

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
7 septembre 2007 (07.09.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/100236 A2

(51) Classification internationale des brevets : Non classée

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/MA2006/000005

(22) Date de dépôt international :
13 décembre 2006 (13.12.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
28668 15 décembre 2005 (15.12.2005) MA

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : UNI-
VERSITE CADI AYYAD [MA/MA]; Boulevard Prince
My Abdellah, B.P. 511, Marrakech 40000 (MA).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : MALAIN-
INE, Mohamed, Elaghdef [MA/MA]; N 1 IMM 91, Rue
Taha Houssine Amerchich, Marrakech 40000 (MA).

(74) Mandataire : MALAININE, Mohamed, Elaghdef; N 1
IMM 91, Rue Taha Houssine Amerchich, Marrakech 40000
(MA).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: AN ARABINOGALACTAN PROTEIN HAVING THE PROPERTY OF ABSORBING FATS AND METHOD FOR
OBTAINING THIS ARABINOGALACTAN PROTEIN

(54) Titre : UNE ARABINOGALACTANE PROTEINE AYANT LA PROPRIÉTÉ D'ABSORBER LES GRAISSES ET LE PRO-
CEDE D'OBTENTION DE CETTE ARABINOGALACTANE PROTEINE

(57) Abstract: The invention relates, firstly, to a method for eliminating ingested dietary fats before they are assimilated by the
body, using an AGP extracted from cactus mucilage. Said AGP can be in any galenic or commercial form which is solid or dissolved
in water. The invention also discloses the method of extracting this AGP from the mucilage of a cactus of the *Platyopuntia* genus,
by means of a process which makes it possible to preserve the polysaccharide-protein association, which association is responsible
for the observed activity.

(57) Abrégé : L'invention vise en premier lieu, une méthode pour éliminer les graisses alimentaires ingérées avant leur assimilation
par l'organisme en utilisant une AGP extraite du mucilage de cactus. La dite AGP peut se présenter sous toute forme galénique ou
commerciale, solide ou dissoute dans l'eau. L'invention divulgue également le mode d'extraction de cette AGP à partir du mucilage
d'un cactus du genre *platyopuntia*, par un processus permettant de préserver l'association polysaccharide-protéine, association res-
ponsable de l'activité constatée.

WO 2007/100236 A2

Une arabinogalactane protéine ayant la propriété d'absorber les graisses et le procédé d'obtention de cette arabinogalactane protéine

Description

Abréviation: AGP(s) = Arabinogalactane(s) protéine(s)
AG(s) = Arabinogalactane(s)

Domaine technique de l'invention

La présente invention est liée aux méthodes de contrôle du poids et de réduction de cholestérol sans nécessité de restriction de l'apport calorique alimentaire.

Etat de la technique antérieur

Dans le domaine des méthodes de contrôle du poids et de réduction de cholestérol sans restriction sur l'apport calorique alimentaire, on connaît plusieurs techniques :

- Inhibition des lipases, [T. Kazuyo & H. Tetsuya brevet d'invention WO2005099735]
- Blocage des récepteurs d'acide gras [Xenical de ROCHE, commercialisé sous Oristat]
- Complexation physique des lipides etc...

Dans les deux premières, il s'agit neutraliser des processus physiologiques, en utilisant des drogues actives sur l'organisme.

Dans la dernière technique, il s'agit de favoriser une interaction physique entre les lipides et un composé alimentaire qui ne possède pas d'autres interactions physiologiques particulières sur l'organisme.

A ce titre, on ne reconnaît comme matériaux efficaces que deux produits : le chitosane [Furda. Brevet d'invention américain N°4223023 de 1980] et la poudre de nopal. [D'Huart & Dallas, Brevet d'invention français N°FR2823423 de 2002]

Du point de vue de l'efficacité, le premier, même additionné de fibres, possède une capacité limitée de fixation dans les conditions physiologiques. De plus, à cause du changement de pH dans les intestins, il se produit un phénomène de re-largage des lipides, qui les libère de la fixation au chitosane. Le résultat étant que les lipides peuvent être assimilés par l'organisme.

Quand à la poudre de nopal, c'est un matériau hétérogène, d'origine naturelle donc de composition variable dans le temps, mais ayant prouvé une capacité de fixation de graisse équivalente ou même supérieure à celle du chitosane.

Il s'agit en fait des feuille (appelées aussi cladodes) de certaines cactacées comestibles de type platyopuntia, et surtout de l'espèce *Opuntia ficus indica* (communément appelée Nopal), qui

sont consommées dans le cadre de régimes alimentaires pour le traitement de l'obésité, de l'hyperlipidémie, et du diabète. Il existe un brevet français sur l'utilisation des cladodes dans une préparation ayant la propriété de fixer les graisses. [D'Huart & Dallas, Brevet d'invention français N°FR2823423 de 2002]

Dans ce brevet, la plante séchée et broyée est utilisée entière. Le principe actif responsable de la fixation n'est pas divulgué.

