

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication :
MA 60999 A1

(51) Cl. internationale :
A61K 36/33; A61P 29/00

(43) Date de publication :
29.11.2024

(21) N° Dépôt :
60999

(22) Date de Dépôt :
02.06.2023

(71) Demandeur(s) :
**UNIVERSITE MOHAMMED PREMIER - OUJDA, Université Mohammed Premier, BV
Mohammed VI B.P. 524, 60000 OUJDA (MA)**

(72) Inventeur(s) :
LOUKILI EL HASSANIA ; RAMDANI Mohammed ; FAUCONNIER Marie Laure

(74) Mandataire :
Zarhloule Yassine

(54) Titre : **Nouveaux anti-inflammatoires naturels isolés du jus de fruit d'Opuntia dillenii.**

(57) Abrégé : La présente invention concerne la séparation de nouveaux principes actifs isolés de l'extrait éthanolique du jus de fruit d'opuntia dillenii. Les études réalisées in-vitro confirment que ces molécules possèdent un potentiel anti-inflammatoire très élevé par comparaison avec le diclofenac considéré comme médicament largement prescrit dans le cas des troubles inflammatoires.

Abrégé

La présente invention concerne la séparation de nouveaux principes actifs isolés de l'extrait éthanolique du jus de fruit d'opuntia dillenii. Les études réalisées in-vitro confirment que ces molécules possèdent un potentiel anti-inflammatoire très élevé par comparaison avec le diclofenac considéré comme médicament largement prescrit dans le cas des troubles inflammatoires.

Intitulé de l'invention**Nouveaux anti-inflammatoires naturels isolés du jus de fruit d'*Opuntia dillenii*.****Description de l'invention**

Les travaux effectués dans le cadre de la présente invention sont regroupés en quatre étapes, à savoir, la préparation de l'extrait du jus de fruit, l'isolement des nouvelles molécules et l'évaluation de leur activité anti-inflammatoire.

- **Etape 1** : Séparation, séchage et broyage du jus de fruit.
- **Etape 2** : Délipidation du jus de fruit par macération à l'hexane et extraction des polyphénols en présence de l'éthanol.
- **Etape 3** : Fractionnement de l'extrait éthanolique et identification des nouvelles molécules.
- **Etape 4** : Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique et des fractions.

2.1. Séparation, séchage et broyage du jus de fruit.

L'*Opuntia dillenii* est une plante tropicale ou subtropicale appartenant à la famille des Cactaceae. Elle pousse de manière sauvage dans les régions arides et semi-arides. La récolte du fruit a été effectuée dans la saison de sa maturation durant le mois de Février 2017, dans la région de Nador (Kariat Arkmane).

2.2. Délipidation du jus de fruit et extraction des phénols

Les fruits récoltés ont été lavés à fond à l'eau puis, ils ont été pelés. La pulpe récupérée est ensuite placée dans un Moulinex pour séparer les graines du jus en utilisant un tamis de 2 mm. Le jus obtenu a été déshydraté par chauffage à 40 °C dans un four pendant 15 jours. Après séchage, le jus a été broyé en poudre et stocké à froid (4°C) jusqu'à utilisation. Cinquante grammes de poudre du jus de fruit sont délipidés par macération dans 200mL d'hexane pendant 24 heures sous agitation magnétique à température ambiante, à l'abri de la lumière. Le macérât est ensuite recueilli et centrifugé. Le surnageant est filtré à l'aide d'un creuset filtrant. Ensuite, le résidu de poudre est traité successivement par l'acétate d'éthyle et l'éthanol dans les mêmes conditions opératoires, Figure 1.

Le rendement massique du jus est de l'ordre de 4,4 % par rapport à la masse du fruit à l'état frais et son pH mesuré est de l'ordre de 3,2. Le rendement de l'extrait éthanolique est de 20,96 %.

Fractionnement de l'extrait éthanolique et identification des molécules isolées. La séparation des nouvelles molécules a été effectuée par fractionnement de l'extrait éthanolique par chromatographie préparative sur couche mince, en gel de silice, en présence d'un mélange de solvants constitué de toluène, d'acétate d'éthyle et de méthanol avec les proportions (85 /10 /5). L'observation des plaques CCM est effectuée sous UV (254 nm et 365 nm). Les fractions pures détectées ont été grattées, solubilisées dans l'éthanol puis filtrées et concentrées par rotavapor. Ensuite, elles ont été identifiées par une série d'analyses spectroscopiques et chromatographiques (UV, IR, MS et HPLC-DAD), Figure 2 et Tableau 1.

Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique et des fractions.

L'étude effectuée dans le cadre de la présente invention concerne l'évaluation in-vitro de l'activité anti-inflammatoire d'une part, de l'extrait éthanolique et d'autre part des nouveaux composés isolés. En pratique, deux méthodes colorimétriques sont été employées, à savoir, le contrôle de l'inhibition de la dénaturation de la lipoxigénase (LOX) et de l'albumine sérique bovine (ASB) sachant que la dénaturation des protéines est une cause d'inflammation bien démontrée.

. Protocol expérimental de l'inhibition de la dénaturation de la lipoxigénase (LOX)

Une solution constituée de 35 µL (0,1 mg/mL) de lipoxigénase (Sigma, Darmstadt, Allemagne) de 600 µL d'une solution tampon de borate 0,2 M (pH = 9,0) et de 200 µL de l'extrait éthanolique (ou des composés isolés) aux concentrations de (100 ; 75 ; 50 et 25 µg/mL dans le méthanol) a été incubée pendant 15 minutes à 25 °C. La réaction a ensuite été déclenchée par l'ajout de 35 µL d'une solution de substrat (acide linoléique 250 µL), et l'absorbance a été mesurée à 234 nm. La quercétine (Sigma, Darmstadt, Allemagne) a été utilisée comme produit de référence aux mêmes concentrations que les échantillons testés.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité lipoxigénase a été calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = (\text{Abs}_{\text{Blanc}} - \text{Abs}_{\text{Echantillon}}) / (\text{Abs}_{\text{blanc}}) \times 100$$

où $\text{Abs}_{\text{blanc}}$ est l'Absorbance du milieu réactionnel sans extrait, et $\text{Abs}_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance du milieu réactionnel avec extrait.

La concentration (CI50) de l'extrait (ou composé isolé) pour une inhibition de 50% est déterminée par la courbe dose-réponse.

. Protocol expérimental de l'inhibition de la dénaturation de l'albumine bovine (SAB)

Une solution constituée de 450 µL de Sérum-Albumine Bovine (BSA) à 2 %, de 600 µL d'une solution tampon de borate 0,2 M (pH = 9,0), de 2,5 mL d'une solution tampon de phosphate saline à un pH= 6,3 et de 50 µL de l'extrait éthanolique (ou des composés isolés) aux concentrations de (100 ; 75 ; 50 et 25 µg/mL dans le méthanol) a été incubée pendant 15 minutes à 37 °C puis chauffés à 57 °C pendant 5 minutes et ensuite refroidis pendant 10 minutes. L'absorbance a été mesurée à 660 nm. L'expérience a été effectuée à trois reprises. Le diclofénac a été utilisé comme médicament de référence aux mêmes concentrations que les échantillons. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine a été calculé en pourcentage par rapport au témoin en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = (\text{Abs}_{\text{Blanc}} - \text{Abs}_{\text{Echantillon}}) / (\text{Abs}_{\text{blanc}}) \times 100$$

où **Abs_{blanc}** est l'Absorbance du milieu réactionnel sans extrait, et **Abs_{échantillon}** est l'absorbance du milieu réactionnel avec extrait.

La concentration (CI50) de l'extrait (ou composé isolé) pour 50% d'inhibition est déterminée par la courbe dose-réponse.

Résultats

Par rapport à la masse du fruit à l'état frais, le rendement massique du jus de fruit de Nador est de l'ordre de 4,4 % avec un pH de 3,2. Le rendement de l'extrait éthanolique est de 20,96 %. Cinq composés (F1 - F5) ont été identifiés par une série d'analyses spectroscopiques et chromatographiques (UV, IR, MS et HPLC-DAD), dont F1, F2 et F4 représentent de nouvelles molécules isolées.

