

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 908 309

②① N° d'enregistrement national : **06 09930**

⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 36/00** (2006.01), A 61 P 3/00

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 14.11.06.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 16.05.08 Bulletin 08/20.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : UNIVERSITE LOUIS PASTEUR Eta-
blissement public — FR.

⑦② Inventeur(s) : MIOSKOWSKI CHARLES, LOBSTEIN
ANNELISE et WAGNER ALAIN.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ARMENGAUD AINE.

⑤④ COMPOSITIONS BIOLOGIQUEMENT ACTIVES,PROCEDE POUR LEUR OBTENTION,ET APPLICATIONS
BIOLOGIQUES.

⑤⑦ L'invention a pour objet un procédé d'obtention de
compositions biologiquement actives, par extraction à partir
d'une ou plusieurs plantes, comprenant les étapes

a) de traitement, séparément, des plantes médicinales
sélectionnées par rapport à une activité donnée, ou de par-
ties de ces plantes, avec un ou plusieurs solvants pour ob-
tenir des extraits totaux bruts ou des fractions enrichies en
principes actifs, plus spécialement des fractions apolaires et
des fractions polaires

b) de sélection d'extraits ou fractions présentant une ac-
tivité métabolique dans le test MTT et une activité biologi-
que dans au moins un test spécifique de cette activité.

Application des extraits et fractions obtenus comme
compositions pharmaceutiques ou comme compléments
alimentaires.

FR 2 908 309 - A1



Compositions biologiquement actives, procédé pour leur obtention, et applications biologiques

L'invention a pour objet de nouvelles compositions biologiquement actives, susceptibles d'être obtenues à partir de plantes. Elle concerne également un procédé
5 d'obtention de ces compositions par extraction à partir de plantes sélectionnées au regard d'une activité donnée. L'invention vise en outre les applications biologiques de ces compositions pour le traitement de maladies qui découlent d'une perturbation du métabolisme et/ou de la balance énergétique, dites maladies métaboliques, en particulier le traitement du diabète de type 2.

10 Depuis une trentaine d'année, la sédentarité et la surnutrition ont provoqué une explosion de l'incidence de l'obésité dans les pays industrialisés. Les obèses présentent un risque accru de développer d'autres maladies métaboliques, en particulier le diabète de type 2. Malgré l'existence d'un grand nombre d'outils thérapeutiques, il existe un très grand besoin médical pour cette maladie métabolique. On dénombre près de 200 millions de
15 personnes diabétiques dans le monde, dont environ 90% souffrent de diabète de type 2. On estime que ce chiffre doublera d'ici à 25 ans, affectant ainsi un peu plus de 5% de la population mondiale. Les personnes atteintes de diabète ont 2 à 4 fois plus de risques de développer des complications cérébro- et cardio-vasculaires. En plus de ces problèmes macro-vasculaires, les patients développent également un certain nombre de complications
20 micro-vasculaires : rétinopathies, neuropathies et néphropathies. Après 10 ans d'évolution de la maladie, un tiers des patients diabétiques sont atteints de ces complications qui pourraient être considérablement réduites par une prise en charge à la fois comportementale – en particulier avec un régime adapté et accompagné de compléments alimentaires - et médicamenteuse.

25 Il existe différentes classes de médicaments disponibles pour le traitement des maladies métaboliques, lesquels ont en commun d'agir sur une des composantes du métabolisme. Des études récentes (Petersen et al, 2004; Petersen et al, 2003) ont montré que la diminution de l'activité métabolique elle-même, et en particulier au niveau de la mitochondrie, était l'une des perturbations majeure et précoce observée dans le
30 développement des maladies métaboliques.

Les patients souffrant de maladies métaboliques voient leur maladie évoluer sur des périodes de 30, voire 40 ans. Pendant ces années, il n'y a pas de réel ressenti d'état malade et la plupart des personnes souffrant de maladies métaboliques ont beaucoup de mal à adhérer à des traitements composés de plusieurs médicaments lesquels sont souvent sources d'effets secondaires. C'est la raison principale pour laquelle les produits d'origine végétale apparaissent particulièrement satisfaisants pour la prise en charge de ces maladies. De plus, les produits utilisés à ce jour pour traiter le diabète n'ont pas de profil véritablement satisfaisant, leurs effets secondaires soutenus et nombreux restreignant leur emploi. La plupart des nouveaux médicaments en développement avancé ou récemment mis sur le marché présentent également des effets secondaires et il devient donc urgent de développer des produits efficaces plus satisfaisants.

Au niveau mondial, on a attribué à près de 1200 plantes des effets sur les maladies métaboliques et en particulier le diabète de type 2. Cependant, dans la plupart des cas, la non toxicité des plantes n'a pas été démontrée, les principes actifs qu'elles contiennent n'ont pas été identifiés, leur pharmacologie afin de déterminer à quelle classe thérapeutique la plante appartient et éventuellement identifier une nouvelle classe thérapeutique n'a pas été effectué ou encore aucune méthode d'extraction permettant d'obtenir de manière optimisée techniquement et économiquement leurs principes actifs n'a été décrite.

Il s'ensuit que ce manque de connaissances scientifiques précises sur leurs effets empêche leur utilisation thérapeutique. Sans ces informations scientifiques, l'utilisation en nutraceutique est elle aussi difficile, puisque le cadre réglementaire régissant ce domaine s'est récemment renforcé depuis la mise en application du nouveau décret 2006-352 relatif aux compléments alimentaires lequel est la transposition en droit français de la directive européenne 2002/46/CE.

Dans un souci d'obtention de données scientifiques précises et de développement d'actifs originaux, les inventeurs ont développé des moyens pour évaluer l'effet d'une composition sur l'activité métabolique au niveau mitochondrial en détournant un test biochimique de son utilisation habituelle.

En effet, les inventeurs ont constaté que le test du MTT (bromure 2,3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium), couramment utilisé pour évaluer la cytotoxicité d'un produit chimique donné, d'origine synthétique ou naturelle (Mosmann,

1983), pouvait constituer un outil de grand intérêt pour sélectionner des compositions actives à partir des plantes.

5 Ce test est basé sur la capacité qu'ont les enzymes déshydrogénase contenues dans les mitochondries à convertir le MTT, molécule de couleur jaune en solution, en cristaux de formazan, de couleur bleue en solution. Il permet d'obtenir une mesure de l'activité déshydrogénase continue dans les mitochondries après traitement avec un produit donné et donc de mesurer la quantité d'ATP produite par la mitochondrie, laquelle est la signature de l'activité métabolique au niveau de la mitochondrie d'une cellule.

10 Les inventeurs ont ainsi développé une méthode de criblage de molécules originales pour leur potentiel à corriger un défaut métabolique, en utilisant le test du MTT, non seulement pour mesurer la cytotoxicité d'extraits et composés de plantes sélectionnées mais, de manière originale, pour mesurer la capacité de ces extraits et composés à augmenter l'activité métabolique.

15 L'invention a donc pour but de fournir un procédé de grande fiabilité et facile à mettre en œuvre pour obtenir de nouvelles compositions utiles pour prévenir, accompagner un régime et traiter des maladies métaboliques.

Elle a également pour but de fournir de telles compositions en tant que produits nouveaux et de mettre à profit leurs propriétés pour la fabrication de médicaments ou encore de compléments alimentaires pour le traitement et la prévention des maladies métaboliques.

