



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 35/78	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/29128 (43) Date de publication internationale: 9 juillet 1998 (09.07.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/02375 (22) Date de dépôt international: 22 décembre 1997 (22.12.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/16116 27 décembre 1996 (27.12.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INOVAT SARL [TN/TN]; c/o Cabinet Ellouze, Cité Mahrajane, Immeuble Chiaar, Appartement A, Menzah 1, Tunis 1002 (TN). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GUTIERREZ, Gilles [FR/FR]; 39, rue Lieutenant Colonel Prévost, F-69006 Lyon (FR). SERRAR, Mostafa [FR/FR]; 81, rue du 1er-Mars-1943, F-69100 Villeurbanne (FR). VIORNERY, Lionel [FR/FR]; 99, rue Ney, F-69006 Lyon (FR). NOR-TON, James [GB/GB]; Fillongley Hall, Near Coventry, Worschire CV7 8AH (GB). (74) Mandataire: BURTIN, Jean-François; Cabinet Gefib, 85, rue Anatole France, F-92300 Levallois Perret (FR).		(81) Etats désignés: AU, JP, US, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, METHOD FOR OBTAINING AND COMPOSITIONS CONTAINING THEM (54) Titre: SUBSTANCES A ACTIVITE BIOLOGIQUE, LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET LES COMPOSITIONS EN RENFER-MANT (57) Abstract The invention concerns the field of biochemistry, and more precisely biological substances of vegetable origin. The invention concerns novel substances having non-cytotoxic biological activity, extracted from plants with CAM metabolism, such as plants of the Cactaceae, Crassulaceae and Saxifragaceae family. The invention also concerns the method for obtaining these substances as well as compositions containing them. Said compositions are designed for accelerating and amplifying the synthesis of thermal shock proteins of cells of living beings in vivo or in vitro. (57) Abrégé La présente invention se rapporte au domaine de la chimie biologique, et plus précisément à des composés biologiques d'origine végétale. La présente invention concerne de nouvelles substances à activité biologique, non cyto-toxiques, extraites de fruits de plantes à métabolisme CAM, comme les plantes de la famille des Cactacées, des Crassulacées et des Saxifragacées. La présente invention concerne encore le procédé d'obtention de ces substances ainsi que les compositions en renfermant. Les compositions de la présente invention sont destinées à accélérer et amplifier la synthèse des protéines de choc thermique des cellules des êtres vivants in vivo ou in vitro.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

SUBSTANCES A ACTIVITE BIOLOGIQUE, LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET LES COMPOSITIONS EN RENFERMANT

La présente invention se rapporte au domaine de la biochimie, et plus précisément à des composés biologiques d'origine végétale.

La présente invention concerne de nouvelles substances à activité biologique extraites de fruits des plantes à métabolisme CAM, leur procédé d'obtention et les compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires en renfermant.

Les compositions de la présente invention sont destinées à accélérer et amplifier la synthèse des protéines de choc thermique (ou protéines de stress) des cellules des êtres vivants. En effet, les conditions de stress ou d'agression sont de nature à altérer la qualité de la synthèse des protéines. Les eucaryotes ont été amenés à développer des voies métaboliques destinées à préserver leur structure.

Les plantes à métabolisme CAM appartiennent principalement aux familles des Cactacées, des Crassulacées et des Saxifragacées, qui forment la seule entité susceptible de développer ce type de métabolisme.

Ces plantes sont particulièrement adaptées aux conditions climatiques sévères et possèdent un métabolisme chlorophyllien particulier faisant intervenir un cycle du carbone, appelé CAM (« Crassulacees Acid Metabolism »).

Certaines plantes sont aptes à vivre dans des conditions stressantes (c'est notamment le cas des plantes vivant dans les zones arides des déserts chauds ou froids ou dans les zones d'altitude), et possèdent un métabolisme particulier d'incorporation du CO₂, appelé CAM. Les plantes de la famille des Cactacées, des Crassulacées et des Saxifragacées sont bien adaptées à ces conditions de stress thermique. La synthèse des substances biologiques activant ou amplifiant l'expression des protéines de choc thermique est surtout abondante dans le fruit lors de sa formation ; la maturation du fruit se fait surtout en période de retour à une température normale. Le fruit étant très exposé à la chaleur, il y a tout lieu de penser qu'il dispose de moyens pour protéger ses synthèses protéiques.

Cette mesure de protection pourrait se retrouver également dans d'autres espèces vivantes.

Parmi les plantes à métabolisme CAM, on citera particulièrement les Cactacées. Les Cactacées constituent une famille de plantes dicotylédones, communément appelées cactus, appréciées pour leurs formes curieuses et leurs fleurs brillamment colorées. Un des genres les plus répandus de la famille des Cactacées est constitué par les Opuntias. L'Opuntia ficus-indica ou figuier de Barbarie (famille des Cactacées) est formé d'articles aplatis, de forme ovale, les « raquettes », dont la surface est parsemée d'aréoles. Chacune d'elles comprend un point végétatif dormant, protégé par des soies, des poils barbelés ou glochidies (caractéristiques du genre), des épines ; elles constituent ainsi l'homologue des bourgeons. Sur les jeunes pousses, les aréoles sont axillées par de petites feuilles charnues, rapidement caduques.

La croissance et la prolifération des organismes vivants supposent une grande autonomie non seulement pour restaurer le matériel génétique, garant de la pérennité de l'espèce, mais aussi pour réparer les lésions de leur corps, afin de préserver leur intégrité. Ces deux nécessités font appel à des systèmes biologiques complémentaires.

On a déjà découvert divers mécanismes utilisés par les cellules pour assurer la conservation intacte du patrimoine génétique ; à titre d'exemple, on peut citer le système de la protéine p 53. De même, il existe des mécanismes pour assurer la conformité structurale des protéines élaborées à partir de la transcription des informations contenues dans le génome. Ces mécanismes de protection des synthèses utilisent divers procédés et, parmi ceux-ci, la synthèse de ce que l'on appelle « protéines de choc thermique », malgré qu'elles ne répondent pas uniquement de manière spécifique aux stress thermiques.

Le terme de stress doit être pris au sens large : il comprend des stress de diverses origines, qu'il s'agisse d'élévation de température (d'où le nom de protéines de choc thermique), de stress oxydatifs, d'irradiations aux UV, d'infections virales ou bactériennes, ou de stress consécutifs à divers stimuli tels qu'une déprivation nutritionnelle, une agression mécanique ou un choc métabolique. C'est pourquoi, les protéines de choc thermique sont synthétisées par les cellules pour répondre aussi bien aux agressions d'origine chimique (poisons, ...), physique (rayonnements ionisants, osmolarité, pH, ...), biologique (cytokines), ou mécanique.

Les protéines de choc thermique (HSP) sont des protéines chargées de protéger la cellule, et plus particulièrement ses synthèses protéiques, des agressions de toutes origines.

Avec l'âge, les capacités de synthèse protéique diminuent considérablement, et de ce fait l'aptitude à répondre à une agression est de moins en moins adaptée. Ceci a pour conséquence la mort de nombreuses cellules, le défaut de protection, et une diminution du capital cellulaire, qui se traduit, notamment au niveau de la peau des mammifères, par la diminution du nombre de kératinocytes disponibles pour protéger le derme. Le temps, l'exposition au soleil et les variations de température induisent des agressions agressant les cellules. La peau du jeune adulte humain est particulièrement bien adaptée pour répondre rapidement à l'agression car elle est capable de synthétiser de grandes quantités de protéines de choc thermique pour protéger la conformation des protéines au cours de la synthèse. Avec l'âge, les capacités de synthèse des protéines de choc thermique diminuent.

