

Inter. Cl. **A61K 36/00 (2018.01);**
A61K 9/16 (2018.01) ;
A61P 1/00 (2018.01)

N° 21362

FASCICULE DE BREVET D'INVENTION

21 Numéro de dépôt : 1202300281

22 Date de dépôt : 07/07/2023

30 Priorité(s) :

24 Délivré le : 31/01/2024

45 Publié le : 10.05.2024

73 Titulaire(s) :

LEGBA Kossi Brice Boris,
 Campus Universitaire d'Abomey-Calavi,
 01 B.P. 2009, ABOMEY-CALAVI (BJ)

72 Inventeur(s) :

LEGBA Kossi Brice Boris (BJ) ;
Victorien Tamègnon DOUGNON (BJ)

74 Mandataire :

54 Titre : Phyto-médicament à base de *Uvaria chamae* P. Beauv et son procédé de fabrication.

57 Abrégé :

La présente invention concerne un phyto-médicament à base de *Uvaria chamae* P. Beauv et son procédé de fabrication. En particulier la présente invention concerne un phytomédicament ayant des propriétés antibactériennes, capable de traiter les infections digestives d'origine bactérienne. Le phyto-médicament objet de la présente invention se présente solide et est obtenu en séchant les différentes feuilles au laboratoire à une température ne dépassant pas 20°C pendant 10 jours, elles sont ensuite broyées, tamisées et stockée dans des bocaux en plastiques, à une température ambiante, prise dans des proportions définies, elles sont mélangées et réparties dans des gélules et mises dans des infusettes. Le produit objet de la présente invention se distingue des produits existants par le fait qu'il est obtenu à partir de substances naturelles. En outre, l'efficacité du produit est démontrée contre les souches multirésistantes d'entéropathogènes. Les tests in vitro et in vivo effectués ont présenté des résultats intéressants. L'on note par ailleurs une absence de toxicité et un faible cout de production et donc un coût accessible par rapport aux antibiotiques conventionnels.

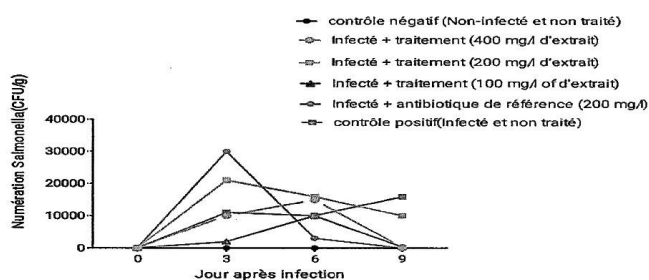


Figure 1 : Dénombrement de *Salmonella* à partir des matières fécales de poussins infectés par *S. Typhimurium* 14028 et traités avec l'extrait aqueux de feuilles de *U. chamae* et la Colistine

Fig. 1

Phyto-médicament à base de feuille de *Uvaria Chamae* P. Beauv et son procédé de fabrication

La présente invention concerne un phyto-médicament à base des feuilles *Uvaria chamae* P. Beauv et son procédé de fabrication. En particulier la présente invention concerne un phyto-médicament ayant des propriétés antibactériennes, capable de traiter les infections digestives d'origine bactérienne.

Les infections digestives d'origine bactérienne constituent un enjeu majeur de santé publique dans le monde entier, notamment dans les pays en développement où les conditions d'hygiène et les infrastructures sanitaires peuvent être précaires. Ces infections peuvent être causées par des bactéries pathogènes telles que *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae* et *Yersinia*, entre autres.

Les symptômes incluent des diarrhées, des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et de la fièvre, qui peuvent être graves et mettre en danger la vie des patients vulnérables tels que les enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées. En outre, ces infections peuvent causer des épidémies, entraînant ainsi des coûts sociaux et économiques considérables pour les gouvernements et les communautés.

Les traitements actuels des infections digestives d'origine bactérienne reposent sur l'utilisation des antibiotiques. La prise en charge de ces infections est fortement handicapée par le phénomène de la résistance aux antimicrobiens, qui est aujourd'hui un problème majeur de santé publique.

