

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication :
MA 44815 B1

(51) Cl. internationale :
A01H 4/00; A61K 36/48

(43) Date de publication :
31.03.2021

(21) N° Dépôt :
44815

(22) Date de Dépôt :
07.02.2019

(71) Demandeur(s) :
Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Cité Al Irfane, 10170, Rabat, 10170 (MA)

(72) Inventeur(s) :
Mentag Rachid ; Lozzi Assia ; Abdelhadi Abousalim ; Abdelwahed Rabha

(74) Mandataire :
Guisi Kalid

(54) Titre : **Production in vitro de polyphénols et extraction à partir de cals, de vitroplants et de matériels adultes de caroubier (Ceratoniasiliqua L.)**

(57) Abrégé : La présente invention fournit un procédé de production in vitro de polyphénols à partir des cals et de vitroplants de caroubier (*Ceratoniasiliqua L.*) en utilisant les techniques de la culture de tissus. La présente invention fournit également un procédé d'extraction de polyphénols à partir de cals, de vitroplants et de matériaux issues de plantes adultes de caroubier. Les extraits obtenus, riches en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins et possédant une puissante activité antioxydante, sont d'intérêt pour la préparation de compléments alimentaires, de compositions pharmaceutiques, ou de préparations extemporanées à usage alimentaire.

Abrégé

La présente invention fournit un procédé de production *in vitro* de polyphénols à partir des cals et de vitroplants de caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) en utilisant les techniques de la culture de tissus.

La présente invention fournit également un procédé d'extraction de polyphénols à partir de cals, de vitroplants et de matériaux issues de plantes adultes de caroubier.

Les extraits obtenus, riches en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins et possédant une puissante activité antioxydante, sont d'intérêt pour la préparation de compléments alimentaires, de compositions pharmaceutiques, ou de préparations extemporanées à usage alimentaire.

Titre : Production *in vitro* de polyphénols et extraction à partir de cals, de vitroplants et de matériels adultes de caroubier (*Ceratonia siliqua* L.)

La Description

1. Domaine technique auquel se rapporte l'invention :

La présente invention concerne des procédés et des matériaux permettant la production de polyphénols à partir des cals et de vitroplants de caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) obtenus *in vitro* par les techniques de la culture de tissus.

Cette invention concerne spécifiquement un protocole d'induction *in vitro* de cals de caroubier conçue pour favoriser la production des polyphénols.

La présente invention concerne également des procédés et des matériaux permettant l'extraction des polyphénols à partir des cals, des vitroplants, ainsi que des matériaux obtenus de plantes adultes de caroubier.

2. Contexte générale et état de la technique antérieur

Le caroubier est un arbre typique des pays méditerranéens, répandu à l'état naturel ou cultivé essentiellement en Portugal, Italie, Espagne, Maroc, Turquie, Grèce, et Chypre. Les gousses et les graines produites sont utilisées par diverses industries dans plusieurs domaines. La gomme extraite des graines est ainsi utilisée, entre autres, par les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Les gousses ainsi que les feuilles sont aussi utilisées en médecine traditionnelle. A noter que les feuilles de caroubier sont désignées comme étant porteuses d'activités cytotoxiques, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anti-cancer (Hsouna et al., 2011; Aboura et al., 2017; Ghanemi et al., 2017). Elles sont aussi recommandées pour le traitement de l'obésité, des vomissements et de l'hypercholestérolémie (Zunft et al., 2003) et pour améliorer le transit intestinal chez les enfants (Serairi-Beji et al., 2000).

Au cours de ces dernières années, des recherches scientifiques ont démontré que plusieurs parties de caroubier, comme les feuilles (El Hajaji et al., 2010), la pulpe (Papagiannopoulos et al., 2004), les graines (Fadel et al., 2011) et l'écorce (El Hajaji et al., 2011), contient plusieurs composés polyphénoliques dotés d'une activité antioxydante et anticancéreuse (Baraldi, 2004). Cependant, les résultats obtenus pour le caroubier au Maroc restent faibles à modérés. Hajaji et al. (2010) ont obtenu des niveaux de 2,5 à 2,64 mg eq AG.g-1 MS de polyphénols totaux avec un niveau de DPPH de 1,17 à 61,17% à partir des feuilles d'arbres adultes de caroubier. El Bouzdoudi et al. (2016) ont rapporté des niveaux de 7,80 à 22,75 mg eq AG.g-1 MS de polyphénols totaux et de 0,21 à 1,02 de flavonoïdes totaux dans le cas de la pulpe de caroubier.