La protection solaire de la peau est l'un des soins les plus demandés par les consommateurs et les plus recommandés par les prescripteurs. La variabilité de la couche d'ozone protectrice, la recherche de la chaleur estivale, les possibilités de voyage sous les tropiques ont considérablement aggravé le risque d'apparition des troubles cutanés ayant pour origine l'exposition solaire et l'agression thermique. Aujourd'hui, la protection vis-à-vis des rayonnements UV et IR existe sous différentes possibilités de filtration ou de réflexion, mais, il n'existe pas de produits à appliquer sur la peau, pour la protéger contre la chaleur ou un froid excessif.

Le corps utilise les protéines de choc thermique pour prévenir les dommages induits par de nombreux types d'agression : agressions venant de l'extérieur (rayonnement photolumineux, thermique, composés chimiques ou biologiques), mais aussi agressions venant de l'intérieur (hyperthermie, hypothermie, variation des paramètres biologiques, comme par exemple l'osmolarité, la concentration en certaines substances, etc.).

Les protéines de choc thermique sont aussi appelées protéines de stress, protéines de choc ou, en terminologie anglo-saxonne, « heat shock protein » ; la terminologie scientifique les dénomme HSP. Ces protéines peuvent encore être appelées, pour certaines, protéines chaperonnes, et pour d'autres, « glucose regulated protein » (GRP).

Les protéines de choc thermique (HSP) regroupent un très grand nombre de molécules. Aussi, pour simplifier leur dénomination, il est convenu de les définir spécifiquement par leur poids moléculaire, exprimé en kilodaltons (kDa). On distingue ainsi différents groupes de HSP : les hsp 110, (110 kDa), hsp 90, (90 kDa), hsp 70, (70 kDa) qui représentent la plus grande famille de hsp ; les hsp 60, (60 kDa), hsp 47, (47 kDa) et les hsp de petite taille (soit entre 16 et 40 kDa).

Les protéines de choc thermique constituent une grande famille moléculaire intervenant dans le maintien de la conformation spatiale des protéines. C'est ainsi que lors d'une élévation de température, les protéines voient leur structure spatiale modifiée (il s'agit du même phénomène que la coagulation de l'albumine en milieu acide).

Le grand nombre de HSP provient du fait qu'elles agissent avec une spécificité qui dépend du type cellulaire, de leur destination ou encore du type de stress. Ainsi, chaque membre de la famille des HSP a une fonction bien précise et les points d'intervention sont très nombreux. Les HSP s'appliquent non seulement aux étapes post-traductionnelles s'inscrivant dans une fonction normale de la synthèse et de la vie des protéines, comme la mise en place de la conformation et leur transport, mais aussi au niveau d'événements altérant la synthèse protéique en intervenant dans la sélection des voies métaboliques : restauration, destruction et élimination des substrats modifiés. Certains HSP ont une action qui se développe lors d'une agression thermique, d'autres ne jouent leur rôle qu'en présence d'un risque chimique.

Il existe donc un grand nombre de protéines de choc, chacune adaptée à un mécanisme particulier de protection.

Ces substances, de nature protéique, sont codées par des gènes pour lesquels la localisation chromosomique n'est établie que pour quelques uns. Il faut noter que ces substances sont maintenues en l'état d'une manière tout à fait constante tout au long de la phylogénie tant sur le plan de la séquence que de la fonction, ce qui veut dire que les conséquences de la stimulation ou les modifications de la synthèse se retrouvent non seulement avec des cellules humaines, mais sans doute avec les cellules de toutes les espèces animales.

Bien que les HSP 70 soient synthétisées de manière constitutive, pour résister aux agressions, les cellules synthétisent, en cas de nécessité, de grandes quantités de

ces protéines. Il est donc possible de traiter des cellules par ces substances protéiques pour améliorer leur viabilité face à un stress. On peut donc intervenir sur l'amélioration de la viabilité cellulaire en ajoutant ces substances soit dans le milieu nutritif, soit au coeur même des cellules. Leur action a été étudiée, grâce à l'ingénierie génétique ou la biologie moléculaire, en vectorisant les gènes codant pour les HSP.

Les techniques d'addition présentent de nombreux inconvénients pour les organismes pluricellulaires :

- il n'est pas possible de cibler les cellules concernées,
- la substance peut être détruite dans les milieux extracellulaires,
- il n'est pas possible d'apporter une protéine dans de nombreuses cellules.

Les techniques de biologie moléculaire présentent elles aussi des inconvénients majeurs :

- le très grand nombre d'HSP et leur spécificité rendent les opérations délicates, nombreuses et fastidieuses,
- l'amplification du génome-codant court-circuite les régulations,
- il n'est pas possible aujourd'hui de contrôler la synthèse de la protéine,
- lors de la transfection génique, la protéine est toujours surexprimée quelles que soient les circonstances.

La production des HSP par induction de la transcription (synthèse des ARNm à partir de l'ADN) ou de la traduction (synthèse des protéines par les ribosomes à partir des ARNm) est possible si l'on dispose de substances pharmacologiques qui agissent soit au niveau de la membrane plasmique, soit dans le cytoplasme, soit encore au niveau nucléaire.

La Demanderesse a trouvé, dans les plantes à métabolisme CAM, et plus particulièrement dans le fruit des plantes de la famille des Cactacées, des substances susceptibles de protéger les synthèses protéiques. Après diverses recherches, il a été découvert, d'une manière surprenante, que ces substances étaient reconnues par les cellules animales.

La présente invention a pour objet de nouvelles substances à activité biologique, notamment sur le métabolisme des HSP, non cyto-toxiques, isolées des plantes à

métabolisme CAM, comme les plantes de la famille des Cactacées, des Crassulacées et des Saxifragacées.

La présente invention concerne notamment les substances obtenues de la peau de fruits des plantes de la famille des Cactacées, et plus précisément de la peau de fruits d'Opuntia, et notamment celle de la figue de Barbarie.

La présente invention concerne encore un procédé d'obtention des substances à activité biologique, non-cytotoxiques, isolées des plantes à métabolisme CAM.

Le procédé d'obtention des substances à activité biologique, non cyto-toxiques, est caractérisé en ce que l'on soumet un fruit d'une plante à métabolisme CAM à un séchage, puis à une déshydratation, suivie d'un épuisement par un solvant organique polaire pour obtenir un extrait organique de fruit, dilue cet extrait avec de l'eau, purifie l'extrait dilué par épuisement à l'hexane, sépare la fraction organique hexanique que l'on évapore à sec sous vide, et obtient la fraction active du fruit de plante à métabolisme CAM, à savoir celle contenant lesdites substances à activité biologique.

La fraction active est encore séchée, et éventuellement reprise par un solvant biocompatible tel que l'éthanol, ou par un solvant approprié selon les opérations souhaitées.

Toute partie de la plante à métabolisme CAM peut être utilisée ; on utilise de préférence le fruit de la plante, et notamment la peau du fruit des plantes de la famille des Cactacées. Le fruit de la plante à métabolisme CAM est un fruit de la plante de la famille des Cactacées, et notamment le fruit d'Opuntia, et spécifiquement la figue de Barbarie.