Le problème est de trouver un principe actif qui soit :

- capable de mieux absorber, fixer puis éliminer les graisses,
- dont cette capacité se maintient en milieu physiologique,
- n'ayant aucune interaction physiologique potentiellement dangereuse sur l'organisme,
- et qui soit stable dans le temps.

Les AGPs sont très répandues dans le monde végétal. Cette association de polysaccharides et de protéines semble avoir des fonctions physiologiques importantes pour les plantes. La partie osidique (AG) a aussi une grande importance commerciale, d'où un intérêt scientifique marqué par le nombre de publications et de brevets qui les concernent. La structure des AGs a été extensivement étudiée. Voir par exemple E.G., Timell, Adv. Carbohydrate Chem., Vol. 20, pp. 409-483 (1965).

Les arabinogalactanes sont des polysaccharides dont l'ossature est constituée de chaînes de béta-(1,3)-galactane, densément branchées par des chaînes latérales constituée d'unités arabinose, galactose et souvent d'autres résidus mineurs.

Une des plus anciennes sources d'AGs est la gomme arabique, exsudat d'*Acacia Senegal*. Une source plus récente d'AGs relativement pures est l'extrait du bois de *Larex Occidentalis*. Ces AGs sont utilisées en industrie agroalimentaire et cosmétique en tant qu'agent de texture, de gélification et comme émulsifiant facilitant le mélange eau – huile.

Aucune revendication, ni publication antérieure ne lie directement une AGP à une propriété d'absorption et de fixation de graisse.

C'est l'objet principal de cette invention.

Résumé de l'invention

Il s'agit en premier lieu, d'une méthode pour éliminer les graisses alimentaires ingérées avant leur assimilation par l'organisme en utilisant une AGP extraite du mucilage de cactus. La dite

AGP peut se présenter sous toute forme galénique ou commerciale, solide ou dissoute dans l'eau.

Il s'agit aussi du mode d'extraction de cette AGP à partir du mucilage d'un cactus du genre *platyopuntia*, par un processus permettant de préserver l'association polysaccharide–protéine, association responsable de l'activité constatée.

Objet de l'invention

L'invention vise à proposer une méthode basée sur un produit, et un procédé d'obtention d'un tel produit, ayant la propriété de fixer les graisses. Elle vise à proposer un produit pouvant être ingéré sans risque (c'est-à-dire ne présentant aucune nocivité) et ayant la propriété de fixer des graisses *in vivo* en vue de les soustraire à la digestion.

L'invention vise d'abord, une méthode pour absorber, fixer puis éliminer les graisses alimentaires ingérées avant leur assimilation par l'organisme en utilisant une AGP extraite du mucilage de cactus.

Les AGs commerciales possèdent toutes une bonne capacité émulsifiante. Il est normal de s'attendre à ce que cette capacité améliore le transport des graisses alimentaires et leur assimilation ultérieure par l'organisme qui les ingère.

Un homme de métier s'attend à ce que l'AGP extraite du mucilage des cactées se comporte de façon similaire, vu la structure du polysaccharide qui la constitue.

Mais si on utilise l'AGP décrite dans cette invention, après mélange avec une mixture eau–huile, (voir : test de fixation dans les exemples), il se forme une émulsion provisoire qui produit un gel piégeant toute la phase grasseuse. Cet effet rend les graisses indisponibles à l'assimilation par l'organisme qui les ingère.

Du fait de sa solubilité dans l'eau, l'AGP extraite du cactus, objet de cette invention, peut se présenter sous toute forme galénique ou commerciale, solide ou dissoute dans l'eau. Elle peut être conditionnée seule, sous forme de comprimés, gélules, capsules souples ou rigides ou tout simplement de poudre à dissoudre dans une boisson (eau ou autre soda, jus de fruit, etc.) ou à saupoudrer sur un aliment. Elle est alors de préférence ingérée au cours d'un repas.

L'invention est donc étendue à toute préparation, contenant de l'AGP extraite du mucilage de cactus, ayant la propriété de fixer des graisses alimentaires ingérées, de façon à minimiser leur assimilation.

Il s'agit aussi du mode d'extraction de cette AGP à partir du mucilage d'un cactus du genre *platyopuntia*, par un processus permettant de préserver l'association polysaccharide–protéine, association responsable de l'activité constatée.

Ce mode d'extraction, sans solvant, sans matière étrangère ajouté, représente une véritable garantie sur l'innocuité de l'AGP extraite du mucilage de cactus.