En cas d'excès de radicaux libres dans l'organisme, le stress oxydatif s'installe et peut occasionner l'apparition de certaines maladies dégénératives et cancéreuses. Les antioxydants naturels sont connus pour leurs capacités à combattre ces radicaux libres en les neutralisant par réaction de réduction et, par conséquent, à limiter le risque de diverses maladies dégénératives associées au stress oxydatif (Pandey and Rizvi, 2009). Les polyphénols représentent une famille très importante d'antioxydants ayant attiré le plus d'attention au cours de ces dernières années. Ce sont des produits de métabolisme secondaire des plantes. Plus de 8000 structures ont été identifiées allant de molécules phénoliques simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tannins.

En plus de leur activité antioxydante, les polyphénols sont dotés de plusieurs autres activités biologiques importantes notamment anti-cancéreuses, anti-thrombotiques, anti-diabétique, anti-inflammatoires, anti-microbiennes et neuroprotective (Kammerer et al., 2014; Pandey and Rizvi, 2009).

Les caractéristiques chimiques des polyphénols permettent d'envisager une multitude d'utilisations et d'applications technologiques dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Grâce à leur activité antimicrobienne, les polyphénols ont commencé à être utilisés pour la conservation des produits alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques dont l'état de conservation doit être le plus parfait possible tout au long de leur cycle de vie (Del Nobile et al., 2012). Les propriétés antioxydantes des polyphénols participeraient à l'amélioration de la valeur nutritionnelle des aliments en retardant la dégradation oxydative des lipides (Lorenzo and Munekata, 2016). Les polyphénols exercent également un effet majeur sur les caractères organoleptiques des produits tels que le goût, la texture, l'odeur et la couleur (Galanakis, 2018). Dans le domaine des cosmétiques, les polyphénols peuvent être efficaces pour améliorer la qualité structurelle de la peau et la prévention ainsi que le traitement du vieillissement cutané prématuré, principalement dû au stress oxydatif. Elles possèdent des activités photoprotectrices, anticollagénase, antiélastase, antiradicalaire et antityrosinase. Ainsi, la formulation de produits de soin de la peau à partir des polyphénols offre donc une solution de soin naturel prometteuse et efficace (Galanakis, 2018).

Au cours des dernières années, les techniques de la culture *in vitro* de tissus végétaux sont exploitées pour la production de métabolites secondaires, utilisés notamment pour le développement de nouveaux médicaments, en médecine dans les recherches cliniques et, dans les domaines pharmacologiques. La production et l'accumulation d'antioxydants à partir des produits de la culture *in vitro* comme les pousses, les racines, les cals et les suspensions cellulaires a été décrite dans le cas de plusieurs espèces végétales comme le romarin (Caruso et al., 2000), la lavande vraie (Kovatcheva et al., 2001), la carotte (Ravindra and Narayan, 2003) et la vigne (Tassoni et al., 2005). L'exploitation de la technologie de la culture *in vitro* pour la biosynthèse d'antioxydants présente l'avantage de produire des substances biochimiques d'intérêt à partir de cellules végétales, sous les conditions contrôlées et aseptiques, indépendamment des saisons et de facteurs géographiques. Il a d'ailleurs été démontré que la production et l'accumulation de métabolites secondaires chez les plantes cultivées au champ est très variable selon les conditions physiologiques et environnementales (Robles-Martínez et al., 2016).

Bien que plusieurs travaux sur l'extraction d'antioxydant à partir de certains extraits de la plante de caroubier ont été publiés, aucun travail portant sur l'identification du potentiel antioxydant et du contenu polyphénolique des produits de la culture *in vitro* de cette espèce n'a été publié jusqu'à présent.

Une production optimale de polyphénols à forte activité antioxydante à partir des cals et de vitroplants de caroubier nécessite une bonne maîtrise des conditions de culture *in vitro*, notamment la lumière en phase d'incubation ainsi que la composition du milieu de culture. Il a d'ailleurs été rapporté que la biosynthèse des métabolites secondaires chez les végétaux est fortement influencée par la qualité et la quantité de la lumière et par la composition du milieu de culture (Dannehl et Josuttis, 2014).