Le procédé d'obtention de la ou des substances actives se caractérise encore par le fait que l'on peut utiliser la peau du fruit mature ou non mature ; la peau du fruit est obtenue par pelage, érosion ou broyage du fruit.

Le solvant organique polaire mis en oeuvre dans le procédé d'obtention est de préférence un solvant choisi parmi les alcools aliphatiques et les cétones aliphatiques miscibles à l'eau comme l'éthanol et/ou l'acétone. L'extraction directe de la plante par un solvant peu ou non polaire peut être aussi une alternative qui comporte un affrontement avec un solvant polaire.

Les substances à activité biologique selon l'invention, non cyto-toxiques, extraites de plantes à métabolisme CAM comme les plantes de la famille des Cactacées, des Crassulacées et des Saxifragacées, et notamment celles extraites de la peau de fruits

d'Opuntia, et spécifiquement de celle de figue de Barbarie, manifestent des propriétés pharmacologiques très intéressantes, notamment sur le métabolisme des HSP, et trouvent de ce fait un emploi en thérapeutique, en cosmétique et/ou en alimentation.

Ces substances non cyto-toxiques, extraites de plantes à métabolisme CAM comme les Cactacées, les Crassulacées, les Saxifragacées agissent sur les cellules des tissus ou des êtres vivants en accélérant et/ou en amplifiant la synthèse des protéines de choc thermique (HSP), lorsque la cellule est soumise à un stress ou à diverses agressions mettant en jeu la synthèse des protéines de choc thermique.

Il est important d'insister sur la non cyto-toxicité de ces substances, car la plupart des substances cyto-toxiques induisent une augmentation de la synthèse des protéines de choc thermique (HSP).

Les substances de la présente invention sont destinées à traiter les cellules des tissus ou des êtres vivants, pour améliorer leur résistance à un stress ou à diverses agressions qui induisent la synthèse des protéines de choc thermique, ou pour prévenir et/ou traiter les conséquences d'un stress ou de diverses agressions qui induisent la synthèse des protéines de choc thermique et qui modifient la synthèse des protéines.

D'une manière générale, les substances de la présente invention sont destinées à prévenir et/ou à traiter toute conséquence d'une manifestation entraînant un stress ou une agression cellulaire.

Ces substances trouvent un emploi dans un domaine très large de la thérapeutique, de la cosmétique et/ou de l'alimentation.

Ainsi, les substances de la présente invention sont utilisables dans la prévention et/ou le traitement des conséquences d'ischémies vasculaires ; de fibroses cutanées (chéloïdes), pulmonaires, hépatiques ; d'interventions chirurgicales (effets secondaires dus aux traitements par chimiothérapie, aux rayonnements ionisants ou à la radiothérapie, etc.), de la ménopause ; des agressions par les radicaux libres ; des lésions mécaniques : étirement d'un muscle, de la peau (vergetures) ; des frottements mécaniques (chevaux, attelage, chaussures, vêtements, etc.) ; des rayonnements thermiques, photoniques; la prévention des risques liés à l'activité thérapeutique, à la complication de certaines maladies (hépatites virales, cancers, infections diverses, maladies dégénératives impliquant un phénomène apoptotique...), à certaines activités humaines professionnelles comme celles des pompiers ou des travailleurs

susceptibles de subir des rayonnements ionisants, comme la plongée subaquatique et autres, etc.

A ces fins, une ou plusieurs substances selon l'invention, isolées de la peau de fruits des plantes à métabolisme CAM comme les plantes de la famille des Cactacées, des
5 Crassulacées, et des Saxifragacées, et notamment de la peau de fruits d'Opuntia, et spécifiquement de la figue de Barbarie, sont utilisées seules ou en association ou en mélange avec un ou plusieurs principes actifs à action complémentaire ainsi qu'avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, approprié à l'usage envisagé, en vue de la réalisation de compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires.

10 La présente invention concerne encore l'utilisation de la ou des substances à activité biologique, pour accélérer et amplifier la synthèse des protéines de choc thermique (HSP) dans des milieux de culture cellulaires.

15 Les compositions selon l'invention sont destinées à l'administration par voie digestive, parentérale, topique ou rectale. Les compositions sont donc présentées sous forme de comprimés nus ou enrobés, de dragées, de capsules, de gélules, de pilules, de cachets, de sirops, de poudres à ingérer ou à usage externe, de compositions adjuvantes pour la cicatrisation postopératoire, pour les brûlures, les traumatismes ;
20 de suppositoires ; de solutés ou de suspensions injectables conditionnés en ampoules ; de crèmes, de gels ou de pommade.

Les principes actifs complémentaires qui conviennent pour de telles administrations et pour de telles compositions sont par exemple les filtres solaires, les antiseptiques, les
25 antibiotiques, les analgésiques, etc.

Les excipients qui conviennent pour de telles administrations et pour de telles compositions sont des adjuvants de fabrication (liants, fluidifiants...), des agents de sapidité, des colorants et des stabilisants, etc.

30 Pour l'usage thérapeutique, cosmétique et/ou alimentaire, la teneur en principe actif (à savoir les substances à activité biologique selon l'invention) s'échelonne, en équivalent de plantes sèches, de $10 \cdot 10^{-3}$ mg/ml à 400 mg/ml, en particulier de 0,1 mg/ml à 200 mg/ml, et de préférence de 0,5 mg/ml à 100 mg/ml par prise unitaire.

La posologie journalière s'échelonne de 0,1 mg/kg à 200 mg/kg par jour, en fonction de l'indication thérapeutique, cosmétique et/ou alimentaire, et de la voie d'administration.

- 5 La plante et l'extrait sec n'étant pas toxiques, la limite supérieure de la dose administrée est limitée seulement par les capacités d'ingestion, la solubilité, la disponibilité biologique et pharmacologique ou encore par l'effet associé à au moins un autre principe actif présent dans la plante et indépendant de la fraction active. Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter. Ces exemples
10 sont décrits en tenant compte des figures annexées.

EXEMPLE I

Amplification de la synthèse d'HSP 90 des fibroblastes soumis à un traitement 15 **thermique.**

Les protéines de choc thermique (HSP) sont indispensables à la préservation de la synthèse des protéines lors d'une agression extérieure. L'augmentation de la synthèse des HSP permet de mieux protéger la cellule, par exemple au moment d'une
20 augmentation de température.

Dans le cadre de l'expérience décrite ci-après, on a recherché des substances susceptibles d'amplifier la synthèse de l'HSP 90 lors d'une élévation de la température à 43°C sans induire la synthèse de cette molécule à 37°C (condition normale) pour éliminer l'induction d'éventuelles productions de HSP par une
25 substance toxique.

La substance étudiée ci-dessous provient d'un extrait alcoolique obtenu à partir de la peau de fruits d'*Opuntia ficus-indica* ou figue de Barbarie. Cette substance est dénommée ci-après « OE », ce qui signifie « *Opuntia* Extract » ou extrait d'*Opuntia*.

30 Pour ce faire, on a traité 100 g de plante déshydratée ou de fruit entier déshydraté ou encore 1g de peau de fruit déshydraté, avec 10 fois son poids en solvant organique polaire. On ajoute 10 µl de l'extrait obtenu à 1 ml de milieu approprié à la culture des kératinocytes ou des fibroblastes. Après incubation d'une nuit à 37 °C, la synthèse

des HSP n'est pas modifiée, mais après une exposition à une température de 43 °C, les HSP apparaissent de manière beaucoup plus précoce.