Les résultats obtenus de l'évaluation in-vitro de l'activité anti-inflammatoire ainsi que les valeurs IC50 de l'extrait éthanolique du fruit d'opuntia dillenii et des composés isolés sont regroupés dans le tableau 2.

Les résultats du tableau 2 montrent que le pourcentage de l'inhibition de la dénaturation des protéines augmente avec la concentration des différents échantillons testés dans les deux expériences étudiées. Un pourcentage d'inhibition de la dénaturation (BSA et LOX) de l'extrait éthanolique, fortement élevé a été enregistré pour une faible concentration de 100 µg/ mL, soit de 90,81% et 96,45%, respectivement. Les standards de référence utilisés à la même concentration (diclofénac et Quercetine) ont montré une inhibition similaire à celles de l'extrait éthanolique, soit de 93,53% et de 96,70 %, respectivement.

Par ailleurs, les fractions testées par (BSA et LOX) ont montré une inhibition significativement élevée de l'ordre de 100% relativement meilleure que celles du diclofénac et de la quercétine.

Les valeurs de IC50 de l'extrait éthanolique dans le cas de l'inhibition par la méthode BSA est de l'ordre de 12,96 µg/mL relativement identique à celle du diclofénac, soit 13,95 µg/mL. Les fractions isolées présentent approximativement un résultat similaire confirmant ainsi leur forte inhibition de la dénaturation (BSA).

Dans le cas de l'inhibition par la méthode (LOX), nous avons constaté des valeurs de IC50 relativement voisines tant pour l'extrait éthanolique que pour les fractions isolées par comparaison avec la quercétine prise comme référence.

Les résultats obtenus dans notre étude confirment que l'extrait éthanolique du fruit d'*Opuntia dillenii* ainsi que les composés isolés possèdent un potentiel anti-inflammatoire fortement élevé et relativement équivalent à celui du diclofénac connu comme médicament anti-inflammatoire et la quercétine utilisée comme complément alimentaire dans la prévention des maladies inflammatoires.

Les composés isolés de l'extrait éthanolique pourraient donc être envisagés comme principes actifs en vue de les utiliser tant que médicaments prototypes naturels, soit comme compléments avec des médicaments présents sur le marché pharmaceutique contre les troubles inflammatoires dans le but d'éliminer ou bien de réduire les effets secondaires néfastes accompagnant une longue durée de traitement des patients souffrant d'inflammation chronique.

Revendications

1. La présente invention a permis d'isoler et d'identifier cinq composés dont trois représentent de nouveaux composés, (F1, F2 et F4) à partir de l'extrait éthanolique du fruit d'opuntia dillenii.
2. L'étude effectuée dans cette invention dans le cadre de l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire par les deux méthodes d'inhibition de la dénaturation des protéines (BSA et LOX) a montré que le pourcentage d'inhibition augmente avec la concentration des différents échantillons testés (extrait éthanolique ou fractions isolées).
3. L'enregistrement d'un pourcentage maximum, fortement élevé, d'inhibition de la dénaturation (BSA et LOX) de l'extrait éthanolique, pour une faible concentration de 100 µg/ mL, soit de 90,81% et 96,45%, respectivement.
4. Les standards de référence utilisés à la même concentration, le diclofénac utilisé comme médicament de référence et la quercétine comme complément alimentaire, ont montré une inhibition similaire à celles de l'extrait éthanolique, soit de 93,53% et de 96,70 %, respectivement.
5. Les fractions testées par les deux méthodes d'inhibition de la dénaturation des protéines (BSA et LOX) ont montré une inhibition significativement élevée de l'ordre de 100% relativement meilleure que celles du diclofénac et de la quercétine.
6. La valeur de IC50 de l'extrait éthanolique dans le cas de l'inhibition par la méthode BSA est de l'ordre de 12,96 µg/mL relativement identique à celle du diclofénac, soit 13,95 µg/mL. Les fractions isolées présentent approximativement un résultat similaire confirmant ainsi leur forte inhibition de la dénaturation (BSA).
7. Dans le cas de l'inhibition par la méthode (LOX), nous avons constaté des valeurs de IC50 relativement voisines tant pour l'extrait éthanolique que pour les fractions isolées par comparaison avec la quercétine prise comme référence.
8. Les résultats obtenus dans la présente invention confirment que l'extrait éthanolique du fruit d'opuntia dillenii ainsi que les composés isolés possèdent un potentiel anti-inflammatoire fortement élevé et relativement équivalent à celui du diclofénac connu comme médicament anti-inflammatoire et la quercétine utilisée comme complément alimentaire dans la prévention des maladies inflammatoires.
9. Les composés isolés de l'extrait éthanolique pourraient donc être envisagées comme principes actifs en vue de les utiliser entant que médicaments prototypes naturels, soit comme compléments avec des médicaments présents sur le marché pharmaceutique contre les troubles inflammatoires dans le but d'éliminer ou bien de réduire les effets secondaires néfastes accompagnant une longue durée de traitement des patients souffrant d'inflammation chronique.