Selon l'OMS, les infections résistantes aux médicaments pourraient être responsables de 10 millions de décès chaque année d'ici à 2050 et causer des pertes économiques lourdes. Ainsi le besoin actuel de nouvelles sources d'antibiotiques pour le traitement des infections devient alors une nécessité. Par ailleurs, de nombreux antibiotiques induisent des effets secondaires pour l'organisme et peuvent être à l'origine d'intoxications, notamment par surdosage ou par interaction avec d'autres médicaments ainsi que d'allergies. D'autres antibiotiques s'avèrent coûteux, ce qui limite l'accès à des traitements efficaces pour les personnes dans les régions où les infections sont courantes. D'autres, en revanche, sont de nature à détruire les bactéries bénéfiques dans l'intestin, ce qui peut affecter la digestion et l'absorption des nutriments, et augmenter le risque d'infections secondaires. Par ailleurs, l'utilisation excessive de tels antibiotiques peut contribuer à la pollution environnementale et à la résistance antimicrobienne, ce qui peut avoir des effets néfastes sur la santé publique à long terme.

La recherche de nouveaux traitements sûrs et efficaces contre les infections digestives d'origine bactérienne est donc cruciale pour améliorer la santé publique et réduire l'impact de ces maladies dans le monde.

L'état de la technique fait ressortir de nombreuses plantes aux propriétés antibactériennes, qui sont utilisées dans leur état naturel sous forme d'infusion ou de décoction pour certaines. D'autres connues dans l'état de l'art sous la forme de poudre, d'extrait, de teintures-mères,

constituent bien souvent des solutions contre les infections dues aux entéropathogènes. Toutefois, le nombre limité d'études scientifiques menées sur ces plantes médicinales rend difficile la validation de leur efficacité et de leur innocuité.

- 5 Un des buts de la présente invention est de fournir un phytomédicament qui présente des propriétés antibactériennes, efficace contre les souches multirésistantes d'entéropathogènes et sans effets secondaires significatifs.

Un autre objet de l'invention est de fournir un procédé de préparation d'un phyto-médicament qui présente des propriétés multi-médicaments.

- 10 Un autre but de l'invention est de fournir un phyto-médicament qui a le potentiel de contribuer à la prise en charge efficace des gastro-entérites, de la fièvre typhoïde et autres infections dues aux entéropathogènes, ce qui aura pour effet de réduire le fardeau de la résistance aux antimicrobiens.

- 15 Un autre but de la présente invention est de fournir un phyto-médicament qui peut prendre la forme d'infusettes ou de gélules.

- Les buts ci-dessus et d'autres de l'invention sont atteints en fournissant de la phyto-médecine à base de *Uvaria chamae* P. Beauv et autres plantes couramment disponibles, notamment le *Cymbopogon citratus*. Le produit est susceptible d'être obtenu dans un premier temps en séchant à l'ombre les feuilles fraîches de *U. chamae* et autres plantes après avoir été triées
20 puis rincées à l'eau distillée. La matière sèche est ensuite pulvérisée à l'aide d'un broyeur pour obtenir de la poudre normalisée. La poudre est pesée, prise dans des proportions définies, et répartie dans des gélules ou conditionnée dans des infusettes.

- 25 Le produit qui vient résoudre ces différents problèmes et complications, se veut un médicament efficace dans le traitement des infections dues aux entéropathogènes. Les études scientifiques, et particulièrement à visée antibiotique, des plantes sélectionnées dans cette invention, n'ont fait l'objet d'aucun travail scientifique. Sa formule a été validée après les tests *in vitro* et *in vivo*, l'évaluation des paramètres toxicologiques et la mise en évidence de composés bioactifs.

- 30 Le processus d'obtention du phyto-médicament peut être illustré à travers le design expérimental qui se veut à titre d'exemple sans être limitatif.