A titre d'exemple, HSP 90 révélé par immunofluorescence indirecte apparaît entre 10 et 20 mn dans une culture de fibroblastes incubés en présence d'extrait de Cactacées (O.E) alors que les milieux de culture contenant des cellules non incubées ne montrent HSP 90 qu'une à deux heures plus tard.

Les valeurs des tableaux et des graphes 1, 2, 3 et 4 sont exprimées en unités arbitraires en fonction de la surface de fluorescence pour un seuil fixé pour l'ensemble des observations. Il s'agit de valeurs relatives en unités arbitraires établies à partir d'un seuil de détection identique pour l'ensemble des observations avec un appareil Biocom, et par calcul des plages de fluorescence révélées par un anticorps couplé à la fluorescéine et dirigé contre l'anticorps spécifique de l'HSP.

TABLEAU I :

Synthèse d'HSP 90 par les fibroblastes de peau humaine en culture à 43°C

	Témoin 37°C	30 mn	60 mn	120 mn
Fph	0	0	1	5
Fph + OE	0	3	4	5

Fph = Fibroblastes de peau humaine

Le tableau I est illustré par la Figure 1.

L'extrait d'Opuntia, ajouté à la dose de 1 % dans le milieu de culture, n'exprime aucune activité après incubation d'une nuit à 37°C, alors que les mêmes fibroblastes de peau humaine cultivés à une température de 43°C, en présence d'extrait d'Opuntia, amènent l'apparition plus rapide de HSP 90.

Ainsi, la présence d'extrait d'Opuntia (OE) dans le milieu de culture permet une activation du processus de synthèse de HSP 90 par rapport à ce que développe la cellule non traitée. La synthèse n'est pas amplifiée, elle est activée plus rapidement. Au lieu d'intervenir normalement après 120 mn, la synthèse de HSP 90, par les fibroblastes en présence d'OE, se déclenche à 30 minutes après l'élévation de la température à 43°C (cf. Figure 1).

Au cours d'une agression thermique, OE permet une meilleure préservation du matériel cellulaire grâce au déclenchement rapide du processus de synthèse des HSP.

- 5 Il a été possible de préciser au cours d'une autre expérimentation que l'apparition de HSP 90 par les fibroblastes de peau humaine, issus d'un explant chirurgical provenant d'un sujet âgé de 5 ans soumis à un stress thermique de 43 °C, se fait entre 10 et 20 minutes, alors que les cellules provenant du même enfant mais non traitées par l'extrait de Cactacées ne font apparaître HSP 90 qu'à partir de 60 min.

10

Les groupes de données figurant dans les 3 tableaux sont indépendants les uns des autres, et ne peuvent donc être comparés.

TABLEAU II :

- 15 **Synthèse d'HSP 90 par les fibroblastes**

	Non traités	Traités par OE
To	1	1
10 mn	1	1
20 mn	1	2,5
30 mn	1	5

Le tableau II est illustré par la Figure 2.

- 20 **EXEMPLE II**

Synthèse des protéines de choc thermique (HSP) par les cellules épithéliales humaines.

TABLEAU III :

- 25 **Synthèse d'HSP 90 par les kératinocytes**

	Non traités	Traités par OE
To	1	1
30 mn	1	4
60 mn	1	5
120 mn	4	5

Le tableau III est illustré par la Figure 3.

TABLEAU IV :**Synthèse d'HSP 27 par les kératinocytes**

	Non traités	Traités par OE
To	1	1
30 mn	1	5
60 mn	2	5
120 mn	4	5

5 Le tableau IV est illustré par la Figure 4.

EXEMPLE III**Etude de la cytocompatibilité de l'extrait d'Opuntia**

10 L'extrait de plantes ayant le métabolisme CAM doit être non cyto-toxique pour ne pas induire de synthèse d'HSP à cause de sa toxicité. Les études de cytocompatibilité ont été conduites sur les fibroblastes et les kératinocytes.

Deux types d'essais ont été effectués : l'activité mitochondriale et la prolifération des cellules.

15 L'activité mitochondriale est évaluée par le test XTT.

Le test XTT est un test colorimétrique basé sur la réduction d'un sel de tétrazolium soluble (XTT = 2,3-bis [2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl] -2H-tétrazolium-5-carboxanilide), (si dérivé insoluble : test MTT = [3-(4,5-diméthyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tétrazolium bromide], par la NADPH réductase mitochondriale en un colorant du type formazan bleu violet.

Par exemple, 2.10^4 cellules sont cultivées classiquement et traitées par diverses concentrations de l'actif à tester. La lecture se fait à 24 H ou à 48 H.

Le test XTT donne une valeur de l'activité mitochondriale, valeur donnée en densité optique (D.O.) à la longueur d'onde associée au bleu de formazan.

25 La prolifération des cellules est réalisée par numération à l'aide d'un compteur de cellules. Elle s'exprime en nombre de cellules.

A) Test sur les fibroblastes :

Les fibroblastes proviennent d'explant de peau humaine prélevé sur un enfant âgé de 30 3 ans (cellules au troisième passage).

TABLEAU V :

Etude du métabolisme des fibroblastes cultivés en présence d'extrait d'Opuntia.

				Moyenne (DO)	Ecart type
Témoin	0,314	0,368	0,479	0,387	0,069
OE 5 %	0,309	0,364	0,361	0,345	0,025
OE 2 %	0,314	0,415	0,428	0,386	0,051
OE 1 %	0,312	0,522	0,585	0,473	0,117
OE 0,5 %	0,320	0,405	0,354	0,360	0,035
OE 0,2 %	0,300	0,318	0,330	0,316	0,012
OE 0,1 %	0,247	0,287	0,327	0,287	0,033
OE 0,05 %	0,230	0,249	0,281	0,253	0,021

- 5 L'extrait d'Opuntia ne modifie pas le métabolisme des fibroblastes : les valeurs ne sont pas statistiquement significatives par rapport au témoin.

Le tableau V est illustré par la figure 5.

10 **TABLEAU VI :**

Effet des extraits de plantes à métabolisme CAM sur la prolifération des fibroblastes.

Ensemencement 10^4 cellules.

	Valeur en milliers de cellules
Témoin	255
OE 5,00 %	281
OE 2,00 %	215
OE 1,00 %	260
OE 0,50 %	251
OE 0,20 %	225
OE 0,10 %	252
OE 0,05 %	257

15

L'extrait d'Opuntia ne modifie pas la prolifération des fibroblastes après deux jours d'incubation.

Le tableau VI est illustré par la figure 6.

20

B) Test sur les kératinocytes.

Les kératinocytes proviennent d'explant de peau humaine provenant de prépuces d'enfants âgés de 2 ans.

5 **TABLEAU VII :**

Etude du métabolisme mitochondrial des kératinocytes humains cultivés en présence de l'extrait d'Opuntia.

				Moyenne (D.O.)	Ecart type
Témoin 37° C	0,948	1,182	1,139	1,090	0,125
OE 0,05 %	1,151	1,169	1,235	1,185	0,044
OE 0,1 %	0,940	0,984	1,006	0,977	034
OE 0,2 %	1,003	1,130	1,096	1,076	0,066
OE 0,5 %	1,098	1,217	1,225	1,180	0,071
OE 1,0 %	1,057	1,204	1,402	1,221	0,173
OE 2,0 %	1,185	1,305	1,297	1,262	0,067
OE 5,0 %	1,180	1,243	1,180	1,201	0,036

10 L'extrait d'Opuntia est cytocompatible avec les kératinocytes.

On n'observe pas de variation statistiquement significative de l'activité mitochondriale des kératinocytes cultivés avec des concentrations d'extrait d'Opuntia variant de 0,05 % à 5 %.