Planche de dessins

(Jus de fruit séché et broyé)

Hexane (24 °C, 24 h)

Huile

Résidu 1

Acétate d'Ethyle (24 °C, 24h)

Extrait d'acétate

Résidu 2

Ethanol (24 °C, 24h)

Extrait d'éthanol

Résidu 3

Figure.1 : Processus d'extraction des lipides et des polyphénols

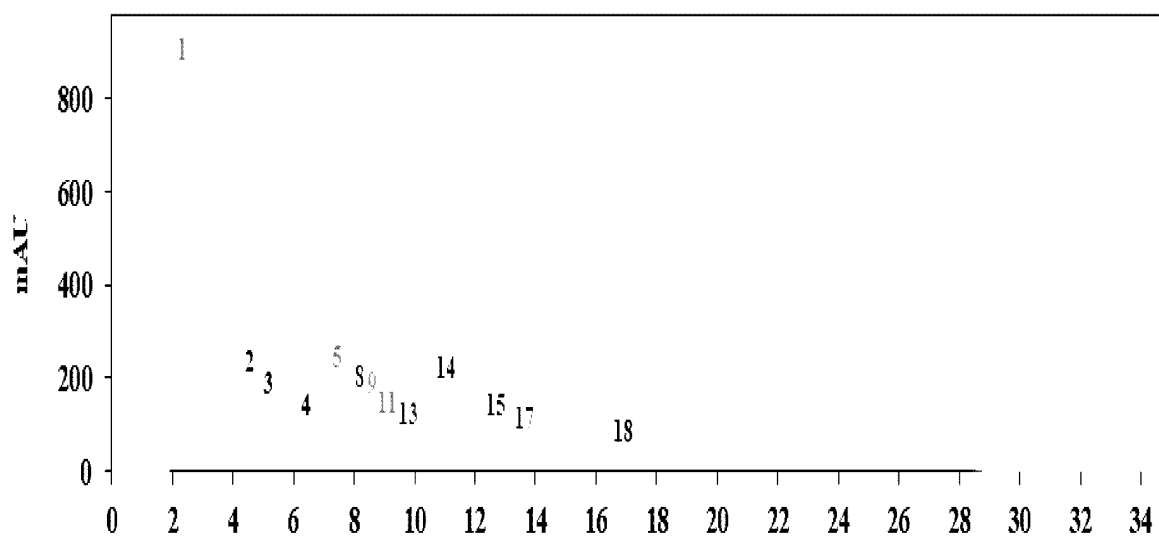
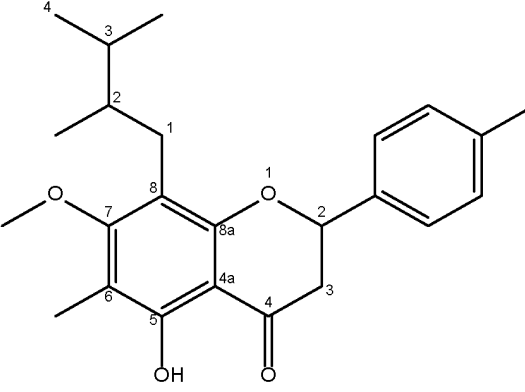
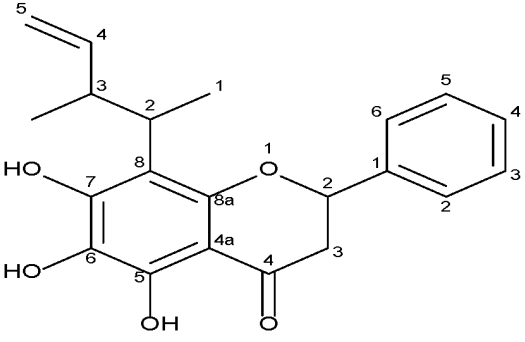
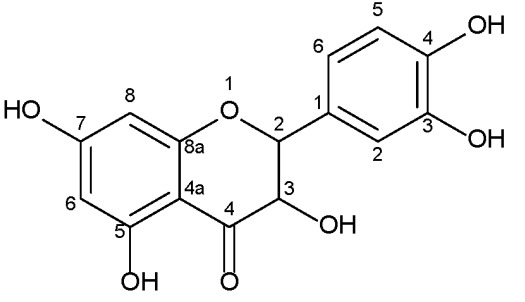
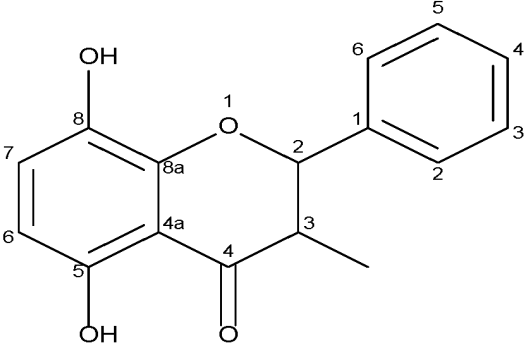
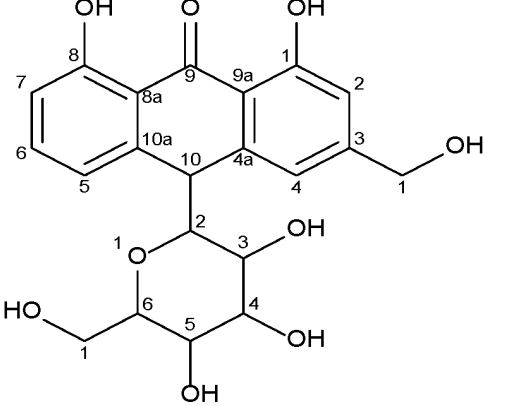