3. Exposé de l'invention, avantages par rapport à l'état antérieur :

Le présente invention fournit pour la première fois, à notre connaissance, un procédé de production *in vitro* d'un extrait riche en polyphénols et ayant une importante activité antioxydante, à partir de cals de caroubier en utilisant la technologie de la culture de tissus.

L'exploitation de cette biotechnologie pour la biosynthèse et production de polyphénols ainsi que l'extraction de ces composés à partir des tissus produits *in vitro* offrent plusieurs avantages comparativement à l'utilisation de plantes cultivées au champs (Matkowski, 2008; Dias et al., 2016). Peuvent être cités, à titre indicatif, les atouts suivants:

- Une production continue, durable, économique et viable indépendamment des facteurs climatiques et géographiques ;
- Une extraction et purification plus simple ;
- La possibilité de stimuler la biosynthèse de nouveaux métabolites secondaires d'intérêt commerciale non produits par la plante cultivée en champs ;
- La possibilité de contrôler des voies de biosynthèse pour augmenter la production et l'accumulation de composés spécifiques,
- Une production évolutive tout en assurant une utilisation rationnelle de la biodiversité et une conservation durable des ressources naturelles;
- Des cycles de production plus courts et des productions plus flexibles ;
- La possibilité de contrôle du produit final ;
- La facilité de respecter les exigences de la production pharmaceutique de haut-profil conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication des produits pharmaceutique ;
- La possibilité de sélectionner les meilleurs clones à l'aide des outils de la génie génétique ;
- La possibilité d'exploitation du potentiel de la génie génétique.

Ainsi, la combinaison entre les techniques des biotechnologies végétales et la biochimie permet une amélioration significative de la production des métabolites secondaires, mettant en évidence la culture *in vitro* comme méthode préférée pour la production de ces composés pour leurs utilisation dans les domaines industriels et pharmacologiques (Dias et al., 2016). Cette méthodologie permet également un approvisionnement continu en matières végétales, et le contenu en métabolites peut être augmenté par élicitation, sous stress biotique ou abiotique (Lucchesini et Mensuali-Sodi, 2010).

La présente invention a été développée pour établir les conditions optimales pour la production *in vitro* de cals de *Ceratonia siliqua* riches en polyphénols à forte activité antioxydante.

La présente invention a aussi été développée pour élaborer un procédé d'extraction de polyphénols à partir de cals et de plants produits *in vitro* en plus de matériel végétal prélevé à partir des plantes adultes de *C. siliqua*.

La présente invention fournit dans un premier temps un procédé de production de cals à partir de différents types d'explants (cotylédons, feuilles, entre-nœuds, tiges ou racines) de *C. siliqua*. Les cals sont adaptés à produire une importante quantité de polyphénols à forte activité antioxydante. Le milieu d'induction des cals est composé des éléments nutritifs du milieu de culture de Phillips et Collins (1979) (SL2) ou autre milieu similaire, une auxine et/ou cytokinine, le saccharose ou autre hydrates de carbones. Le milieu peut aussi être supplémenté avec tout autre additifs communément utilisé dans les milieux de culture *in vitro* comme les acides aminés, le charbon actif, des précurseurs des polyphénols, les tampons de pH, etc.

et 0,5-1 g/l de charbon actif. Les cultures sont maintenues, pendant 30 à 50 jours, à une température de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ et à l'obscurité. Les cals en croissance active sont collectés en phase de prolifération.

La présente invention fournit, dans un second temps, un procédé de production de polyphénols à partir de vitroplants de *C. siliqua* obtenus par organogenèse directe ou indirecte ou par embryogenèse somatique. La mise en culture *in vitro* a lieu dans un milieu de culture contenant les macro-éléments, les micro-éléments et les vitamines tel que ceux de SL2 et similaire. Le milieu peut aussi être supplémenté avec tout autre additif communément utilisé dans les milieux de culture *in vitro* comme les hydrates de carbones, les régulateurs de croissance, les acides aminés, le charbon actif, les tampons de pH, etc.

La présente invention concerne également un procédé permettant l'extraction de quantités importantes de polyphénols à partir de cals, de feuilles et de racines de vitroplants de *C. siliqua* et à partir de matériaux prélevés de plantes adultes de caroubier comme les feuilles, la pulpe et les graines.