20

Le procédé d'obtention selon l'invention de compositions biologiquement actives, par extraction à partir d'une ou plusieurs plantes, est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes

a) de traitement, séparément, des plantes médicinales sélectionnées par rapport à une activité donnée, ou de parties de ces plantes, avec un ou plusieurs solvants pour obtenir des extraits totaux ou des fractions enrichies en principes actifs, plus spécialement des fractions apolaires et des fractions polaires

25

b) de sélection d'extraits ou fractions présentant une activité métabolique dans le test MTT et une activité biologique dans au moins un test spécifique de cette activité métabolique.

Ce procédé comporte avantageusement, outre les étapes a) et b) définies ci-dessus, une étape c), mise en œuvre après l'étape a), et/ou après l'étape b), cette étape c) comprenant l'analyse desdits extraits ou desdites fractions sélectionnés pour déterminer les composants qu'elles renferment et isoler et purifier, si souhaité, le ou les principes actifs portant
5 l'essentiel de l'activité biologique. Cette analyse est réalisée plus particulièrement par profils HPLC.

Cette disposition sur l'identification et l'isolement de composés actifs ouvre la perspective d'obtention de tels composés par voie de synthèse dans l'optique d'un développement pharmaceutique ou en nutraceutique.

10 Dans l'étape a), les plantes ou les parties de plantes sont utilisées, de préférence, sous forme de fine poudre, obtenue après broyage et séchage.

Il s'agit plus particulièrement des feuilles, des écorces, des racines, des parties aériennes, des fruits, graines ...

L'étape a) comprend généralement une ou plusieurs extractions, ces extractions étant
15 réalisées à l'aide de solvants organiques, notamment un solvant alcoolique (en particulier avec de l'éthanol ou du méthanol) ou du cyclohexane ou tout autre solvant apolaire (éther de pétrole, heptane...), du dichlorométhane ou du chloroforme, et, plusieurs de ces solvants ou tous ces solvants, pouvant être utilisés successivement pour l'isolement de fractions spécifiques

20 On notera que l'utilisation du test du MTT selon l'étape b), appliquée à des plantes auxquelles des effets biologiques étaient reconnus, mais ne pouvaient être utilisés efficacement faute de moyens pour leur caractérisation, permet de révéler des extraits et fractions qui n'avaient jamais été identifiés jusqu'à l'invention.

Les compositions susceptibles d'être obtenues par le procédé défini ci-dessus entrent
25 également dans le champ de l'invention en tant que produits nouveaux.

L'invention vise ainsi les extraits, fractions et composés susceptibles d'être obtenus en mettant en œuvre le procédé de l'invention.

L'invention vise également la mise à profit des propriétés biologiques de ces compositions.

Selon un premier aspect, l'invention concerne ainsi de nouvelles compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins
5 une composition telle que définie ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Ces compositions se présentent avantageusement sous des formes galéniques pour une administration par voie orale, topique, ou par injection.

Pour une administration par voie orale, les compositions pharmaceutiques se présentent
10 plus particulièrement sous forme de comprimés, tablettes, gélules, granulés, gouttes,...

Pour une administration par voie topique, elles se présentent avantageusement sous forme de crèmes, laits, lotions, huiles ou patchs.

Des formulations galéniques appropriées comprennent les aérosols.

Pour une administration par voie injectable, elles se présentent sous forme de solutions
15 injectables par voie intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire, élaborées à partir de solutions stériles ou stérilisables, ou encore de suspensions ou d'émulsions.

Selon un deuxième aspect, l'invention se rapporte à des compléments alimentaires, caractérisés en ce qu'ils renferment une quantité efficace d'au moins une composition telle que définie ci-dessus pour une application en nutraceutique, en association avec un
20 excipient inerte.

Ces compléments se présentent avantageusement sous forme liquide, de gomme, de poudre, de comprimés, de gélules, décoctions, infusions et autres.

L'invention est plus particulièrement illustrée ci-après par son application à l'obtention de compositions possédant une activité antidiabétique et utiles en particulier pour la
25 prévention et le traitement du diabète de type 2.

Dans ce but, les tests biologiques réalisés selon l'étape b) sont des tests pour déterminer une activité antidiabétique, notamment sur la sécrétion d'insuline.

Des compositions préférées à cet égard sont susceptibles d'être obtenues à partir de plantes choisies parmi les genres et espèces : *Strychnos myrtoides*, *Obetia radula*, *Trema orientalis*, *Sclerocarya birrea*, *Voacanga thouarsii*, *Moringa oleifera* (= *Moringa moringa*, *Moringa pterygosperma*, *Guilandina moringa*), *Agrimonia eupatoria*, *Arctium majus*=
 5 *Lappa major*, *Alchemilla vulgaris*, *Phaseolus vulgaris*, *Vaccinium myrtillus*, *Cichorium intybus*, *Cynara scolymus*, *Geranium robertianum*, *Juglans regia*, *Kalanchoe crenata*, *Leptodenia madagascariensis*, *Morus nigra*, *Olea europaea*, *Rubus fruticosus*, *Spathodea campanulata*.

Avantageusement, il s'agit de compositions caractérisées en ce qu'elles sont
 10 susceptibles d'être obtenues à partir de plantes choisies parmi les genres : *Strychnos*, *Obetia*, *Trema*, *Sclerocarya*, *Voacanga*, *Moringa*, *Agrimonia*, *Arctium*, *Alchemilla*, *Phaseolus*, *Vaccinium*, *Cichorium*, *Cynara*, *Geranium*, *Juglans*, *Kalanchoe*, *Leptodenia*, *Morus*, *Olea*, *Rubus*, *Spathodea*.

Des compositions particulièrement préférées sont susceptibles d'être obtenues à partir
 15 de plantes choisies parmi les familles : Loganiaceae, Urticaceae, Ulmaceae, Anacardiaceae, Apocynaceae, Moringaceae, Rosaceae, Asteraceae, Fabaceae, Ericaceae, Geraniaceae, Juglandaceae, Crassulaceae, Oleaceae, Bignoniaceae.

D'autres compositions particulièrement préférées sont des fractions de *Trema orientalis* Ulmaceae, *Strychnos myrtoides* Loganiaceae, *Obetia radula* Urticaceae, *Vaccinium*
 20 *myrtillus* Ericaceae, *Sclerocarya birrea* Anacardiaceae, *Agrimonia eupatoria* Rosaceae, *Alchemilla vulgaris* Rosaceae et *Olea europaea* Oleaceae, présentant respectivement, les profils HPLC des figures 1-8, ainsi que les composés biologiquement actifs issus de ces fractions.

Comme le montrent les exemples, ces compositions préférées présentent un grand
 25 intérêt pour le traitement du diabète.

Les compositions préférées ci-dessus présentent également un grand intérêt en nutraceutique et sont avantageusement utilisées pour l'élaboration de compléments alimentaires. Ces compléments permettent notamment d'accompagner un régime alimentaire d'un patient sous traitement ou non.

Selon encore un autre aspect, l'invention vise une méthode de prévention et/ou de traitement de maladies métaboliques, caractérisée en ce qu'elle comprend l'administration d'une quantité efficace en thérapeutique ou en nutraceutique d'au moins une composition telle que définie ci-dessus.