Il s'agit dans un premier temps d'isoler l'AGP (très soluble) des autres constituants du cactus sans la détériorer. Cet effet est obtenu avantageusement selon l'invention, en macérant sous atmosphère inerte de l'eau purifiée soit avec des raquettes de cactus, préalablement coupées en morceaux (variante 1), soit avec de la poudre de raquettes de cactus séchées (variante 2).

La macération doit s'effectuer assez vite, et à basse température. La macération est immédiatement suivie par une séparation solide liquide. La séparation est avantageusement opérée par centrifugation et filtration.

La solution d'AGP obtenues est ensuite purifiée. Cette purification est obtenue avantageusement selon l'invention, en la soumettant à une dialyse contre de l'eau distillée, pour éliminer les sels, et les molécules de petit poids moléculaire.

La solution d'AGP purifiée est ensuite concentrée. La concentration est obtenue avantageusement selon l'invention, dans une enceinte sous vide partiel et à basse température.

La solution concentrée d'AGP est ensuite séchée. L'élimination de l'eau peut se faire de deux façons avantageuses selon l'invention. Soit par lyophilisation, soit par atomisation.

Dans les exemples de réalisations de l'invention plusieurs possibilités sont données à titre indicatif et ne sont pas limitatifs.

Exemples

1. Test de fixation

L'AGP produite selon l'invention est comparée à des produits commerciaux ayant la propriété de fixer les graisses.

Mode opératoire du test de fixation

Matériel:

- Etuve réglée à 37 C
- Balance de précision à 0,1 mg
- Becher 250 ml
- Tubes bouchés à centrifuger en verre de 85 ml (dimensions 44x98 mm)

- Micropipettes 100 μ l et 1000 μ l
- Centrifugeuse réglée à 2000 tours/min (670g)

Réactifs:

- Acide chlorhydrique 0,1N
- Tampon: acide tris(hydroxyméthyl)aminométhane 120 g
HCl35% 49 ml
eau 200 ml

Opérations :

Cinq tubes à essais contenant chacun 7,5 ml d'HCl 0,1N et 6 g (masse M) d'huile de tournesol, sont préparés. Dans chaque tube, on met 100 mg (masse M1) de la préparation à tester (poudre de cactus de type Neopuntia ®, chitosane de type Absorbitol ®, AG commerciale de type Larex UF ® ou Acacia gum, ou AGP préparée selon l'invention).

Les solutions obtenues sont mélangées vivement, en agitant le tube à la main pendant 30s, et placées dans une étuve à 37 °C pour une incubation de 2 heures. 0,5 ml d'une solution tampon de pH 7,3 sont ensuite ajoutés dans chacun des tubes. Après une nouvelle agitation manuelle, les tubes sont remis dans l'étuve à 37 °C pendant 3 heures. Ils sont ensuite centrifugés pendant 5 minutes à 2000 tours/min. La matière grasse surnageante est ensuite prélevée et pesée (masse M2), et le rapport de la masse de corps gras fixée par la préparation (M-M2) sur la masse de préparation mis en oeuvre (M1), dit rapport de fixation, est calculé.

Pour chaque préparation testée, le test est répété trois fois.

Résultats

| Préparation | Marque déposée ou dénomination commerciale | Rapport de fixation* |
|---|--|----------------------|
| Poudre de cactus | Neopuntia ® | 12 \pm 2 |
| Chitosane | Absorbitol ® | 11 \pm 2 |
| Arabinogalactane de <i>larex occidentalis</i> | Larex UF ® | 0 |
| Gomme arabique d' <i>acacia senegal</i> | Acacia gum | 4 \pm 2 |
| AGP selon invention variante 1 | - | 31 \pm 2 |
| AGP selon invention variante 2 | - | 28 \pm 2 |

* le rapport de fixation est défini par : masse d'huile fixée (M-M2) divisée par masse de préparation utilisée (M1). $R = (M-M2)/M1$

Il est clair que l'AGP préparée selon l'invention, non seulement dépasse tous les agents de fixation de graisse connus sur le marché (une capacité triple), mais aussi se diffère grandement des arabinogalactanes commerciales qui ne donnent généralement pas de bons rapports de fixation.

2. Exemple de procédé d'extraction de l'AGP

Le mode d'extraction divulgué par cette invention vise à préparer une arabinogalactane protéine de haut poids moléculaire sans provoquer la rupture des liaisons entre le fragment polysaccharide et le fragment protéine.

Il s'agit également d'un procédé propre, sans solvant, sans matière étrangère ajouté, représente une véritable garantie sur l'innocuité de l'AGP extraite du mucilage de cactus.