15 Le tableau VII est illustré par la figure 7.

TABLEAU VIII :

Prolifération des kératinocytes en milliers de cellules.

	Valeur en milliers de cellules
Témoin	82,300
OE 5 %	114,600
OE 2 %	86,300
OE 1 %	102,300
OE 0,50 %	82,600
OE 0,20 %	82,500
OE 0,10 %	82,300
OE 0,05 %	81,900

L'extrait d'Opuntia ne modifie pas la prolifération des kératinocytes.

Le tableau VIII est illustré par la figure 8.

5 **EXEMPLE IV**

Etude de l'influence de différentes doses d'extrait de plantes à métabolisme CAM sur la viabilité des kératinocytes soumis à un traitement thermique d'une heure à 48° C.

Après 30 minutes de contact avec l'extrait d'Opuntia, les kératinocytes sont incubés
10 une heure à 48° C.

La viabilité des cellules est appréciée par test XTT.

TABLEAU IX :

**Activité mitochondriale des kératinocytes par l'extrait d'Opuntia et traités à
15 48° C.**

							Moyenne (D.O.)	Ecart type
Témoin 37° C	0,199	0,198	0,198	0,195	0,195	0,198	0,197	0,002
Témoin 48° C(*)	0,104	0,101	0,102	0,097	0,100	0,101	0,101	0,002
Krc 48° C + 0,1 % d'OE	0,123	0,129	0,128	0,126	0,127	0,122	0,126	0,003
Krc 48° C + 0,5 % d'OE	0,152	0,155	0,115	0,156	0,153	0,149	0,147	0,016
Krc 48° C + 1,0 % d'OE	0,178	0,182	0,178	0,178	0,179	0,177	0,179	0,002

(*) : non traité

Krc : kératinocytes

20 Le tableau IX est illustré par la figure 9.

L'effet thermoprotecteur est dose dépendant et apparaît avec l'utilisation de 10 µl par
puits de culture de 1 ml obtenu par macération de 1 g de plantes dans 10 ml de
25 solvant organique anhydre polaire.

EXEMPLE V

Effet thermoprotecteur des extraits de plante à métabolisme CAM.

**Etude de la viabilité des cellules traitées avec des extraits d'Opuntia obtenus
30 avec les différentes parties de la plante.**

Les conditions du test XTT sur les fibroblastes de peau humaine sont les suivantes :

- Incubés une nuit à 37°C avec ou sans OE (témoin choc thermique)
- Premier choc thermique de 20 mn à 48° C
- Incubation de 40 mn à 37° C (production d'HSP)
- 5 - Deuxième choc pendant 20 mn à 50° C
- 15 mn à 37° C
- Test XTT pendant 3 heures à 37° C

TABLEAU X :

- 10 **Etude de la résistance des fibroblastes aux chocs thermiques lorsqu'ils sont traités par l'extrait de peau de fruit.**

						Moyenne (D.O.)	Ecart type
Témoin (37° C)	0,630	0,771	0,564	0,646	0,911	0,704	0,138
Témoin Choc thermique	0,688	0,696	0,701	0,611	0,671	0,673	0,037
Solvant + choc	0,523	0,700	0,717	0,713	0,671	0,665	0,081
1 = jus	0,587	0,688	0,818	0,764	0,681	0,708	0,088
2 = pulpe	0,592	0,717	0,719	0,712	0,687	0,685	0,054
3 = peau	0,782	0,929	0,899	1,057	0,891	0,911	0,598
1+2+3	0,748	0,788	0,627	0,772	0,752	0,737	0,064

Le témoin à 37° C est cultivé sur une autre plaque.

- 15 Les densités optiques (D.O) mesurées lors du test XTT pour la peau des fruits sont statistiquement significatives par rapport à toutes les autres moyennes de densité optique sauf dans le cas de la solution totale (1+2+3).

Ceci montre que pour certaines Cactacées la totalité de l'effet est contenue dans la peau.

- 20 Les fibroblastes résistent mieux aux chocs thermiques lorsqu'ils sont traités par l'extrait de la peau du fruit.

Le tableau X est illustré par la figure 10.

EXEMPLE VI

- 25 **Etude de la viabilité des cellules traitées avec des extraits d'Opuntia obtenus avec les différentes parties de fruits.**

TABLEAU XI :

Il illustre la comparaison par rapport au témoin.

	37° C	Choc	Solvant
Référence (37° C)		-0,070	-0,100
Témoin Choc thermique	0,010	0,000	-0,700
Solvant + choc	0,040	0,030	0,000
1 = jus	0,078	0,068	0,038
2 = pulpe	0,049	0,039	0,009
3 = peau	0,283	0,273	0,243
1+2+3	0,075	0,065	0,035

- 5 Les fibroblastes résistent mieux aux chocs thermiques lorsqu'ils sont traités par l'extrait de la peau du fruit.

Le tableau XI est illustré par la figure 11.

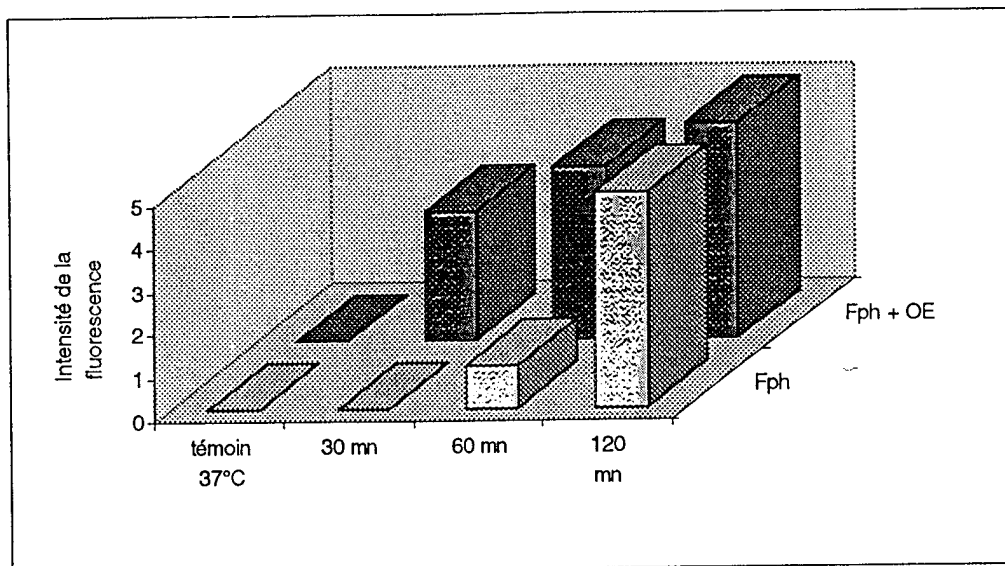
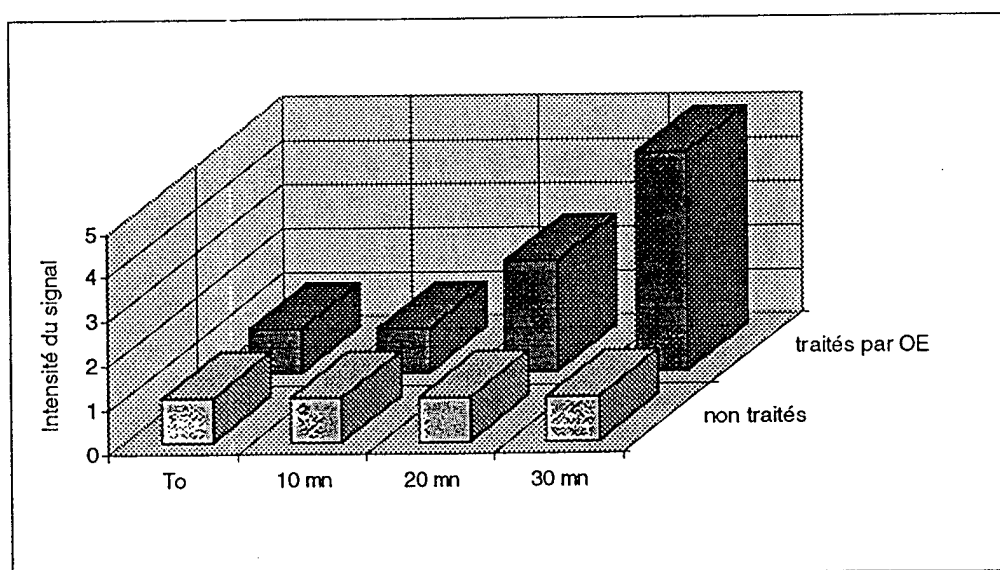
REVENDICATIONS