Figure 2: Chromatogramme HPLC-DAD de l'extrait d'éthanol du jus de fruit par HPLC-DAD

Tableau 1 : Bilan des molécules isolées de l'extrait d'éthanol du jus d'*Opuntia dillenii* par LC- MS (APCI)

MOLECULES ISOLEES	Tr ^(a) (Min)	MASSE MOLAIRE (g/Mole)	STRUCTURE
<p><u>F1</u></p> <p>8-(2,3-dimethylbutyl)-5-hydroxy-7-methoxy-6-methyl-2-(p-tolyl)chroman-4-one</p>	8,81	382	
<p><u>F2</u></p> <p>5,6,7-trihydroxy-8-(3-methylpent-4-en-2-yl)-2-phenylchroman-4-one</p>	10,07	381	
<p><u>F3</u></p> <p><u>Taxifoline</u></p> <p>2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychroman-4-one</p>	10,61	304	

<p style="text-align: center;"><u>F4</u></p> <p>5,8-dihydroxy-3-methyl-2-phenylchroman-4-one</p>	12,98	270	
<p style="text-align: center;"><u>F5</u></p> <p style="text-align: center;"><u>Aloïne</u></p> <p>10-glucopyranosyl-1,8-dihydroxy-3-(hydroxyméthyl)-9(10H)-anthracénone</p>	13,48	418	

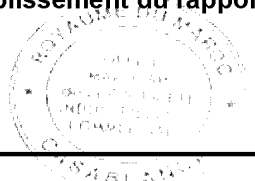
(a) Tr : temps de rétention en minutes.

Tableau 2 : Pourcentage d'inhibition *in-vitro* et valeurs IC₅₀ de l'activité anti-inflammatoire.