L'extraction est réalisée selon les étapes suivantes:

- (a) Le matériel végétal est séché sous une température de 40 à 80°C puis broyé jusqu'à l'obtention de particule de 400 à 500µm de taille.
- (b) L'agent d'extraction est l'acétone à 60-80%. La concentration utilisée est de 30 à 50 % en volume d'acétone sur la matière sèche des cultures. La température d'extraction est de 60-90°C. La durée d'extraction est de 10 – 90 min
- (c) L'extrait obtenu est filtré. Le Filtrat obtenu est ensuite centrifugé à une vitesse de 3000 à 10000 tr/min pendant 10 à 90 min.

L'extrait brut a été utilisé dans les expérimentations suivantes.

La figure 1 présente la teneur dudit extrait en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins.

L'activité antioxydant a été déterminée par la méthode DPPH. Les résultats sont présentés dans la figure 2.

Par calls on entend une masse de cellules somatiques indifférenciées.

Par culture *in vitro* on entend la culture d'une partie de la plante (cellule ; tissus ; cals ; organes ou parties d'organes végétatifs incluant entre autres les microboutures, les bourgeons, les méristèmes, les feuilles, les racines ; organes ou parties d'organes reproducteurs ;graines, cotylédons, embryons, et similaires utilisés entiers ou fragmentés en portions), dénommés explants, dans un milieu de culture nutritif. Ce milieu contient des éléments minéraux essentiels pour la croissance et le maintien des explants en plus des régulateurs de croissance qui déterminent l'expression et l'orientation morphogénétique ainsi que d'autres additifs. Les cultures sont maintenues dans des conditions de température et d'éclairage et d'humidité contrôlées.

Par SL2 on entend le milieu de culture de base de (Phillips et Collins, 1979).

Par 2,4-D on entend le 2,4-dichlorophénoxyacétique.

Par BAP on entend le 6-benzylaminopurine.

Par AIB on entend l'acide 4-(3-indolyl)-butyrique.

Par ANA on entend l'acide 1-naphtalène acétique.

Par eq AG.g-1 MS on entend l'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche.

Par eq QE g-1 MS on entend l'équivalent de quercetine par gramme de matière sèche.

Par eq CE g-1 MS on entend l'équivalent de catechine par gramme de matière sèche.

Par DPPH on entend la méthode qui permet d'évaluer le pouvoir antiradicalaire d'extraits végétaux. Il mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl).

Les exemples suivants décrivent plus en détail la présente invention :

Exemple 1 : Production et extraction des polyphénols à partir des cals régénérés à partir des cotylédons matures et de feuilles de caroubier

Des graines matures de *C. siliqua* sont scarifiées par immersion dans l'acide sulfurique (H_2SO_4 à 36 N) pendant 60 min, puis trempées dans l'eau, pendant 24 heures. Elles sont ensuite désinfectées à l'hypochlorite de sodium (7%) pendant 10 min et rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Les cotylédons sont prélevés aseptiquement et subdivisés en segments.

Les portions de cotylédons sont mises en culture dans le milieu de culture contenant éléments nutritifs du milieu SL_2 , additionné de 30g/l de saccharose, 2,5 μ M de 2,4-D et 1g/l de charbon actif. Les cultures sont maintenues à l'obscurité dans une chambre de culture sous une température de $26 \pm 2^\circ C$ et.

Les cals obtenus sont séchés sous une température de 60°C jusqu'à l'obtention de poids constant et broyés jusqu'à l'obtention de particules de 500 μ m de taille.

L'extraction est réalisée dans l'acétone 70% à une concentration de 40% en volume d'acétone sur la matière sèche des cultures pendant 60 min. L'extrait obtenu est filtré. Le filtrat est ensuite centrifugé à une vitesse de 4000 tr/min pendant 20 min.

Les teneurs des cals en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, tannins condensés sont présentées dans le tableau 1.

L'activité antioxydant est déterminée par la méthode DPPH.

La teneur en polyphénols totaux a été déterminé par l'essai de Folin (Singleton and Rossi, 1965),

La teneur en Flavonoïdes totaux a été déterminé par l'essai de chlore d'aluminium (Singleton and Rossi, 1965),

La teneur en tanins condensés a été déterminé par la méthode de vanillin-HCl (Broadhurst and Jones, 1978),

Le pouvoir antiradicalaire des extraits (DPPH) a été déterminé selon la méthode Brand-Williams et al. (1995).