1. Substances à activité biologique, non cyto-toxiques, accélérant et/ou amplifiant la synthèse des protéines de choc thermique (HSP) isolées des plantes à métabolisme CAM.
5
2. Substances à activité biologique selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues à partir de la peau du fruit de ces plantes.
- 10 3. Substances à activité biologique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues à partir de la peau de fruits d'Opuntia et spécifiquement de la figue de Barbarie.
- 15 4. Procédé d'obtention de substances à activité biologique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on soumet un fruit d'une plante à métabolisme CAM, mature ou non mature, à un séchage, puis à une déshydratation, suivie d'un épuisement par un solvant organique polaire pour obtenir un extrait organique de fruit, dilue cet extrait avec de l'eau, purifie l'extrait dilué par épuisement à l'hexane, sépare la fraction organique hexanique que l'on évapore à sec sous vide, et obtient la fraction active du fruit de plante à métabolisme CAM.
20
5. Procédé d'obtention des substances à activité biologique selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'on utilise en tant que solvant organique polaire, un solvant choisi parmi les alcools aliphatiques et les cétones aliphatiques.
25
6. Procédé d'obtention selon les revendications 4 et 5, caractérisé en ce que l'on utilise la peau de fruit de plante à métabolisme CAM, obtenue par pelage, érosion ou broyage du fruit.
30
7. Compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires, accélérant et amplifiant la synthèse des protéines de choc thermique (HSP), caractérisées en ce qu'elles renferment à titre de principe actif une ou plusieurs substances à activité biologique selon l'une des revendications 1 à 3, en association ou en mélange avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, approprié à
35

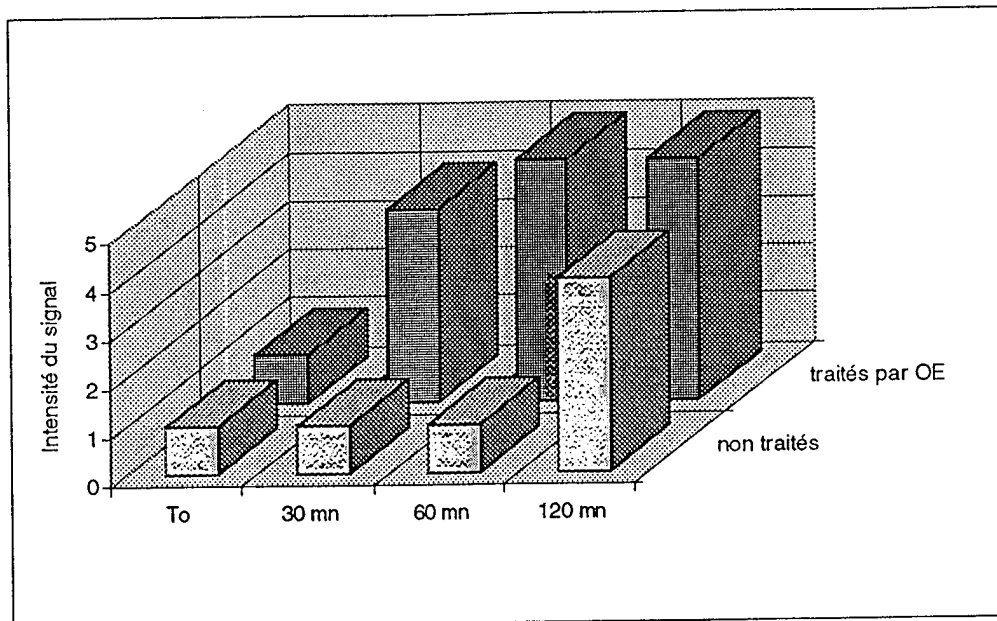
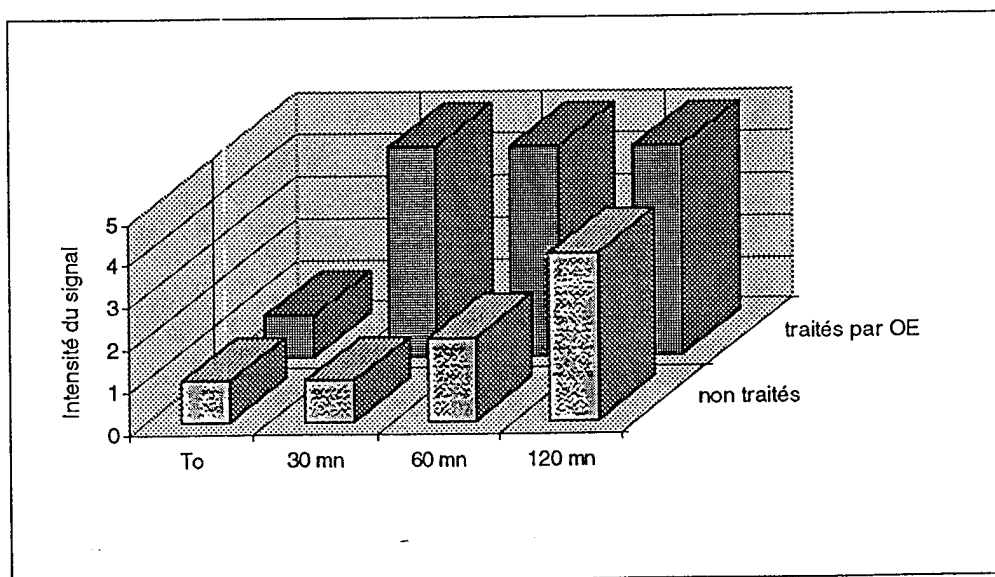
l'usage envisagé, et éventuellement un ou plusieurs principes actifs à action complémentaire.