ECHANTILLONS / REFERENCES	CONCENTRATION ($\mu\text{g/mL}$)	METHODE (SAB)		METHODE (LOX)	
		Pourcentage d'inhibition (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Pourcentage d'inhibition (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Extrait de jus	100	90,81	13,34 \pm 0,18	96,45	94,43 \pm 4,50
F1	100	97,16	13,17 \pm 0,17	93,59	89,72 \pm 3,97
F2	100	98,81	13,01 \pm 0,19	95,44	94,59 \pm 4,23

F3	100	99,93	12,96±0,11	98,22	91,56±5,47
F4	100	98,68	13,75±0,72	86,25	99,91±0,38
F5	100	92,52	13,05±0,86	98,22	86,61±3,56
Quercétine	100	-	-	96,70	89,41±2,11
Diclofénac	100	93,53	13,95±0,70	-	-

**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 : 60999	Date de dépôt : 02/06/2023
Déposant : UNIVERSITE MOHAMMED PREMIER - OUJDA	
Intitulé de l'invention : Nouveaux anti-inflammatoires naturels isolés du jus de fruit d'Opuntia dillenii.	
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 forme et de clarté	
<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 : Meslohi Hicham	Date d'établissement du rapport : 07/06/2023
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
4 Pages
- Revendications
9
- Planches de dessin
4 Pages

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB : A61K36/33, A61P 29/00

CPC : A61K2236

Plateformes et bases de données électroniques de recherche :

EPOQUENET, WPI, ScienceDirect, IEEE, ORBIT

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
A	Ahmed MS et al, Antiinflammatory flavonoids from Opuntia dillenii (Ker-Gawl) Haw. flowers growing in Egypt. Phytother Res. 2005 Sep;19(9):807-9. doi: 10.1002/ptr.1708. PMID: 16220577.	1
X		2-9
A	Park, EH et al. Studies on the pharmacological actions of cactus: Identification of its anti-inflammatory effect. Arch. Pharm. Res. 21, 30-34 (1998)	1
X		2-9

***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 forme et de clarté**

L'objet des revendications 1-9, ne satisfait pas aux exigences de clarté conformément à l'article 35 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13 :

- Pour une bonne compréhension des revendications, elles doivent être rédigées en deux parties comme suit :
 - « Composé(s) de formule (X) suivante : ... **Dans laquelle:**... ».
 - « Composé(s) selon la revendication... **pour une utilisation**... ».
- Les revendications 2-9 tentent de définir l'objet par le résultat recherché, ce qui revient simplement à énoncer le problème sous-jacent, sans indiquer les caractéristiques techniques nécessaires pour parvenir à ce résultat.
- Il semble que le déposant a omis d'introduire dans la revendication 1 des caractéristiques essentielles à l'invention à savoir la formule des composés F1, F2 et F4.

Le déposant est invité à reformuler les revendications de manière correcte de façon à y introduire toutes les caractéristiques techniques essentielles de l'invention afin de remédier à ce problème de clarté.

Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté	Revendications 1	Oui
	Revendications 2-9	Non
Activité inventive	Revendications 1	Oui
	Revendications 2-9	Non
Application Industrielle	Revendications 1-9	Oui
	Revendications Aucune	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 : Antiinflammatory flavonoids from *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw. flowers growing in Egypt.

1. Nouveauté

Le document D1 décrit une étude sur l'activité anti-inflammatoire des extraits alcooliques des fleurs, des fruits et des tiges de l'*Opuntia dillenii*. L'extrait alcoolique des fleurs a révélé l'effet anti-inflammatoire le plus puissant et une action analgésique prononcée à la dose de 200 mg/kg.

Ainsi, l'objet des revendications 2-9 n'est pas nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

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 D1 est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1.

La différence entre la revendication 1 et le document D1 réside dans l'identification des trois composés (F1, F2 et F4).

L'effet technique lié à cette différence est que les composés identifiés ont un fort pouvoir anti-inflammatoire.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut-être considéré comme l'identification de nouveaux composés anti-inflammatoires obtenu à partir de l'extrait éthanolique du fruit d'opuntia dillenii

La solution proposée par la présente demande implique une activité inventive pour les raisons suivantes :

- Les tests expérimentaux fournis par le déposant prouvent que les composés F1, F2 et F4 résolvent le problème posé.
- Aucun des documents de l'art antérieur ne suggère l'isolation des composés revendiqués et leur utilisation en tant qu'anti-inflammatoires.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 implique une activité inventive conformément à 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.