Exemple 1 : Enquête ethnopharmacologique

- 35 Une enquête ethnopharmacologique a été menée auprès des herboristes de marché du Sud-Bénin. Un total de quatre-vingt-dix (90) herboristes ont été visités dans neuf communes du sud-Bénin. L'étude a été réalisée dans 30 marchés de ces communes. Trois (03) herboristes ont été visités dans chaque marché. Le critère de choix de ces herboristes a résidé essentiellement dans la richesse de leurs étalages. Dantokpa, Wologuèdè, Fifadji, Gbégamey, Abomey-Calavi, Godomey, Cococodji, Akassato, Glo-djigbé, Zè, Sèdjè-dénou, Hèkanmin, Adanwounssa, Allada, Sékou, Agbanou, Avakpa, Pahou, Kpomassè, Zobè, Comè, Oundo, Grand-marché, Ahangbomè, Dondo, Dangbo-aga, Dangbo-manlomey, Gouti, Adjohoun et

Azowlissè figuraient parmi les marchés visités. L'enquête a permis de recenser cinquante-sept (57) plantes médicinales utilisées dans le traitement des salmonelloses. *Senna siamea*, *Phyllanthus amarus*, *Uvaria chamae*, *Vachellia sieberiana* (DC.) Kyal. & Boatwr, *Heterotis rotundifolia*, *Crateva adansonii*, *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle, *Acanthospermum hispidum*, *Corchorus oltorius* et *Dialium guineense* étaient les plantes les plus citées. Sur la base des fréquences de citations, de la citation dans la littérature et des caractéristiques des recettes dans lesquelles elles ont été citées, *S. siamae*, *P. amarus*, *L. camara* et *U. chamae* ont été présélectionnés.

10 Exemple 2 : Extraction

Les organes des plantes sélectionnées ont été collectés puis séchés au laboratoire à une température ne dépassant pas 20°C pendant une dizaine de jours. Le matériel séché a été ensuite pulvérisé à l'aide d'un broyeur Retsch de type SM 2000/1430/Upm/Smf. Les poudres obtenues ont été identifiées et stockées dans des bocaux en plastique, à température ambiante du laboratoire (entre 16 et 20°C). Les extraits totaux aqueux et éthanoliques ont été obtenus grâce à la méthode de macération. Cinquante (50) grammes de poudre ont été macérés dans 500 ml d'eau distillée ou d'éthanol sur un agitateur "stuart Bioblock scientific Fisher" pendant 72 heures à la température ambiante. L'homogénat obtenu a été filtré trois fois sur du coton hydrophile suivi d'une filtration sur papier Wattman No 1. Ce filtrat a été ensuite séché à 45 °C à l'étuve. Le rendement le plus élevé est obtenu avec l'extrait éthanolique de *L. camara* (19,12%) alors que le plus faible rendement (5%) est obtenu avec l'extrait aqueux de *P. amarus*. Les tests de stérilité ont révélé l'absence de contamination au niveau de tous les extraits.

25 Exemple 3 : Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de *S. siamae*, *P. amarus*, *L. camara* et *U. chamae* contre des souches bactériennes responsables d'infections digestives

Une étape préliminaire de valorisation des plantes présélectionnées a consisté à évaluer leur activité antibactérienne sur quelques souches d'entérobactéries pathogènes. Le test a été réalisé à travers l'antibiogramme et la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice, et la Concentration Minimale Bactéricide.

Les souches présentent une sensibilité variable à l'égard des extraits. Les diamètres d'inhibition varient entre 7,5 et 21 mm. L'extrait éthanolique de feuilles de *P. amarus* possède la meilleure activité antibactérienne. L'extrait est très actif (+++) sur 50% des souches et présente le plus grand diamètre d'inhibition des extraits sur les souches (21 mm sur *S. flexneri*). Tous les extraits, à l'exception de l'extrait aqueux de *P. amarus* sont actifs sur *K. oxytoca*. Seul l'extrait éthanolique de *L. camara* est très actif (+++) sur *C. freundii* avec un diamètre d'inhibition de 20,5±0,71 mm. Seul l'extrait aqueux de feuilles de *U. chamae* est actif sur *E. coli* (souche de référence ATCC 25922) avec un diamètre d'inhibition de 14 mm. A l'exception de *E. coli* qui est sensible (+) à l'extrait éthanolique de feuilles de *U. chamae*, de *S. Cholerasius* et *P. aeruginosa* qui sont assez sensibles (++) à l'extrait aqueux de feuille

de *U. chamae*, toutes les souches qui présentent une sensibilité aux extraits ont présenté un diamètre d'inhibition supérieur à 9 mm, donc une très grande sensibilité (+++).