5 De manière générale, l'invention propose donc une alternative pour la prévention et le traitement de ces maladies métaboliques car ces produits d'origine naturelle sont – au moins psychologiquement- associés à une meilleure qualité de vie et d'autre part leur utilisation souvent séculaire dans la pharmacopée traditionnelle assure une connaissance exhaustive des effets secondaires.

10 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés avec les exemples qui suivent de modes détaillés de réalisation de l'invention. Ces exemples servent à illustrer l'invention sans en limiter la portée. Il est fait référence dans ces exemples aux figures 1 à 9 qui représentent les profils HPLC d'extraits de plantes selon l'invention (figures 1 à 8) et donnent un résultat de test MTT (figure 9).

15 **Matériel et méthode**

Plantes

Les parties de plantes séchées (feuilles, racines....) sont broyées afin d'obtenir une poudre fine destinée à l'extraction.

Extraction-purification

20 La poudre est épuisée par percolation ou par macération, ou par sonication par des solvants polaires ou apolaires. Ces solvants peuvent être du cyclohexane, de dichlorométhane, du chloroforme, de l'acétone, de l'acétate d'éthyle, du butanol, de l'éthanol, du méthanol, de l'eau ou un mélange de ces différents solvants. Les extraits sont obtenus avec des rendements compris entre 2 et 10%. Ils sont évaporés à sec sous pression réduite. Puis
25 fractionnés soit par extraction liquide-liquide, soit par extractions successives par des solvants de polarité croissante. Les composés purs peuvent être obtenus notamment par fractionnement par chromatographie d'adsorption, chromatographie d'exclusion, chromatographie d'affinité, chromatographie d'échanges d'ions, ou par cristallisation fractionnée

Profils chromatographiques

Les extraits, les fractions enrichies, les fractions plus ou moins purifiées ou les composés purs sont analysés par chromatographie à haute pression en utilisant une colonne de phase inverse (RP-CLHP). La phase stationnaire utilisée correspond notamment à une silice greffée C8 ou C18, de 5 à 10 de granulométrie. Les mélanges d'élution correspondent notamment à de l'eau acidifiée (pH 3) additionnée de méthanol ou d'acétonitrile. Le gradient utilisé varie de 98% à 0% d'eau acidifiée sur au moins 60 min.

Test MTT

La lignée transformée pancréatique INS1 utilisée pour ce test est un don du Centre Européen du Diabète (Haute-pierre, France). Les cellules sontensemencées à une densité de 3×10^3 /puit dans des plaques 96 puits et cultivées dans du milieu RPMI 1640 enrichi avec du sérum de veau fœtal (10%). Les cellules sont traitées avec les différents extraits de plantes (200 µg/ml) pendant 24 heures et le test MTT ensuite réalisé: le MTT (bromure 2,3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) est un sel de tétrazolium donnant une solution de couleur jaune quand il est dilué dans un milieu. Il est converti en formazan violet insoluble dans le milieu de culture après clivage du cycle tétrazolium par les déshydrogénases mitochondriales actives des cellules vivantes seules. Les cellules mortes ne peuvent être le siège de ce changement. La solution de MTT (concentration finale de 0,5 mg/ml) est ajoutée aux cellules pour 4h d'incubation. Le milieu est ensuite aspiré avec précaution afin de ne pas aspirer les cristaux de formazan formés, lesquels seront solubilisés dans 100 µl de DMSO. Le matériel dissous est mesuré par spectrophotométrie donnant une absorbance proportionnelle à la concentration de colorant converti. L'absorbance de chaque puits est mesurée à 540-630 après soustraction du bruit de fond sur le spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (DMSO seul).

25 Test de sécrétion d'insuline

Les îlots de Langerhans de pancréas de porc sont obtenus auprès du Centre Européen du Diabète (Haute-pierre, France). 100 îlots/puit sontensemencés dans des plaques 24 puits et cultivés dans du milieu RPMI 1640 enrichi avec du sérum de veau fœtal (10%). Les cellules sont traitées avec les différents extraits de plantes (200 µg/ml) pendant 60 minutes et la

sécrétion d'insuline mesurée à l'aide d'un kit Elisa (Mercodia) selon les recommandations du fournisseur. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (DMSO seul).

Exemple 1: Etude de l'effet de plantes sélectionnées sur l'activité métabolique de cellules

Des cellules INS1 ont été traitées pendant 24 heures avec 200 µg/ml d'extrait de plante
5 obtenus par extraction à l'aide d'éthanol, de méthanol ou de dichlorométhane. Le taux de conversion du MTT a été calculé et l'effet des extraits exprimé en pourcentage du contrôle.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1 : extraits éthanolique (total),
méthanolique (enrichi en composés polaires) et dichlorométhanique (enrichi en composés
apolaires). Dans ce tableau, EtOH = fraction éthanol ; MeOH = fraction méthanol ; DCM =
10 fraction dichlorométhane.

Tableau 1

Genre / Espèce / Partie	Pourcentage du contrôle (%)		
	EtOH	DCM	MeOH
<i>Strychnos myrtoides</i> / feuilles	128	107	121
<i>Obetia radula</i> / écorce, tige	112	127	116
<i>Trema orientalis</i> / racines	319	103	355
<i>Voacanga thouarsii</i> / écorce	120	91	111
<i>Arctium majus</i> / feuilles	63	80	ND
<i>Arctium majus</i> / racines	156	77	162
<i>Cynara scolymus</i> / feuilles	72	75	123
<i>Geranium robertianum</i> / partie aérienne	172	145	164
<i>Kalanchoe crenata</i> / partie aérienne	107	ND	ND
<i>Rubus fruticosus</i> / feuilles	130	151	220
<i>Spathodea campanulata</i> / écorce	114	ND	ND
<i>Sclerocarya birrea</i> / feuilles	284	119	263
<i>Alchemilla vulgaris</i> / partie aérienne	189	117	201
<i>Cichorium intybus</i> / feuilles	122	139	129
<i>Cichorium intybus</i> / racines	105	83	98
<i>Leptodenia madagascariensis</i> / feuilles	109	132	125
<i>Moringa ofeifera</i> / feuilles	104	118	102
<i>Agrimonia eupatoria</i> / partie aérienne	205	121	221
<i>Phaseolus vulgaris</i> / cosses	103	104	86
<i>Vaccinium myrtillus</i> / feuilles	163	172	147
<i>Juglans regia</i> / feuilles	152	110	223
<i>Morus nigra</i> / feuilles	104	117	110
<i>Olea europaea</i> / feuilles	130	135	133

L'examen de ces résultats montre que l'ensemble des plantes sélectionnées a un effet sur l'activité métabolique des cellules.

Exemple 2: Profils HPLC

Les fractions actives sont soumises à une RP-HPLC analytique afin d'avoir l'empreinte chromatographique des extraits par rapport à leur activité biologique. Les figures 1-8 donnent, respectivement, les profils RP-HPLC des fractions éthanoliques de *Trema*
5 *orientalis*, *Strychnos myrtoïdes*, *Obetia radula*, *Vaccinium myrtillus*, *Sclerocarya birrea*, *Agrimonia eupatoria*, *Alchemilla vulgaris* et *Olea europaea*.

