante pendant 30 min et l'absorbance est mesurée à 700 nm. Les résultats obtenus sont exprimés en mg d'acide ascorbique par g de matière sèche.

Activité antiradicalaire

Le DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) est la référence le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité anti-oxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520nm (Bozin et al.,2008). Le protocole expérimental suivi pour étudier l'activité du piègeage du radical libre DPPH est celui décrit par Benhammou et al. 2007 : 750 µl de l'extrait ou étalon ont été ajoutés à 1750 µl de DPPH (50,72 µM) pour une incubation de 15 min à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 515 nm.

Résultats et discussion

Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Les courbes d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercétine pour les dosages respectifs des polyphénols et des flavonoïdes sont données par les figures 1 et 2.

Tableau 1 : teneur en polyphénols et flavonoïdes des graines de Juncus

Teneur Polyphénols	25,25 mg/g Acide gallique
Teneur Flavonoïdes	5,11 mg/g Quercétine

Les teneurs dans l'extrait de la graine sont calculées à partir de la droite d'étalonnage d'acide gallique pour les polyphénols totaux et à partir de la droite d'étalonnage de la quercétine pour les flavonoïdes

Activité antioxydante ; Pouvoir antiradicalaire : DPPH Le pourcentage d'inhibition est calculé à partir de la formule suivante : $(Ac - Aext / Ac) \times 100$

Avec - Ac : Absorbance du contrôle au temps T_0

- Aext : Absorbance de l'extrait

Concentration mg/ml	% Inhibition Quercétine	% Inhibition extrait
0.025	96,37	17,56

L'extrait a une capacité de réduire le DPPH plus élevée que celle de la quercétine.

Pouvoir antioxydant : FRAP

En se référant aux deux courbes de la réduction du fer, l'extrait de graine a une activité plus élevée que celle de la vitamine C.

Conclusion

L'activité antioxydante in vitro du contenu de l'extrait a été évaluée par deux méthodes différentes à savoir la technique de réduction du fer « FRAP » (ferric reducing antioxydant power) et le test de DPPH. La première technique a montré que la graine a une capacité de réduction du fer plus élevée que celle de la vitamine C. Quant au test de DPPH les pourcentages d'inhibition sont : 96,37% pour 0.025 mg/ml de Quercétine et 17,36% pour la graine de Juncus. Donc la capacité de réduire le DPPH de la graine est plus élevée que celle de la quercétine.

Figure1 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Figure 2 : courbe d'étalonnage de la quercétine

Figure 3: étalonnage du DPPH

Figure 4 : évolution de l'absorption en fonction de la concentration de l'acide ascorbique

Figure5 : évolution de l'absorption en fonction de la concentration de la graine

Revendications

1. L'extrait hydroalcoolique de la graine de *Juncus maritimus* à activité antioxydante caractrisé en ce que la teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes sont:

- 25,25 mg Equivalent en Acide Gallique/gramme
- 5,11 mg Equivalent en Quercétine/gramme de matière sèche.

2. L'extrait de l'hydroéthanolique la graine selon la revendication 1 carctérisé en ce que la capacité de réduction du fer dépasse celle de la vitamine C et celle de la quercétine, la dite capacité est évaluée par deux méthodes différentes à savoir la technique de réduction du fer « FRAP » (ferric reducing antioxydant power) et le test de DPPH. Le test de DPPH les pourcentages d'inhibition sont : 96,37% pour 0.025 mg/ml de Quercétine et 17,36% pour la graine de Juncus.