Exemple 4 : Efficacité *in vitro* des extraits de *U. chamae*, *P. amarus* et *L. camara* contre des souches bactériennes responsable d'infections digestives

Un test d'efficacité *in vitro* a été réalisé afin de retenir les extraits et les souches à utiliser. C'est ainsi que les extraits aqueux et éthanolique de *U. chamae*, *P. amarus* et *L. camara* ont été testés sur 10 souches multirésistantes de *Salmonella* isolées au Bénin et sur la souche de référence *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. De ce test, il est ressorti que l'extrait aqueux de feuilles de *U. chamae* a été actif sur 90 % des souches testées. Cet extrait a donc été retenu pour le test *in vivo*.

Exemple 5 : Efficacité *in vivo* des extraits de *U. chamae* contre *Salmonella spp*

Cette étude s'est proposée pour une valorisation optimale des plantes sélectionnées, d'évaluer l'efficacité *in vivo* de leurs extraits sur *Salmonella spp*. Le modèle d'étude coquelets *Isa brown* a été choisi d'abord parce que les salmonelles mineures telles que *Salmonella* Typhimurium sont connues pour leur capacité à infecter les volailles mais également parce que ce modèle a démontré son efficacité dans des études précédentes.

Toutefois, avant le test d'efficacité *in vivo*, une induction expérimentale ayant précédé le test d'efficacité *in vivo* a montré que la concentration d'inoculum 9.10^8 UFC/ml permet d'induire avec succès les salmonelloses chez les coquelets *Isa brown* âgés de trois jours. En outre, sans traitement, la maladie a été maintenue pendant 10 jours.

Sur cette base le test d'efficacité réalisé a montré que l'extrait aqueux de *U. chamae* a inhibé *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 chez les poussins à 100, 200 et 400 mg/l, mais la charge bactérienne n'a pas été annulée. Par ailleurs, à 200 et 400 mg/L, l'extrait a montré une meilleure activité *in vivo* que la Colistine sur *salmonella sp*. Ces données biologiques intéressantes obtenues sont suffisantes pour proposer la formulation de phytomédicaments.

Exemple 6 : Caractérisation chimique et toxicologique

Les preuves d'activité biologiques ont été renforcées par les données phytochimiques et toxicologiques. Tous les extraits ont présenté une teneur relativement élevée en polyphénols et flavonoïdes, variable d'un extrait à un autre et à laquelle on peut attribuer les propriétés antibactériennes des extraits. La cytotoxicité larvaire a montré que tous les extraits présentent une CL_{50} supérieure à 0,1 mg/ml, ce qui montre qu'aux concentrations testées, les extraits sont non cytotoxiques. Dans le cadre du test de toxicité aiguë effectué à une dose unique de 2000 mg/kg de poids corporel, aucun dysfonctionnement n'a été enregistré au plan biochimique, hématologique et histologique même si, comme dans la littérature scientifique, les extraits de *U. chamae* ont induit une augmentation de l'ASAT et de l'ALAT.

C'est sur la base des résultats précédents que ce phyto-médicament a été formulé. Pour masquer le goût amer de la poudre de feuilles de *U. Chamae*, *Cymbopogon citratus* a été associé à la formulation (19% de *U. Chamae* et 81% de *Cymbopogon citratus*). Pour ce qui

concerne la forme gélule, les gélules de taille 0 ont été remplies sur un gélulier semi-automatique de 80. Les essais d'uniformité de masse ont été menés conformément à la pharmacopée européenne, puis les gélules ont été conditionnées dans des boîtes à raison de 24 gélules par boîte.