- 5 8. Compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires selon la revendication 7, dans lesquelles l'excipient ou le véhicule inerte est l'un de ceux qui conviennent pour l'administration par voie digestive, parentérale, topique ou rectale.
- 10 9. Compositions pharmaceutiques, cosmétiques et/ou alimentaires selon les revendications 7 et 8, dans lesquelles la teneur en principe actif s'échelonne de $10 \cdot 10^{-3}$ mg/ml à 400 mg/ml par prise unitaire.
- 15 10. Utilisation de la ou des substances à activité biologique selon l'une des revendications 1 à 3, pour accélérer et amplifier la synthèse des protéines de choc thermique (HSP) dans des milieux de culture cellulaire.

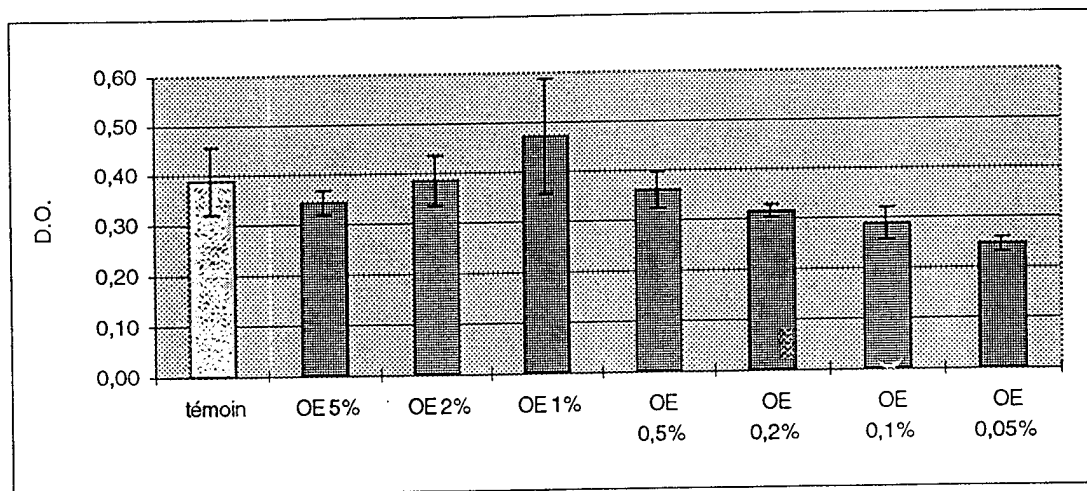
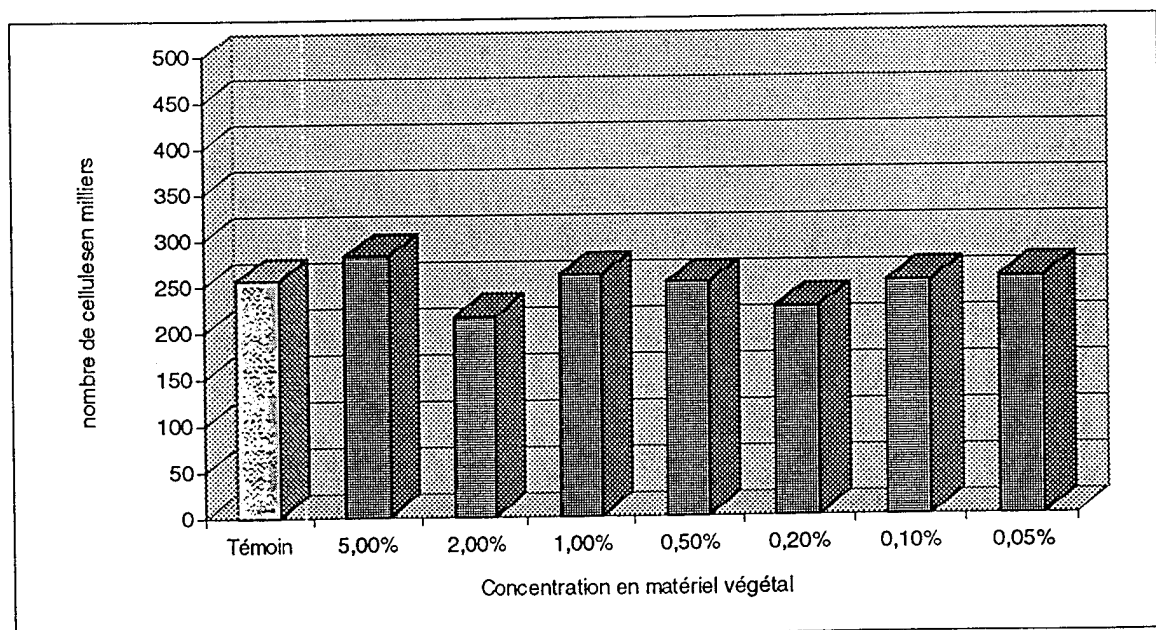
1/6

Figure 1**Figure 2**

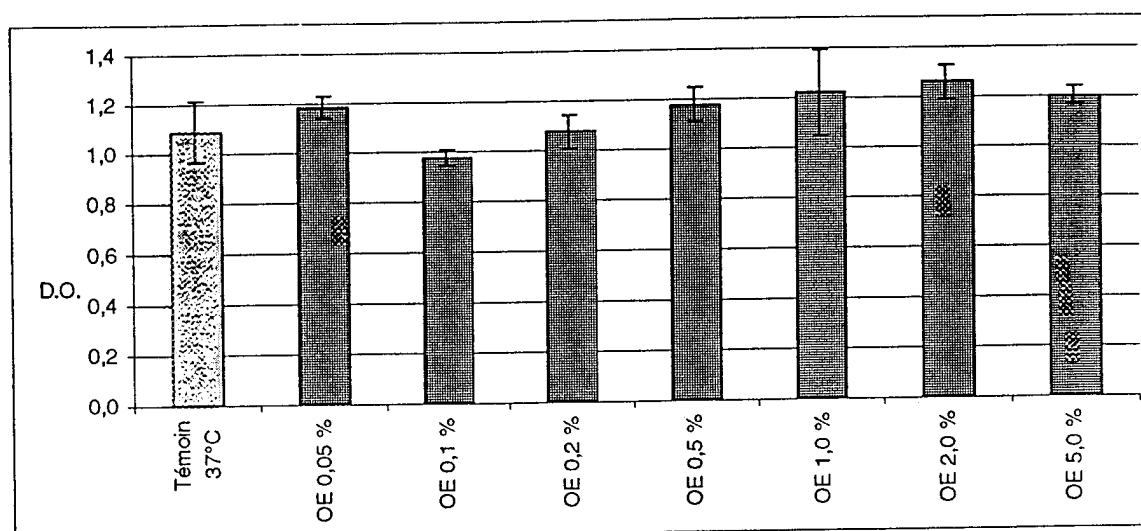
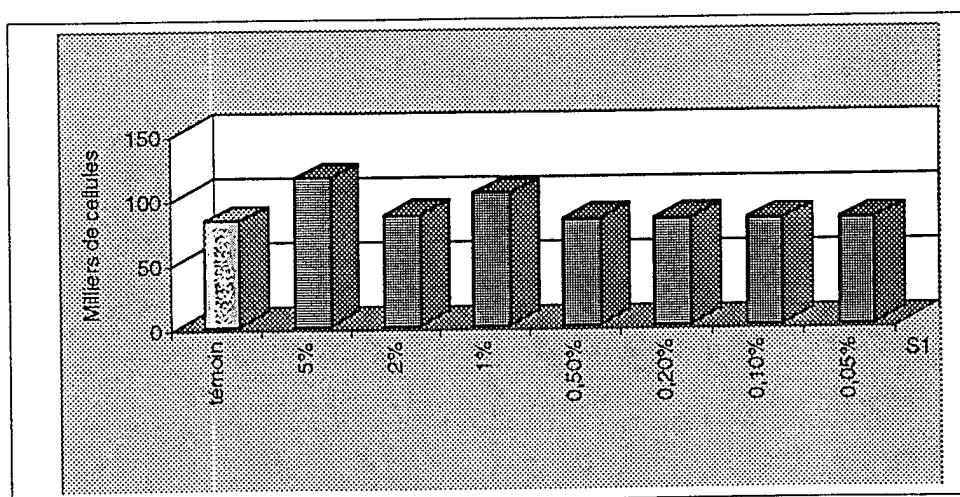
2/6