Tableau 1 : Teneurs des cals en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, tannins condensés et DPPH

Explant	Conditions de culture	Polyphénols totaux		Flavonoïdes totaux			Tannins condensés			DPPH (%)
		(mg eq MS)	AG.g ⁻¹	(mg eq MS)	QE	g ⁻¹	(mg eq MS)	CE	g ⁻¹	
Cotylédons	Obscurité	7,03		3,98			0,99			82,52
	Lumière	6,66		3,79			0,22			64,80
Feuilles	Obscurité	26,09		5,38			1,56			88,69
	Lumière	23,82		4,40			1,00			88,01

Le présent exemple montre que les cals produits à partir des feuilles de caroubier sont beaucoup plus riches en polyphénols que les cals produits à partir des cotylédons.

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux et en tannins condensés sont plus importantes en obscurité qu'en lumière.

L'activité antioxydante est nettement plus forte en obscurité qu'en lumière, spécifiquement dans le cas des cotylédons.

Exemple 2 : Extraction des polyphénols à partir de vitroplants et de matériaux prélevés de plantes adultes de caroubier.

Des extraits polyphénoliques sont préparés selon la méthode décrit dans le cas de l'exemple 1, à partir des feuilles et des racines prélevées à partir des vitroplants de caroubier multipliés dans le milieu nutritif SL₂ additionné de 8,8µM de BAP, 30 g/l de saccharose et 1 g/l de charbon actif et maintenues à une température de 26 ± 2°C et sous une photopériode de 16h/jour.

L'extraction est aussi réalisée à partir de matériaux prélevés de plantes adultes de caroubier (feuilles, pulpe, graines).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, tannins condensés et DPPH obtenus *in vitro* à partir d'explants issus de plantes adultes de caroubier.

Matériel végétal	Polyphénols totaux (mg eq AG.g ⁻¹ MS)	Flavonoïdes totaux (mg eq QE g ⁻¹ MS)	Tannins condensés (mg eq CE g ⁻¹ MS)	DPPH (%)
Feuilles de vitroplants	42,31	18,21	0,22	85,69
Racines de vitroplants	6,98	4,91	0,31	85,95
Feuilles plants femelles greffé	37,72	30,36	0,27	69,93
Feuilles plants mâles greffé	47,17	32,89	0,20	71,08
Feuilles plants non greffés	59,28	30,09	0,26	71,08
Graines	22,53	8,57	0,18	85,98
Pulpes	38,64	6,30	0,28	84,97

La présente invention produit, pour la première fois, à partir des vitroplants de caroubier, un extrait riche en polyphénols, qui, en plus, sont dotés d'une forte activité antioxydante. Le présent exemple de procédé a permis d'extraire une teneur de 42,31 mg eq AG.g⁻¹ MS de polyphénols totaux à partir des feuilles de vitroplants de caroubier, et d'avoir un DPPH de 85,69 %. Les teneurs en flavonoïdes totaux et en tanins ont été, respectivement, de 18,21 mg eq QE g⁻¹ MS et 0,22 mg eq CE g⁻¹ MS.

La présente invention fournit également un extrait riche en polyphénols ayant une importante activité antioxydante à partir de feuilles, pulpes et graines de caroubier. L'extrait préparé à partir des feuilles de plants non greffés est très riche en polyphénols. Il contient une quantité de 59,28 mg eq AG.g⁻¹ MS de polyphénols totaux, 30,09 mg eq QE g⁻¹ MS en flavonoïdes totaux et de 0,26 mg eq CE g⁻¹ MS en tannins, avec un DPPH de 71,08 %. Ces valeurs sont beaucoup plus élevées comparativement à ceux obtenues dans les autres protocoles d'extraction de polyphénols à partir de matériaux prélevés de plantes matures de caroubier marocain;

Les teneurs en polyphénols de nos extraits de feuilles adultes de caroubier sont d'environ 15 à 22 fois supérieures à celles obtenues par le protocole de Hajaji et al. (2010).

Les teneurs en polyphénols de nos extraits de pulpes de caroubier sont d'environ 1,7 à 5 fois supérieures à celles obtenues par le protocole de El Bouzdoudi et al. (2016).