- 5 Quant à la forme infusette, des infusettes de thé ont été utilisées pour la formulation de thé à partir de la poudre de *U. chamae*. Les infusettes ont été remplies manuellement avec la poudre après pesage, pour avoir une masse de 2 g. Chaque infusette remplie a été pesée pour les tests d'uniformité de masse.

- 10 Le produit objet de la présente invention se distingue des produits existants par le fait qu'il est obtenu à partir de substances naturelles. En outre, l'efficacité du produit est démontrée contre les souches multirésistantes d'entéropathogènes. Les tests *in vitro* et *in vivo* effectués ont présenté des résultats intéressants. L'on note par ailleurs une absence de toxicité et un faible coût de production et donc un coût accessible par rapport aux antibiotiques conventionnels.

15

REVENDEICATIONS

1. Phytomédicament présentant des propriétés antibactériennes, caractérisé en qu'il est obtenu à base de *Uvaria chamae* P. Beauv et autres plantes médicinales plus particulièrement le
- 5 *Cymbopogon citratus*
2. Procédé de fabrication du Phytomédicament selon revendication 1, caractérisé en ce que sous forme solide, il est obtenu suivant les étapes suivantes :
- 10 - séchage des différentes feuilles au laboratoire à une température ne dépassant pas 20°C pendant 10 jours ;
- les feuilles séchées sont ensuite broyées, tamisées et stockée dans des bocaux en plastiques, à une température ambiante comprise entre 16°-20°C.
- 3- Procédé de fabrication du Phytomédicament selon revendication 1, caractérisé en ce qu'il permet d'obtenir la forme gélule contenant uniquement la poudre de *U. chamae* ayant un
- 15 volume de 0,68 ml/gélule (Gélule de taille 0).
- 4- Procédé de fabrication du Phytomédicament selon revendication 1, caractérisé en ce qu'il permet d'obtenir la forme infusette par l'association de la poudre de *U. chamae et*
- 20 *Cymbopogon citratus*, dans des proportions 19% de *U. Chamae* et 81% de *Cymbopogon citratus*.
- 5- Procédé de fabrication du Phytomédicament selon revendication 4, caractérisé en ce que la masse totale par infusette est de 2 g.
- 25
6. Phytomédicament selon les revendications précédentes, caractérisé en ce que les extraits totaux aqueux et éthanoliques utilisé pour les tests d'efficacité ont été obtenus par macération.
7. Phytomédicament selon l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que pour les tests d'efficacité, les poudres ont été macérées dans 500 ml d'eau distillée ou d'éthanol sur un
- 30 agitateur pendant 72 heures à la température ambiante entre 16 et 20°C, l'homogénat obtenu ayant été filtré sur du coton hydrophile suivi d'une filtration sur papier wattman n°1, puis le filtrat séché à 45°C.
8. Phytomédicament selon revendication l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que les extraits desdites plantes sont actifs contre les souches multirésistantes d'entéropathogènes.
- 35
9. Phytomédicament selon l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que lesdits extraits sont actifs *in vivo* contre les souches multirésistantes de *Salmonella spp*, le modèle d'étude coquelets *Isa brown* ayant été utilisé pour les tests antibactériens *in vivo*.
10. Phytomédicament selon l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que lesdits
- 40 extraits ne présentent pas de toxicité.

11. Phytomédicament selon l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que lesdits extraits présentent une CL_{50} supérieure à 0,1 mg/ml, attestant qu'aux concentrations testées, lesdits extraits sont non cytotoxiques.

5 12. Phytomédicament selon l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que dans le cadre du test de toxicité aigüe effectué à une dose unique de 2000 mg/kg de poids corporel.

13. Phytomédicament selon l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que la teneur en flavonoïdes de l'extrait aqueux de feuilles : $41,061 \pm 0,4332$ en μg d'équivalent de Rutine (ER)/100 mg d'extrait et la teneur en polyphénols des extraits aqueux de feuilles de *U. chamae* était 71.2643678 en μg EAG/100mg d'extrait.