Les fractions sont ensuite purifiées par RP-HPLC semi-préparative puis soumises au test de MTT afin de confirmer et d'identifier le principe actif. Pour ce test, les cellules INS1 ont été traitées avec 100, 200, 400 ou 800 µg/ml d'extrait de plante pendant 24h. Un exemple de
10 résultat obtenu avec *Trema orientalis* est présenté dans la Figure 9. Les abréviations données sur cette figure ont les significations suivantes: TC: témoin cellule seule; DMSO: témoin cellule seule + solvant (DMSO); A-J: fractions obtenues après RP-HPLC semi-préparative (détail des fractions présenté figure 1). Le taux de conversion est présenté après mesure de la densité optique à 560 nm.

15 Exemple 3: Effet des extraits de plantes sélectionnées sur la sécrétion d'insuline

Il existe quatre classes thérapeutiques d'antidiabétiques distinctes pour traiter le diabète de type 2. Parmi elles, les sulfonyleurées, médicament phare aux Etats-Unis pour le traitement du diabète de type 2. Les sulfonyleurées favorisent la sécrétion d'insuline par le pancréas et préviennent donc par ce biais l'hyperglycémie. Puisque les plantes sont actives
20 sur le métabolisme cellulaire, afin de déterminer si les actifs appartenaient à une des 4 classes thérapeutiques connues, en particulier les sulfonyleurées, l'activité de ces extraits a été vérifiée sur un test de sécrétion d'insuline sur îlots de Langherans porcins.

Les îlots de Langherans de porc ont été traités pendant 60 minutes avec 200 µg/ml d'extrait de plante. La sécrétion d'insuline est mesurée par test ELISA et l'effet des extraits exprimé
25 en pourcentage du contrôle.

Les résultats sont donnés dans le tableau 2 suivant. Dans ce tableau, EtOH, MeOH et DCM correspondent, respectivement, aux extraits éthanolique (total), méthanolique (enrichi en composés polaires) et dichlorométhanique (enrichi en composés apolaires).

Tableau 2

Genre / Espèce / Partie	Pourcentage du contrôle (%)		
	EtOH	MeOH	DCM
<i>Strychnos myrtoides</i> / feuilles	641	604	364
<i>Obetia radula</i> / écorce, tige	493	392	134
<i>Trema orientalis</i> / racines	235	408	201
<i>Voacanga thouarsii</i> / écorce	352	256	384
<i>Arctium majus</i> / feuilles	118	ND	136
<i>Arctium majus</i> / racines	157	140	119
<i>Cynara scolymus</i> / feuilles	101	105	252
<i>Geranium robertianum</i> / partie aérienne	83	138	226
<i>Kalanchoe crenata</i> / partie aérienne	ND	ND	ND
<i>Rubus fruticosus</i> / feuilles	86	98	168
<i>Spathodea campanulata</i> / écorce	ND	ND	ND
<i>Sclerocarya birrea</i> / feuilles	81	108	118
<i>Alchemilla vulgaris</i> / partie aérienne	110	162	139
<i>Cichorium intybus</i> / feuilles	100	105	171
<i>Cichorium intybus</i> / racines	100	123	114
<i>Leptodenia madagascariensis</i> / feuilles	197	161	271
<i>Moringa ofeifera</i> / feuilles	216	152	336
<i>Agrimonia eupatoria</i> / partie aérienne	129	137	178
<i>Phaseolus vulgaris</i> / cosses	117	134	115
<i>Vaccinium myrtillus</i> / feuilles	171	134	122
<i>Juglans regia</i> / feuilles	100	180	76
<i>Morus nigra</i> / feuilles	114	189	380
<i>Olea europaea</i> / feuilles	109	139	230

Références

Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. KF Petersen, S Dufour, D Befroy, R Garcia, and GI Shulman. N Engl J Med, 350: 664-671 (2004)

- 5 Mitochondrial Dysfunction in the Elderly : Possible Role in Insulin Resistance. KF Petersen, D Befroy, S Dufour, J Dziura, C Ariyan, DL Rothman, L DiPietro, GW Cline and GI Shulman. Science, 300 : 1140-1142 (2003).

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. T Mosmann, J Immunol Methods, 65(1-2):55-63 (1983).

REVENDICATIONS

1 - Procédé d'obtention de compositions biologiquement actives, par extraction à partir d'une ou plusieurs plantes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes

a) de traitement, séparément, des plantes médicinales sélectionnées par rapport à une activité donnée, ou de parties de ces plantes, comprenant une ou plusieurs extractions, ces extractions étant réalisées à l'aide de solvants organiques, notamment un solvant alcoolique ou du cyclohexane ou tout autre solvant apolaire, du dichlorométhane ou du chloroforme, et, plusieurs de ces solvants ou tous ces solvants, pouvant être utilisés successivement pour l'isolement de fractions spécifiques pour obtenir des extraits totaux bruts ou des fractions enrichies en principes actifs, plus spécialement des fractions apolaires et des fractions polaires

b) de sélection d'extraits ou fractions présentant une activité métabolique dans le test MTT et une activité biologique dans au moins un test spécifique de cette activité.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend, outre les étapes a) et b) définies dans la revendication 1, une étape c), mise en œuvre après l'étape a), et/ou après l'étape b), cette étape c) comprenant l'analyse desdits extraits ou desdites fractions sélectionnées pour déterminer les composants qu'elles renferment et isoler, si souhaité, le ou les composés portant l'essentiel de l'activité biologique.

3 - Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que dans l'étape a), les plantes ou les parties de plantes sont utilisées sous forme de fine poudre, obtenue après broyage et séchage.

4 - Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les parties de plantes sont des feuilles, des écorces, des racines, des parties aériennes, des fruits et des graines.

5 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que l'analyse d'une fraction selon l'étape c) est réalisée par profils HPLC.

6 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les tests biologiques réalisés selon l'étape b) sont des tests pour déterminer une activité antidiabétique, notamment sur la sécrétion d'insuline.

7 - Compositions biologiquement actives, caractérisées en ce qu'il s'agit d'extraits, de fractions susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8 - Compositions selon la revendication 7, caractérisées en ce qu'il s'agit de composés susceptibles d'être isolés desdits extraits ou fractions.

9 - Compositions selon la revendication 7 ou 8, caractérisées en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues à partir de plantes choisies parmi les genres et espèces : *Strychnos myrtoides*, *Obetia radula*, *Trema orientalis*, *Sclerocarya birrea*, *Voacanga thouarsii*, *Moringa oleifera* (= *Moringa moringa*, *Moringa pterygosperma*, *Guilandina moringa*) *Agrimonia eupatoria*, *Arctium majus* (= *Lappa major*), *Alchemilla vulgaris*, *Phaseolus vulgaris*, *Vaccinium myrtillus*, *Cichorium intybus*, *Cynara scolymus*, *Geranium robertianum*, *Juglans regia*, *Kalanchoe crenata*, *Leptodenia madagascariensis*, *Morus nigra*, *Olea europaea*, *Rubus fruticosus*, *Spathodea campanulata*.

10 - Compositions selon la revendication 9, caractérisées en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues à partir de plantes choisies parmi les genres: *Strychnos*, *Obetia*, *Trema*, *Sclerocarya*, *Voacanga*, *Moringa*, *Agrimonia*, *Arctium*, *Alchemilla*, *Phaseolus*, *Vaccinium*, *Cichorium*, *Cynara*, *Geranium*, *Juglans*, *Kalanchoe*, *Leptodenia*, *Morus*, *Olea*, *Rubus*, *Spathodea*.