Figure 3**Figure 4**

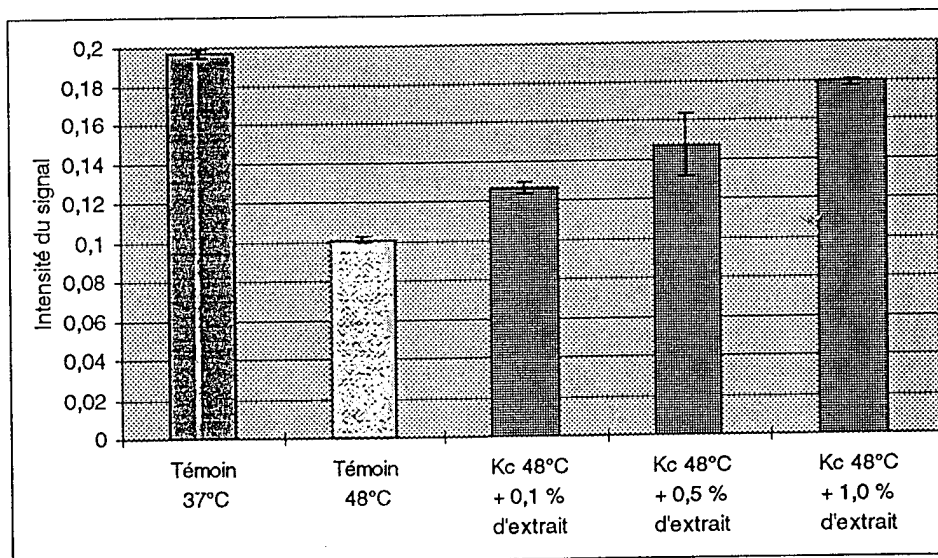
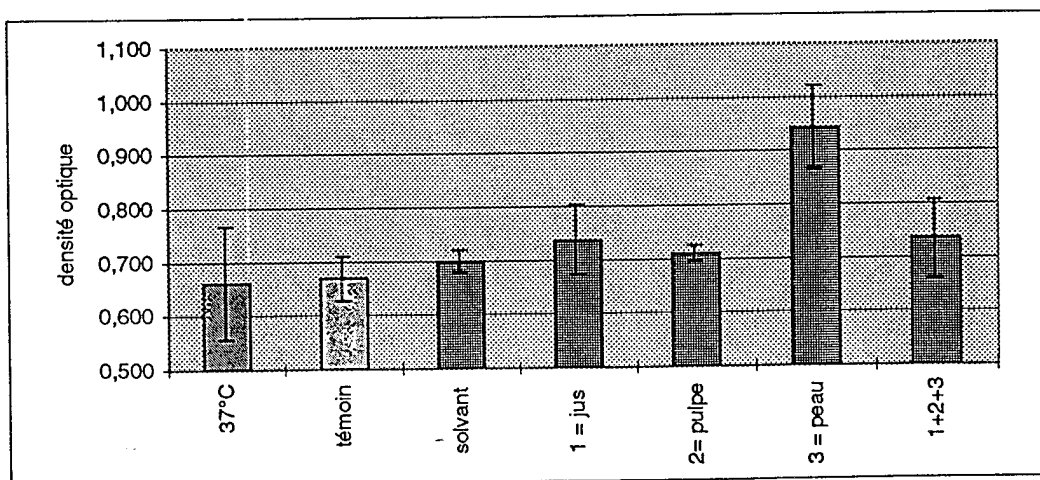
3/6

Figure 5**Figure 6**

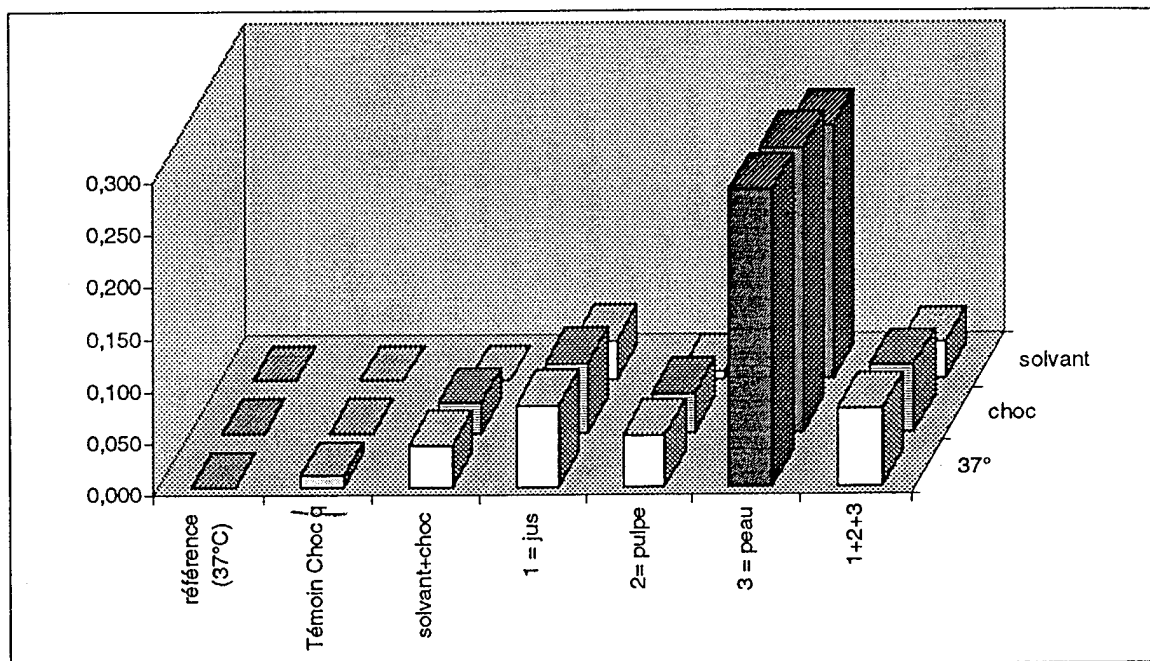
4/6

Figure 7**Figure 8**

5/6

Figure 9**Figure 10**

6/6

Figure 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/02375

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K35/78

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 16 17 409 A (CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE) 1 April 1971 see the whole document -----	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 April 1998

Date of mailing of the international search report

06/05/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rempp, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/02375

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 1617409 A	01-04-71	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche internationale No
PCT/FR 97/02375

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K35/78

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DE 16 17 409 A (CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE) 1 avril 1971 voir le document en entier -----	1-7

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"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

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 avril 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/05/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Rempp, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D. .nde Internationale No

PCT/FR 97/02375

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 1617409 A	01-04-71	AUCUN	