Abrégé

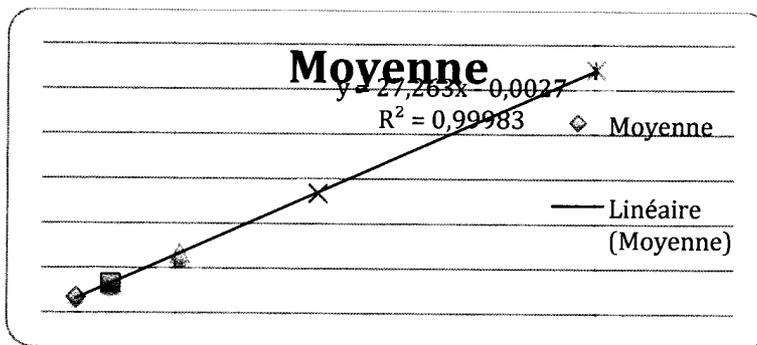
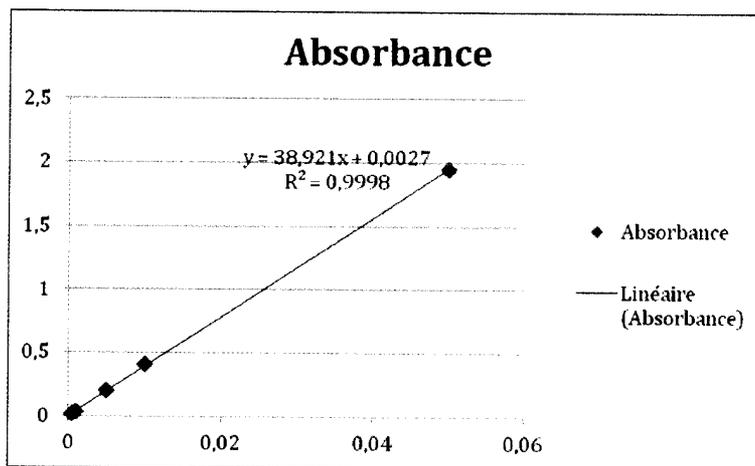
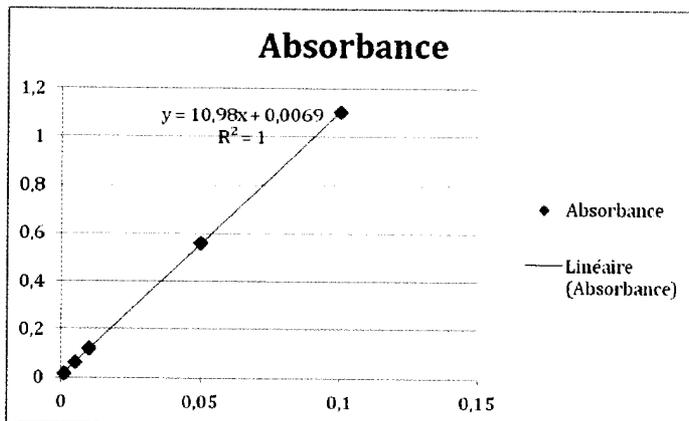
Une espèce de la famille Juncaceae est utilisée en médecine traditionnelle dans divers pays.

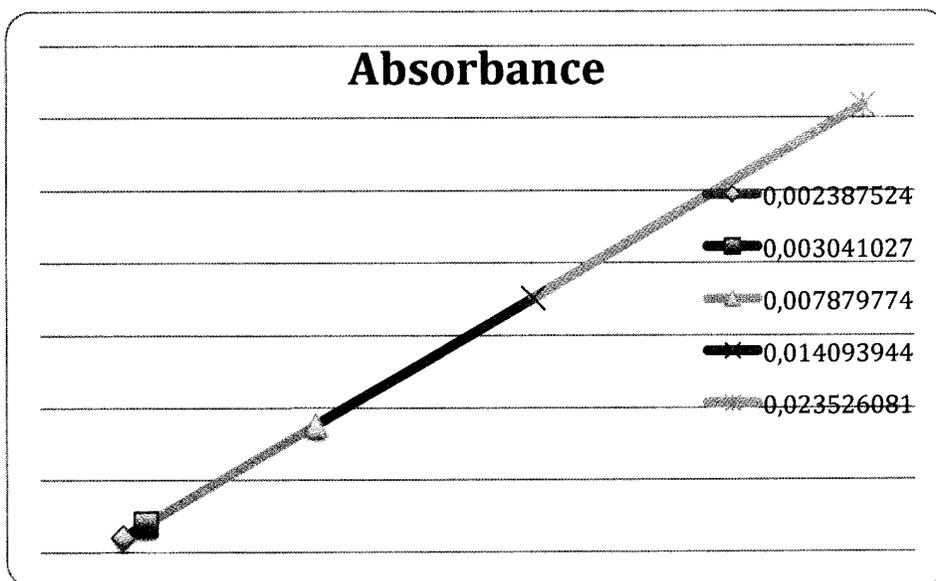
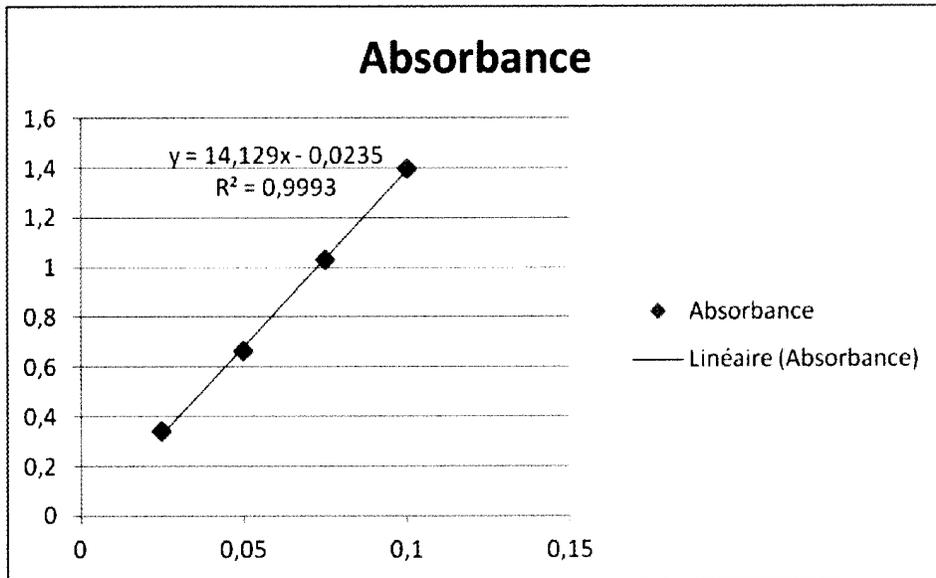
La présente invention porte sur l'étude des propriétés antioxydantes des graines de *Juncus maritimus* (connu au Maroc sous le nom de زريعة السمار) de l'extrait hydroéthanolique.