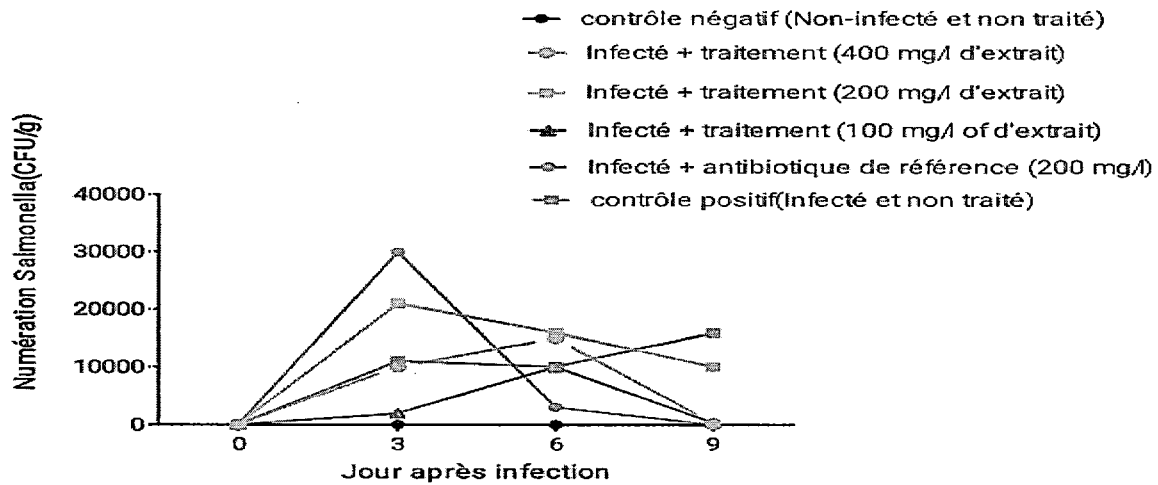
10 14. Phytomédicament selon l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que de la poudre de *Cymbopogon citratus* est ajouté à ladite formulation pour masquer le goût amer de la poudre de *U. Chamae*.

15

20

25

30



5 **Figure 1 :** Dénombrement de *Salmonella* à partir des matières fécales de poussins infectés par *S. Typhimurium* 14028 et traités avec l'extrait aqueux de feuilles de *U. chamae* et la Colistine