11 - Compositions selon la revendication 9, caractérisées en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues à partir de plantes choisies parmi les familles : Loganiaceae, Urticaceae, Ulmaceae, Anacardiaceae, Apocynaceae, Moringaceae, Rosaceae, Asteraceae, Fabaceae, Ericaceae, Geraniaceae, Juglandaceae, Crassulaceae, Oleaceae, Bignoniaceae.

12 - Compositions selon la revendication 10, caractérisées en ce qu'il s'agit de fractions purifiées à partir de *Trema orientalis* Ulmaceae, *Strychnos myrtoides* Loganiaceae, *Obetia radula* Urticaceae, *Vaccinium myrtillus* Ericaceae, *Sclerocarya*

birrea Anacardiaceae, *Agrimonia eupatoria* Rosaceae, *Alchemilla vulgaris* Rosaceae et *Olea europaea* Oleaceae,

13 - Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins une composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

14 - Compositions selon la revendication 13, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous des formes galéniques pour une administration par voie orale, topique, ou par injection.

15 - Compositions pharmaceutiques selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous forme de comprimés, tablettes, gélules, granulés, gouttes, pour une administration par voie orale.

16 - Compositions pharmaceutiques selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous des formes galéniques pour une administration par voie topique, telles que laits, crèmes, lotions ou huiles.

17 - Compositions pharmaceutiques selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous forme de solutions injectables par voie intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire, élaborées à partir de solutions stériles ou stérilisables, ou encore de suspensions ou d'émulsions, pour une administration par voie injectable.

18 - Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins une composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, pour le traitement du diabète.

19 - Compléments alimentaires, caractérisés en ce qu'ils renferment une quantité efficace d'au moins une composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, pour une application en nutraceutique avec un excipient utilisable inerte.

20 - Compléments alimentaires selon la revendication 19, caractérisés en ce qu'ils se présentent sous forme liquide, de gomme, de poudre, de comprimés.