Le pouvoir antioxydant a été évalué par les tests diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH), pouvoir réducteur du fer (FRAP).

Les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes sont les suivantes : 25,25 mg Equivalent en Acide Gallique/gramme et 5,11 mg Equivalent en Quercétine/gramme de matière sèche.

ANNEXES







**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 : 38022	Date de dépôt : 21/04/2015
Déposant : UNIVERSITÉ MOHAMMED V DE RABAT	
Intitulé de l'invention : L'EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE DE LA GRAINE DE JUNCUS MARITIMES L. MAROC A ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE	
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 brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site http://worldwide.espacenet.com , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
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: R. TELLAA	Date d'établissement du rapport: 22/10/2015
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	



Partie 1 : Considérations générales

Cadre 1 : base du présent rapport

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description
1 - 4
- Revendications
2
- Planches de dessin
7 - 8

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB: A61K36/88, A61K36/18, A61K31/05.

CPC: A61K36/88, A61K36/18, A61K31/05.

Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :

EPOQUE, ORBIT, SCIENCEDIRECT, PUBMED

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
A	YU-LING HO et al, IN VITRO ANTIOXIDANT PROPERTIES AND TOTAL PHENOLIC CONTENTS OF WETLAND MEDICINAL PLANTS IN TAIWAN, 01/01/2012.	1 - 2
A	REN-YOU GAN et al, SCREENING OF NATURAL ANTIOXIDANTS FROM TRADITIONAL CHINESE MEDICINAL PLANTS ASSOCIATED WITH TREATMENT OF RHEUMATIC DISEASE, 30/08/2010.	1 - 2

***Catégories spéciales de documents cités :**

-« 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
-« 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
-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
-« 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
-« 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

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

- La revendication 2 ne satisfait pas aux exigences de clarté, car l'objet de la protection demandée n'est pas clairement défini
- La formulation «capacité de réduction du fer dépasse celle de la vitamine C et celle de la quercitine» n'est pas considérée comme caractéristiques techniques. La revendication tente de définir l'objet par le résultat recherché.
- L'exposé relatif aux méthodes FRAP et DPPH qui sont des tests d'évaluation de l'activité antioxydant, sont connus par l'homme de métier et ne constituent pas des caractéristiques techniques.

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

Nouveauté (N)	Revendications 1 - 2 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1 - 2 Revendications aucune	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1 - 2 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 : IN VITRO ANTIOXIDANT PROPERTIES AND TOTAL PHENOLIC CONTENTS OF WETLAND MEDICINAL PLANTS IN TAIWAN

D2 : SCREENING OF NATURAL ANTIOXIDANTS FROM TRADITIONAL CHINESE MEDICINAL PLANTS ASSOCIATED WITH TREATMENT OF RHEUMATIC DISEASE

1. Nouveauté (N) :

Le document D1 divulgue les propriétés anti oxydantes et le contenu en phénol total des plantes des zones humides, parmi les extraits de plantes utilisées lors de cette étude est l'extrait hydro alcoolique de *Juncus effusus*, dont l'étude a montré une activité antioxydant élevée ainsi qu'une teneur élevée de polyphénols totaux (tableau 5, page 58, paragraphe 3).

Le document D2 a pour objet la mise en évidence des antioxydants naturels à partir des plantes médicinales traditionnelles chinoises et qui sont utilisées dans le traitement des maladies rhumatismales. Le tableau 1 montre la capacité antioxydante et la teneur en phénol total de l'extrait hydro alcoolique *Juncus effusus*.

Aucun document cité ci-dessus ne divulgue l'utilisation d'extrait hydroalcoolique de *Juncus maritimus* pour son activité antioxydante.

Par conséquent l'objet des revendications 1 et 2 est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive (AI) :

Le document D1 considéré comme l'état de la technique le plus proche divulgue la capacité antioxydante de *Juncus effusus* ($971.14 \pm 49.68 \mu\text{M Trolox/mg}$).

L'objet de la revendication 1 diffère de D1 en ce qu'elle utilise d'extrait hydroalcoolique de *Juncus maritimus*, qui est de même genre (*Juncus*), mais d'espèce différente (*maritimus*).

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut être considéré comme la fourniture d'une composition pharmaceutique alternative ayant une activité antioxydante.

La solution semble non évidente à l'homme de métier à l'égard de l'art antérieur pour les raisons suivantes :

L'activité antioxydante de l'espèce *Juncus effusus* est connue du document D1 mais l'activité antioxydante de l'espèce *Juncus maritimus* n'est pas décrite dans l'art antérieur. L'homme du métier alors n'a aucune raison à arriver à cette solution.

D'où l'objet des revendications 1 et 2 implique une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 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.