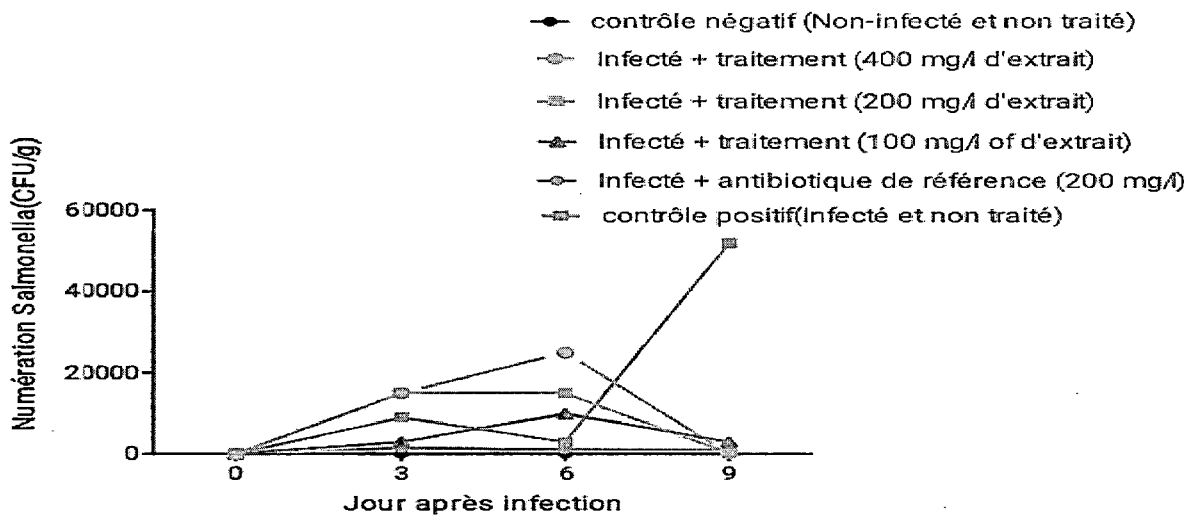


Figure 2: Dénombrement de *Salmonella* à partir des matières fécales de poussins infectés par *Salmonella* sp. (P19) et traités avec l'extrait aqueux de feuilles de *U. chamae* et la Colistine

5

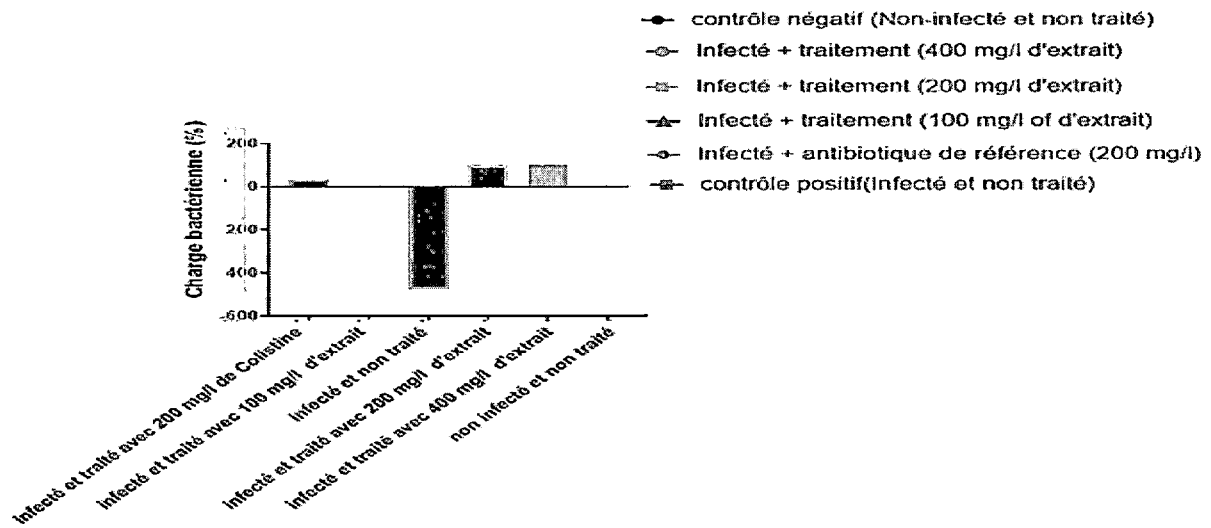


Figure 3 : Réduction de l'inoculum de *Salmonella* sp. (P19) entre le jour 3 et le jour 9 (sept jours de traitement)

ABREGE DESCRIPTIF

La présente invention concerne un phyto-médicament à base de *Uvaria chamae* P. Beauv et son procédé de fabrication. En particulier la présente invention concerne un phyto-médicament ayant des propriétés antibactériennes, capable de traiter les infections digestives d'origine bactérienne. Le phyto-médicament objet de la présente invention se présente solide et est obtenu en séchant les différentes feuilles au laboratoire à une température ne dépassant pas 20°C pendant 10 jours, elles sont ensuite broyées, tamisées et stockée dans des bocaux en plastiques, à une température ambiante, prise dans des proportions définies, elles sont mélangées et réparties dans des gélules et mises dans des infusettes.

Le produit objet de la présente invention se distingue des produits existants par le fait qu'il est obtenu à partir de substances naturelles. En outre, l'efficacité du produit est démontrée contre les souches multirésistantes d'entéropathogènes. Les tests in vitro et in vivo effectués ont présenté des résultats intéressants. L'on note par ailleurs une absence de toxicité et un faible cout de production et donc un coût accessible par rapport aux antibiotiques conventionnels.