Matériel

- Un chariot élévateur à balance incorporé (sensible à 1 kg).
- Une cuve agitée à double enveloppe.
- Un décanteur –centrifuge NX 314, réglé à 500g.
- Une centrifugeuse – écrémeuse SC35, réglée à 20000g.
- Un filtre –presse ORION 20 plaques (40x40 cm).
- Des plaques filtrantes de type KS80.
- Un évaporateur à flots tombants ADF.
- Une tour d'atomisation APV PSD 52.
- Un lyophilisateur de laboratoire.
- Une pompe à membrane.
- Des flexibles.

Mode opératoire variante 1

Dans la cuve agitée, on met 100 kg d'eau purifiée par osmose inverse, et on fait barboter de l'azote dans l'eau. Le chauffage de la cuve est ensuite lancé et réglé à 50°C. Une fois cette température atteinte, on ajoute 100 kg de raquettes de cactus de type opuntia ficus indica découpées. L'agitation est maintenue 30 minutes, puis le contenu de la cuve est transféré via la pompe à membrane au décanteur –centrifuge selon un débit de 1000 l/h. Le liquide récupéré est passé à la clarification dans la centrifugeuse –écrémeuse travaillant à 500 l/h. Le jus clair est passé à travers le filtre –presse, sur des plaques KS80 sous pression de 2 bars. Le

jus brillant obtenu est ensuite dialysé contre de l'eau purifiée, sur des membrane à coupure 10000 daltons, puis concentré dans l'évaporateur à flots tombant ADF pendant 90 minutes. On prélève 1 l de concentré pour le passer à la lyophilisation. Le reste est passé sur la tour d'atomisation travaillant à une température d'air chaud de 190°C. Dans les deux cas (lyophilisation ou atomisation), la poudre d'AGP obtenue est de couleur jaune clair.

Mode opératoire variante 2

Dans la cuve on met cette fois 300kg d'eau purifiée et on fait barboter l'azote. Le chauffage est lancé et on attend que la température d'eau atteint 50°C. On ajoute, sous agitation, 20 kg de poudre de nopal de granulométrie comprise entre 150 et 300 µm. le reste du protocole est inchangé.

Caractérisation de l'AGP

Pour caractériser l'AGP extraite selon les deux protocoles, nous avons déterminé la composition du polysaccharide (arabinose, galactose, xylose, rhamnose et acides uroniques) et le pourcentage de protéine dans l'AGP.

| | Variante 1 | Variante 2 |
|------------------|------------|------------|
| Arabinose | 40,8% | 31,3% |
| Galactose | 40,4% | 34,9% |
| Xylose | 7,2% | 13,0% |
| Rhamnose | 2,3% | 3,4% |
| Acides uroniques | 2,3% | 3,4% |
| Protéines | 7,0% | 14,1% |

Une arabinogalactane protéine ayant la propriété d'absorber les graisses et le procédé d'obtention de cette arabinogalactane protéine

Revendications

Ce qui est revendiqué ici :

1. Une méthode de fixation de graisses alimentaires contenues dans un repas pour empêcher leur assimilation par un organisme à sang chaud, caractérisée en ce que l'agent utilisé pour réaliser la fixation soit une arabinogalactane protéine.
2. Une méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'arabinogalactane protéine est extraite d'un cactus comestible du genre *platyopuntia*.
3. Une méthode selon les revendications 1 et 2, caractérisée en ce que l'arabinogalactane protéine comporte un rapport d'arabinose au galactose compris entre 0.3 et 1.6.
4. Une méthode selon les revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le poids de la protéine dans arabinogalactane protéine soit compris entre 7% et 15%.
5. Un procédé d'extraction d'une arabinogalactane protéine à partir du mucilage d'un cactus comestible, par macération dans l'eau des cladodes du dit cactus, puis séparation des insolubles, puis purification de la solution de l'arabinogalactane protéine par osmose, suivie d'une concentration puis d'une élimination de l'eau, caractérisée en ce que la macération se passe en atmosphère inerte.
6. Un procédé selon la revendication 5, caractérisée en ce que la température de la macération soit comprise entre 15 et 50°C.
7. Un procédé selon les revendications 5 et 6, caractérisée en ce que la séparation se fasse par centrifugation.
8. Un procédé selon les revendications 5 à 7, caractérisée en ce que la purification se fasse par dialyse contre de l'eau pure dans des membranes appropriée.
9. Un procédé selon les revendications 5 à 8, caractérisée en ce que la concentration se fasse sous vide à une température comprise entre 30 et 45°C.
10. Un procédé selon les revendications 5 à 9, caractérisée en ce que l'élimination de l'eau se fasse par lyophilisation.
11. Un procédé selon les revendications 5 à 9, caractérisée en ce que l'élimination de l'eau se fasse par atomisation.