Hajaji et al. (2010) ont obtenu des niveaux de 2,5 à 2,64 mg eq AG.g⁻¹ MS de polyphénols totaux avec un niveau de DPPH de 1,17 à 61,17% à partir des feuilles d'arbres adultes de caroubier. El Bouzdoudi et al. (2016) ont rapporté des niveaux de 7,80 à 22,75 mg eq AG.g⁻¹ MS de polyphénols totaux et de 0,21 à 1,02 de flavonoïdes totaux à partir de la pulpe de caroubier.

Le présent protocole produit un extrait riche en polyphénols, flavonoïdes et en tannins. La production maximale de polyphénols totaux est obtenue dans le cas des feuilles de plants non greffés, suivies par les feuilles mâles et les feuilles des vitroplants. Une forte activité antioxydante a été décelée, essentiellement dans le cas des feuilles et des racines de vitroplants ainsi que dans le cas des graines et de la pulpe du caroubier.

Références citées

- Aboura, I., Nani, A., Belarbi, M., Murtaza, B., Fluckiger, A., Dumont, A., Benammar, C., Tounsi, M.S., Ghiringhelli, F., Rialland, M., others, 2017. Protective effects of polyphenol-rich infusions from carob (*Ceratonia siliqua*) leaves and cladodes of *Opuntia ficus-indica* against inflammation associated with diet-induced obesity and DSS-induced colitis in Swiss mice. *Biomed. Pharmacother.* 96, 1022–1035.
- Baraldi, M., n.d. Extract of *ceratonia siliqua* leaves and pods containing polyphenols with antioxidant and antitumor activities.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28, 25–30.
- Broadhurst, R.B., Jones, W.T., 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.* 29, 788–794.
- Caruso, J.L., Callahan, J., DeChant, C., Jayasimhulu, K., Winget, G.D., 2000. Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. *Plant Cell Rep.* 19, 500–503.
- Dannehl, D., Josuttis, M., 2014. Cultivar and production effects on bioactive polyphenols, in: Watson, R.R. (Ed.), *Polyphenols in Plants*. Elsevier, Tucson, AZ, USA, pp. 3–13.
- Del Nobile, M.A., Lucera, A., Costa, C., Conte, A., 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Front. Microbiol.* 3, 287.
- Dias, M.I., Sousa, M.J., Alves, R.C., Ferreira, I.C.F.R., 2016. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Ind. Crops Prod.* 82, 9–22.
- El Bouzdoudi, B., El Ansari, Z.N., Mangalagiu, I., Mantu, D., Badoc, A., Lamarti, A., 2016. Determination of Polyphenols Content in Carob Pulp from Wild and Domesticated Moroccan Trees. *Am. J. Plant Sci.* 7, 1937.
- El Hajaji, H., Lachkar, N., Alaoui, K., Cherrah, Y., Farah, A., Ennabili, A., El Bali, B., Lachkar, M., 2011. Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco. *Arab. J. Chem.* 4, 321–324.
- El Hajaji, H., Lachkar, N., Alaoui, K., Cherrah, Y., Farah, A., Ennabili, A., El Bali, B., Lachkar, M., 2010. Antioxidant properties and total phenolic content of three varieties of Carob tree leaves from Morocco. *Rec. Nat. Prod* 4, 193–204.
- Fadel, F., Fattouch, S., Tahrouch, S., Lahmar, R., Benddou, A., Hatimi, A., 2011. The phenolic compounds of *Ceratonia siliqua* pulps and seeds (Les composés phénoliques des pulpes et des graines de *Ceratonia siliqua*). *J. Mater. Environ. Sci* 2, 285–292.
- Galanakis, C.M., 2018. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Woodhead Publishing.
- Ghanemi, F.Z., Belarbi, M., Fluckiger, A., Nani, A., Dumont, A., De Rosny, C., Aboura, I., Khan, A.S., Murtaza, B., Benammar, C., others, 2017. Carob leaf polyphenols trigger intrinsic apoptotic pathway and induce cell cycle arrest in colon cancer cells. *J. Funct. Foods* 33, 112–121.
- Hajaji, H. El, Lachkar, N., Alaoui, K., Cherrah, Y., Farah, A., Ennabili, A., Bali, B. El, 2010. Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Three Varieties of Carob Tree Leaves from Morocco Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Three Varieties of Carob Tree Leaves from Morocco 4, 193–204.
- Hsouna, A. Ben, Trigui, M., Mansour, R. Ben, Jarraya, R.M., Damak, M., Jaoua, S., 2011. Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with

- preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *Int. J. Food Microbiol.* 148, 66–72.
- Kammerer, D., Kammerer, J., Carle, R., 2014. Resin Adsorption and Ion Exchange to Recover and Fractionate Polyphenols, in: Watson, R.R. (Ed.), *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*. Academic Press, London, Waltham, San Diego, pp. 219–230.
- Kovatcheva, E.G., Koleva, I.I., Ilieva, M., Pavlov, A., Mincheva, M., Konushlieva, M., 2001. Antioxidant activity of extracts from *Lavandula vera* MM cell cultures. *Food Chem.* 72, 295–300.
- Lorenzo, J.M., Munekata, P.E.S., 2016. Phenolic compounds of green tea: health benefits and technological application in food. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6, 709–719.
- Matkowski, A., 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants- review. *Biotechnol. Adv.* 26, 548–560.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2, 270–278.
- Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H.R., Mellenthin, A., Haber, B., Galensa, R., 2004. Identification and quantification of polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS n. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3784–3791.
- Phillips, G.C., Collins, G.B., 1979. *In Vitro* Tissue Culture of Selected Legumes and Plant Regeneration from Callus Cultures of Red Clover 1. *Crop Sci.* 19, 59–64.
- Ravindra, P. V, Narayan, M.S., 2003. Antioxidant activity of the anthocyanin from carrot (*Daucus carota*) callus culture. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 54, 349–355.
- Robles-Martínez, M., la Rosa, A.P., Guéraud, F., Negre-Salvayre, A., Rossignol, M., del Socorro Santos-Díaz, M., 2016. Establishment of callus and cell suspensions of wild and domesticated *Opuntia* Species: Study on their potential as a source of metabolite production. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 124, 181–189.
- Serairi-Beji, R., Mekki-Zouiten, L., Tekaya-Manoubi, L., Loueslati, M.H., Guemira, F., Mansour, A. Ben, others, 2000. Could carob pulp be incorporated in oral rehydration solution for the treatment of acute diarrhoea *Médecine Trop.* 60, 125–128.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Tassoni, A., Fornalè, S., Franceschetti, M., Musiani, F., Michael, A.J., Perry, B., Bagni, N., 2005. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytol.* 166, 895–905.
- Zunft, H.J.F., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H.J., Koebnick, C., Grünwald, J., 2003. Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *Eur. J. Nutr.* 42, 235–242.

Revendications :

1. Procédé de production et d'extraction de métabolites secondaires à partir de cals et de vitroplants de caroubier comprenant: {a} L'induction in vitro des cals à partir de différents types d'explants , organes et tissus de caroubier, entiers ou fragmentés, incluant à titre indicatif: les feuilles, les entrenoeuds, les tiges, les racines, les cotylédons, les embryons, les divers organes reproducteurs. Le milieu d'induction contient les macro-éléments, les micro-éléments et les vitamines tel que ceux de Phillips et Collins, (SL2; 1979) ou similaire, une auxine (tel que l'acide 2,4dichlorophénoxyacétique, l'acide ~-indole-butyrique, l'acide indole 3-acétique, l'acide a-naphtyl-acétique ou leurs mélanges) et/ou cytokinine (tel que 6benzylaminopurine, Kinétine, la Zéatine ou leurs mélanges) et des hydrates de carbones. Le milieu peut aussi être supplémenté avec tout autre additifs communément utilisé dans les milieux de culture in vitro comme les acides aminés, le charbon actif, les agents gélifiants, les précurseurs des polyphénols, les tampons de pH, etc. {b} La mise en culture des vitroplants de caroubier obtenus par organogenèse directe ou indirecte ou par embryogenèse somatique. La mise en culture in vitro a lieu dans un milieu de culture contenant les macroéléments, les micro-éléments et les vitamines tel que ceux de SL2 ou similaire. Le milieu est additionné d'une cytokinine (tel que 6-benzylaminopurine, Kinétine, la Zéatine ou leurs mélanges), une auxine (tel que l'acide ~-indole-butyrique, l'acide indole 3acétique, l'acide a-naphtyl-acétique ou leurs mélanges), 20-50 g/l de saccharose, 0,5-3 g/l de charbon actif. Le milieu peut aussi être supplémenté avec tout autre additifs communément utilisé dans les milieux de culture in vitro comme les acides aminés, les précurseurs des polyphénols, les tampons de pH, etc. Les cultures sont maintenues à une température de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ et sous une photopériode de 16h/jour. Puisque les revendications 17 n'ont pas été considéré inventives, une seule revendication a été maintenue (8) tout en ajoutant les autres éléments descriptifs. {c} La préparation des extraits polyphénoliques, à partir des cals, de vitroplants et de matériaux prélevés à partir de plantes adultes de C.silqua. Les dits extraits possèdent une puissante activité antioxydante, utile entre autre, pour la préparation de compléments alimentaires, de préparations extemporanées à usage alimentaire, de compositions pharmaceutiques. La préparation dudit extrait les étapes suivantes:

- Le matériel végétal est séché sous une température de 40 à 50°C et broyé jusqu'à l'obtention d'une taille de particule de 400 à 500µm.

- L'agent d'extraction est l'acétone à 60-50% avec une concentration de 30 à 50 % en volume d'acétone sur la matière sèche des cultures. La température d'extraction est de 60-90°C. La durée d'extraction est de 10 - 90 min.

**RAPPORT DE RECHERCHE DEFINITIF AVEC OPINION SUR
LA BREVETABILITE**

Établi conformément à l'article 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 : 44815	Date de dépôt : 07/02/2019
Déposant : Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II	
Intitulé de l'invention : Production in vitro de polyphénols et extraction à partir de cals, de vitroplants et de matériels adultes de caroubier (Ceratonia siliqua L.)	
Classement de l'objet de la demande : CIB : A01H4/00, A61K36/48 CPC: A61K36/483	
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	
Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Remarques de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 4 : Observations à propos de revendications modifiées qui s'étendent au-delà du contenu de la demande telle qu'initialement déposée <input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur: LAHCHIMI Fatima Zahra	Date d'établissement du rapport : 15/03/2021
Téléphone: (+212) 5 22 58 64 14	

Partie 1 : Considérations générales**Cadre 1 : base du présent rapport**

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

- Demande telle qu'initialement déposée
- Demande modifiée suite à la notification du rapport de recherche préliminaire :
- Revendications
1
- Observations à l'appui des revendications maintenues
- Observations des tiers suite à la publication de la demande
- Réponses du déposant aux observations des tiers
- Nouveaux documents constituant des antériorités
- Observations à l'encontre de la décision de rejet

Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité**Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté	Revendications 1	Oui
	Revendications aucune	Non
Activité inventive	Revendications 1	Oui
	Revendications aucune	Non
Application Industrielle	Revendications 1	Oui
	Revendications aucune	Non

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: Effet du 2,4-D sur l'induction de l'embryogenèse somatique à partir de cotylédons matures de caroubier (*Ceratonia siliqua* L.)

D2: Carob Pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a Source of Polyphenolic Antioxidants

D3: Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Three Varieties of Carob Tree Leaves from Morocco

1. Nouveauté

Aucun des documents cités ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques de la revendication 1, d'où l'objet de ladite revendication 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

Le document D2 est considéré comme l'art antérieur le plus proche de l'objet de la revendication 1. Il divulgue un procédé d'extraction des polyphénols à partir des gousses de caroube, les extraits obtenues avec le procédé divulgué présentent une activité antioxydant appréciable, (la

figure 1 schématise les étapes d'extraction).

L'objet de la revendication 1 diffère du document D2 en ce que l'extraction se fait sur des produits de culture in vitro du caroubier (cals et vitroplants).

Le problème que la revendication 1 se propose de résoudre est considéré comme la fourniture d'un procédé de production in vitro d'un extrait de polyphénols à partir de cals et de plants de *C. siliqua* produits in vitro.

La solution proposée est considérée comme impliquant une activité inventive étant donné que les extraits obtenus à partir des cals et des vitroplants du caroubier présentent des teneurs plus élevées en polyphénols comparativement à ceux obtenus par d'autres procédés d'extraction de polyphénols à partir de matériaux prélevés de plantes matures de caroubier selon les données citées dans la description (page 7).

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 est considéré comme impliquant 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. Application industrielle

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.