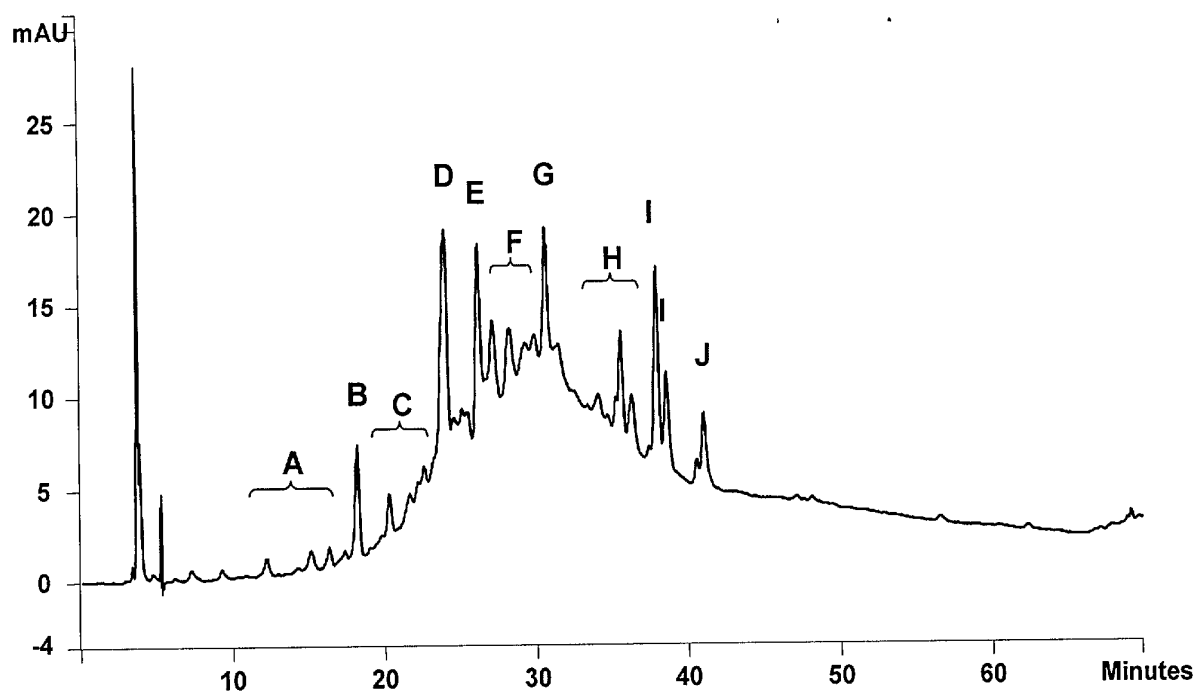


Figure 1

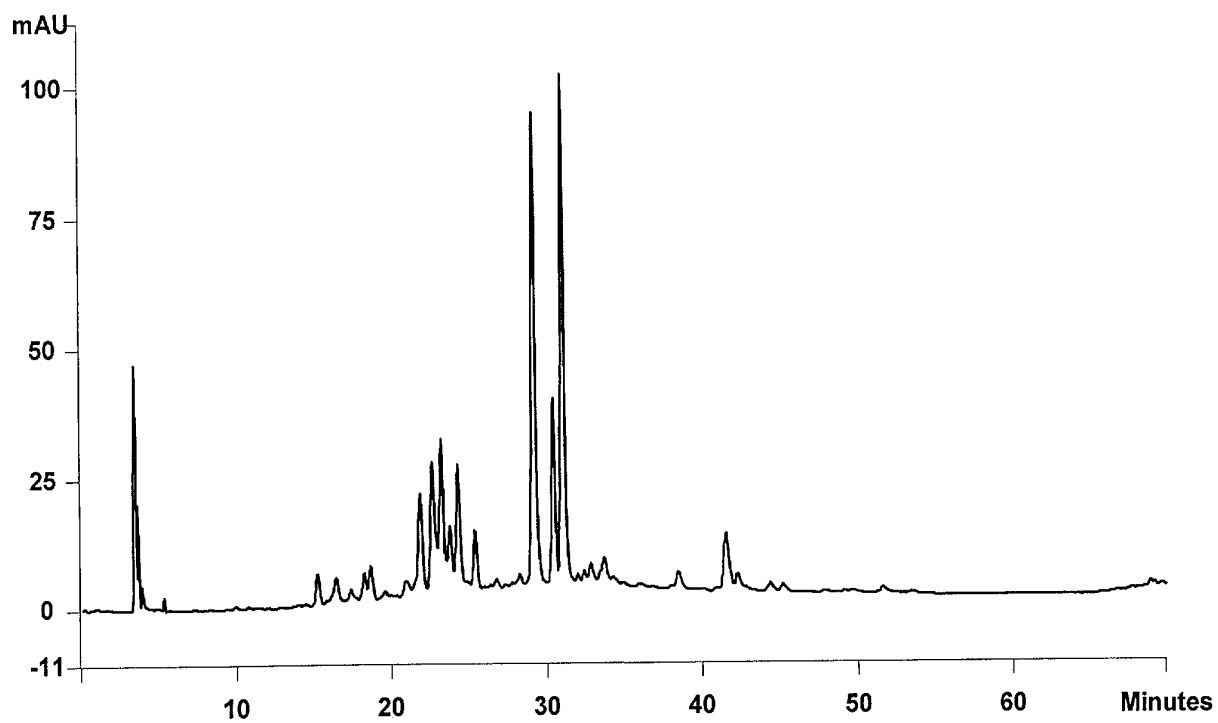


Figure 2

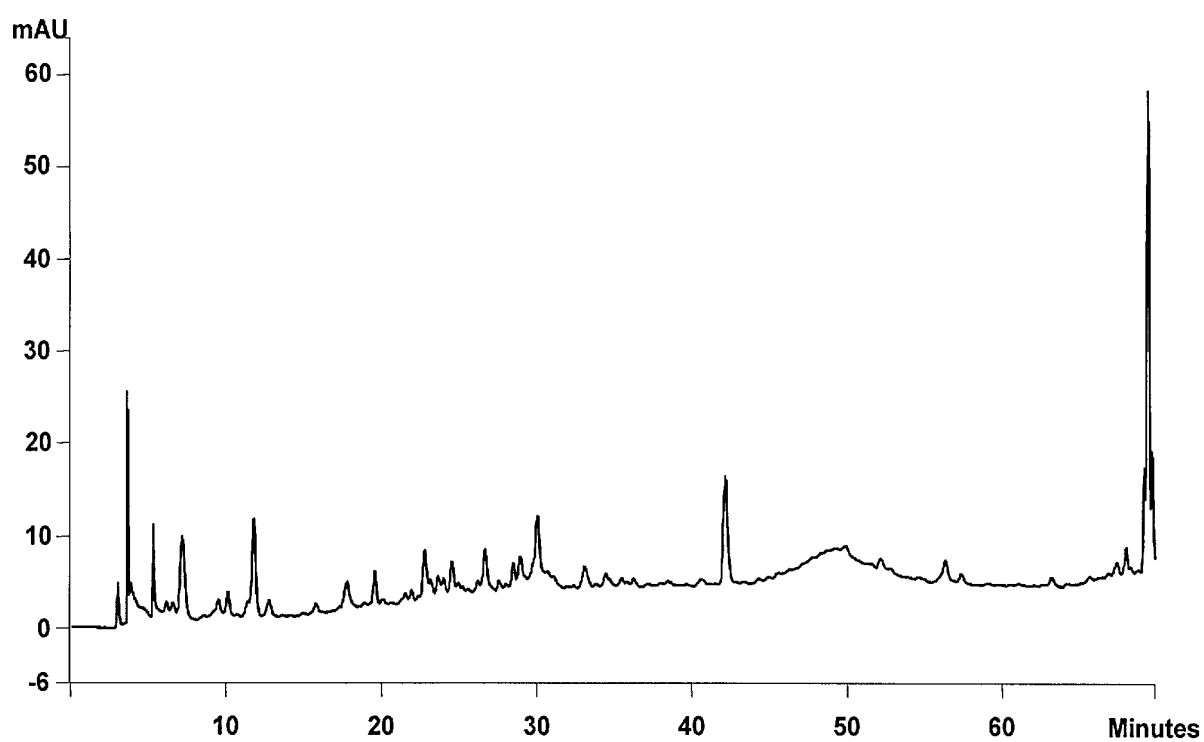


Figure 3

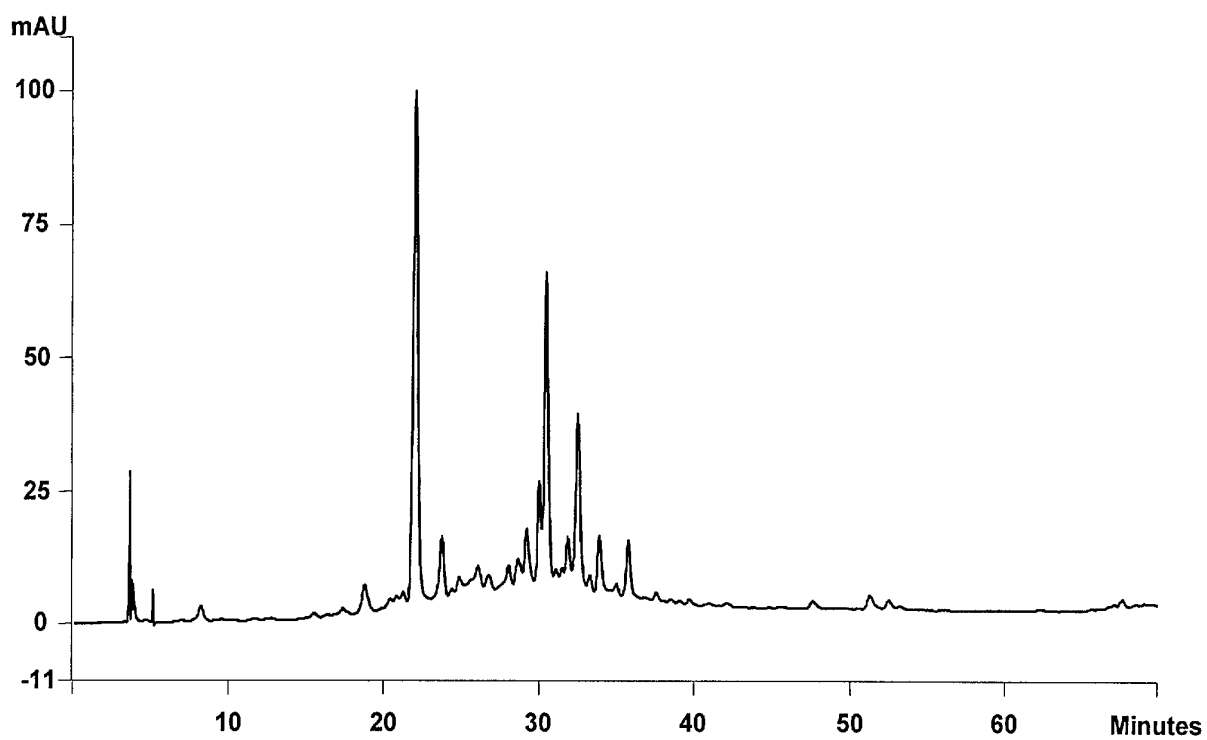


Figure 4

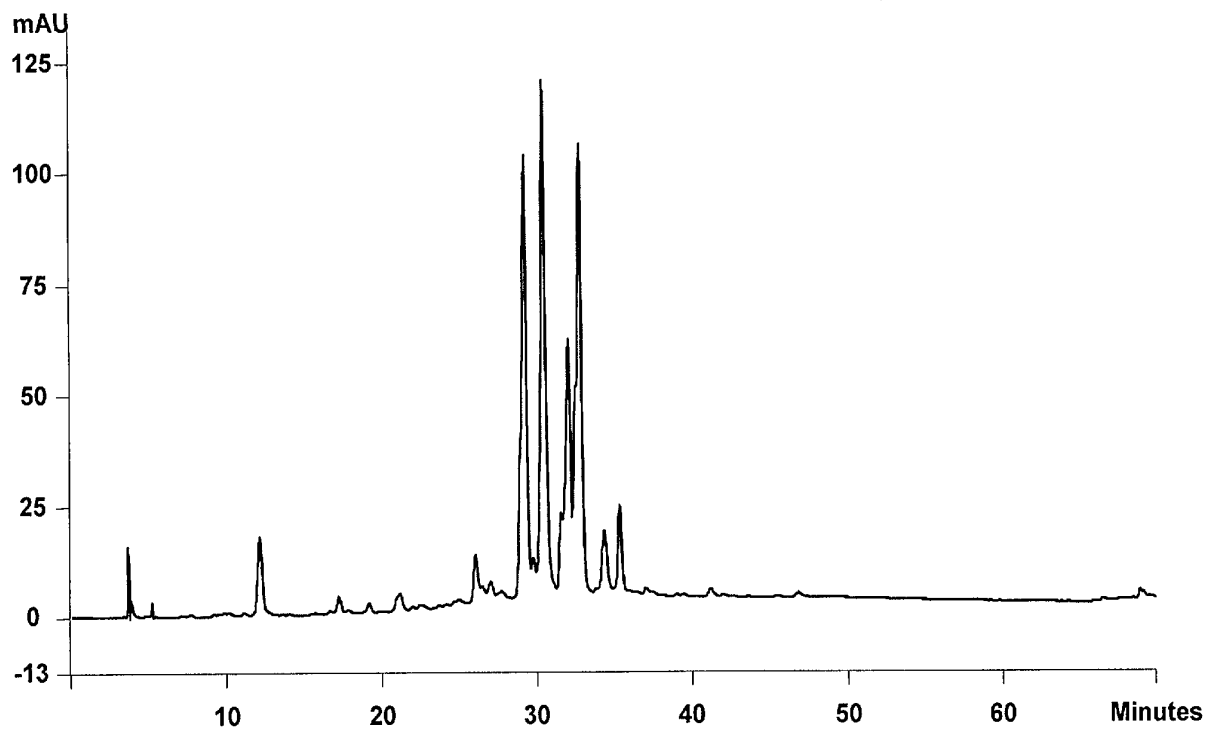


Figure 5

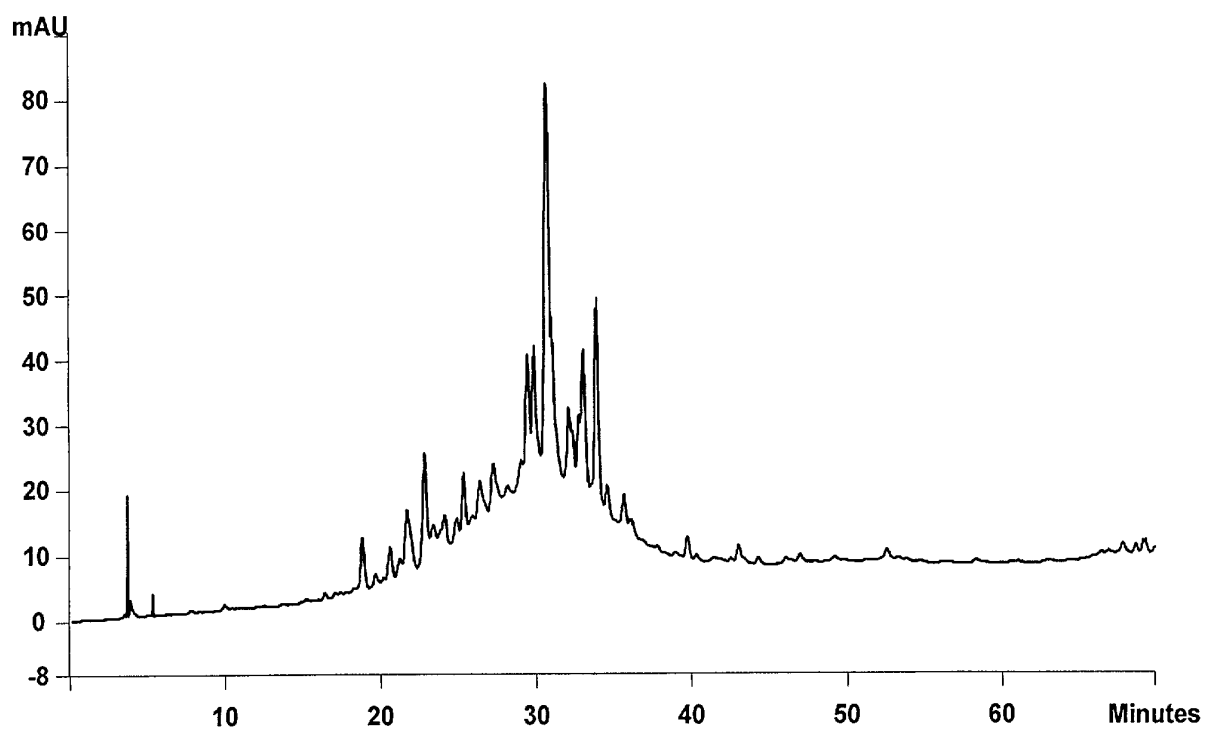


Figure 6

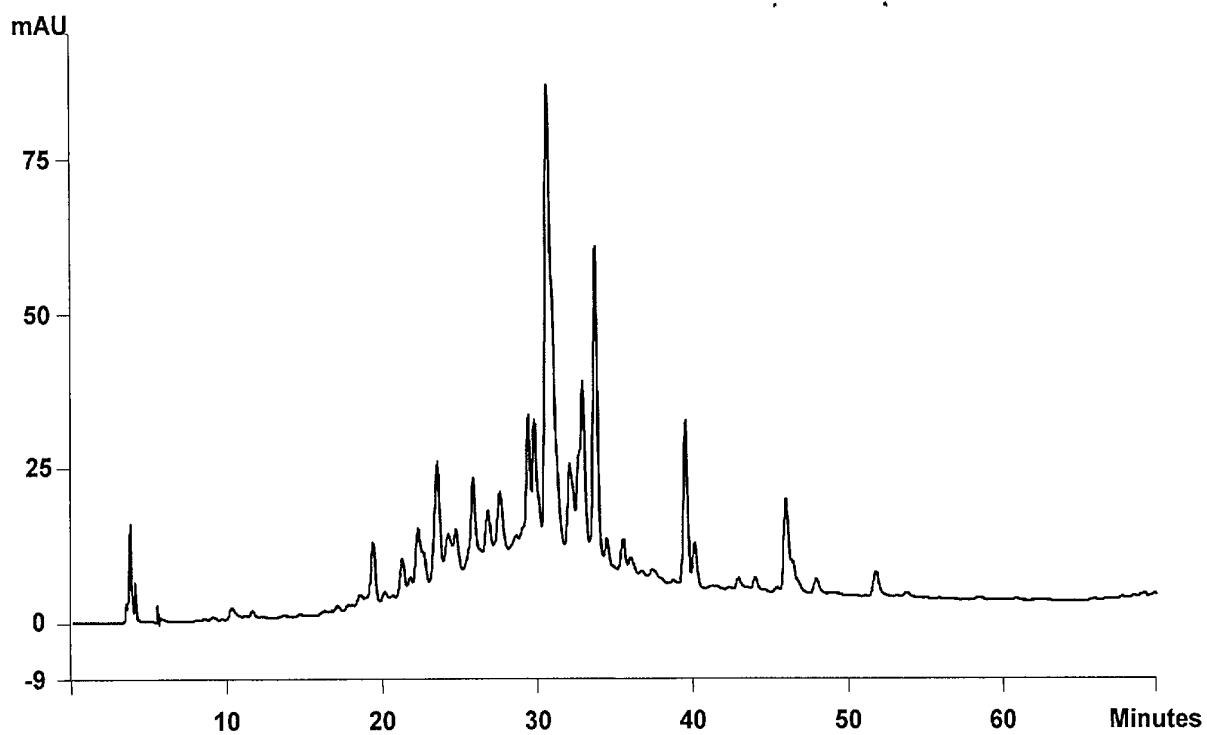


Figure 7

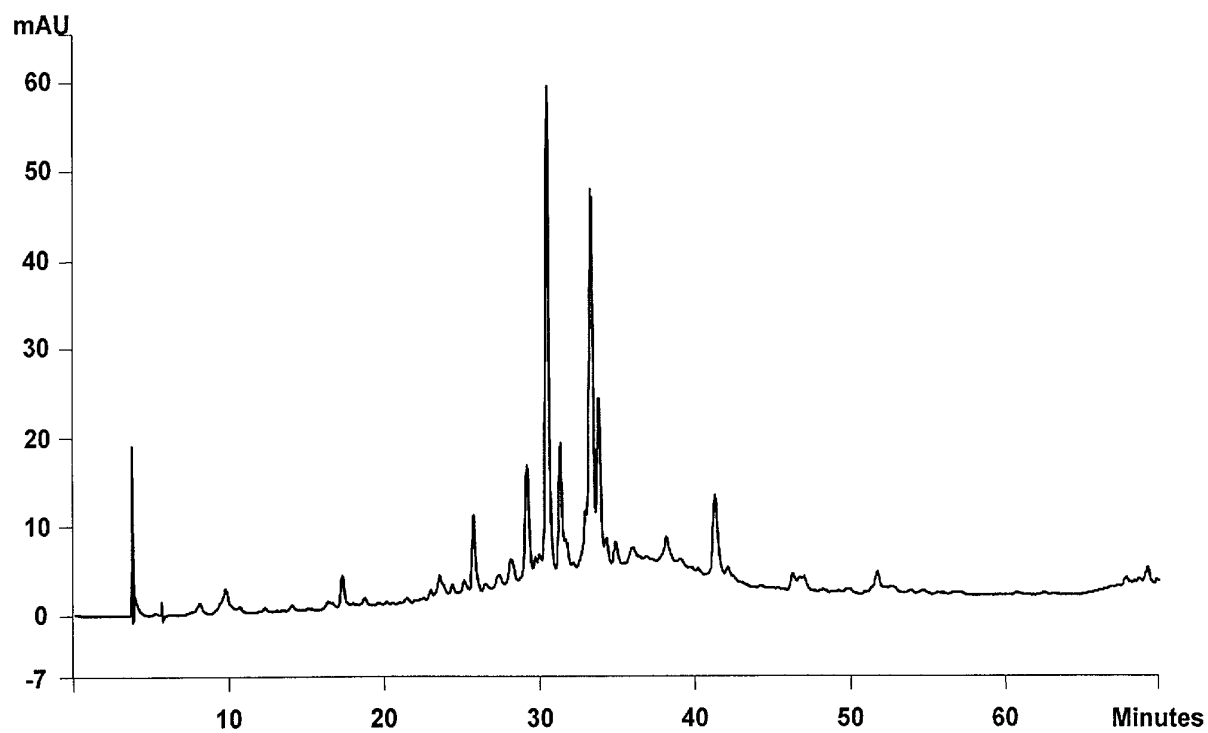


Figure 8

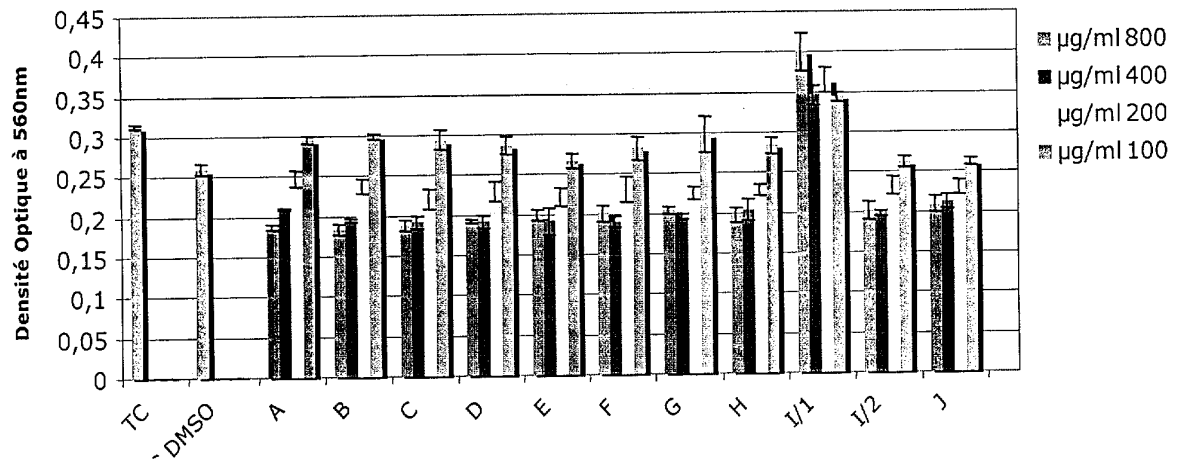


Figure 9

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 692855
FR 0609930

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	DIMO T ET AL: "Glucose lowering efficacy of the aqueous stem bark extract of Trema orientalis (Linn) Blume in normal and streptozotocin diabetic rats" PHARMAZIE, vol. 61, no. 3, mars 2006 (2006-03), pages 233-236, XP001536668 ISSN: 0031-7144 * abrégé *	7-20	A61K36/00 A61P3/00
X	DE LOS ANGELES GATO M ET AL: "PRELIMINARY STUDY ON THE HYPO GLYCEMIC ACTIVITY OF VACCINIUM-MYRTILLUS" TRABAJOS COMPOSTELANOS DE BIOLOGIA, vol. 9, 1982, pages 5-14, XP009089240 ISSN: 0211-0733 * abrégé *	7-20	
X	OJEWOLE ET AL: "Evaluation of the analgesic, anti-inflammatory and anti-diabetic properties of Sclerocarya birrea (A.Rich.) Hochst. stem bark aqueous extract in mice and rats" PHYTOTHERAPY RESEARCH, vol. 18, no. 8, 2004, pages 601-608, XP018001515 * abrégé *	7-20	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) G01N A61K
X	SWANSTON-FLATT S K ET AL: "TRADITIONAL PLANT TREATMENTS FOR DIABETES STUDIES IN NORMAL AND STREPTOZOTOCIN DIABETIC MICE" DIABETOLOGIA, vol. 33, no. 8, 1990, pages 462-464, XP002450039 ISSN: 0012-186X * abrégé *	7-20	
----- -/-			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 septembre 2007		Vandenbogaerde, Ann	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 692855
FR 0609930

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	GUERRERO RICARDO O ET AL: "Bioassay screening of Amazonian plants." PUERTO RICO HEALTH SCIENCES JOURNAL SEP 2003, vol. 22, no. 3, septembre 2003 (2003-09), pages 291-297, XP009089198 ISSN: 0738-0658 * abrégé *	1-6	
A	----- MOSMANN T: "RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CULLAR GROWTH AND SURVIVAL: APPLICATION TO PROLIFERATION AND CYTOTOXICITY ASSAYS" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 65, 1983, pages 55-63, XP008025247 ISSN: 0022-1759 * abrégé * -----	1-6	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 septembre 2007		Vandenbogaerde, Ann	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			