



(51) Classification internationale des brevets :

A61K 31/10 (2006.01) A01N 65/00 (2009.01)  
A61K 36/8962 (2006.01) A01N 41/02 (2006.01)  
A61P 33/02 (2006.01) A01P 15/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/CH2011/000069

(22) Date de dépôt international :

1 avril 2011 (01.04.2011)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1001375 1 avril 2010 (01.04.2010) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :

**PANCOSMA SOCIÉTÉ ANONYME POUR L'INDUSTRIE DES PRODUITS BIOCHIMIQUES** [CH/CH]; 6, Voie-des-Traz, CH-1218 Le Grand-Saconnex (CH).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **BRAVO, David** [FR/CH]; 15, rue de la Plaine, CH-1400 Yverdon-les-Bains (CH). **LILLEHOJ, Hyun** [US/US]; 3126 Route 32, West Friendship, Maryland (US).

(74) Mandataires : **STONA, Daniel** et al.; Moinas & Savoye S.A., 42, rue Plantamour, CH - 1201 Genève (CH).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) :

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

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) :

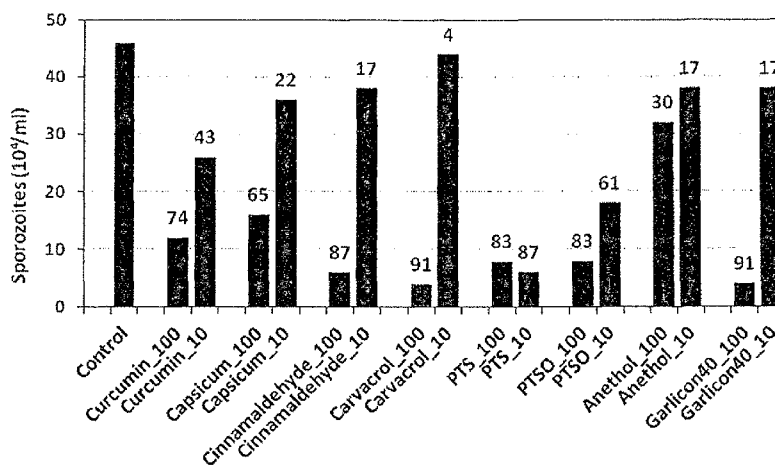
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g)

(54) Title : USE OF AT LEAST ONE DIALKYL THIOSULFONATE OR THIOSULFINATE FOR REDUCING THE NUMBER OF APICOMPLEXA IN AN ANIMAL

(54) Titre : UTILISATION D'AU MOINS UN THIOSULFINATE OU THIOSULFONATE DE DIALKYLE POUR REDUIRE LE NOMBRE D'APICOMPLEXES CHEZ UN ANIMAL



(57) Abstract : The invention relates to the use of at least one dialkyl thiosulfonate or thiosulfinate in order to reduce the number of apicomplexa, such as coccidioides and, in particular, Eimeria, in monogastric animals, such as poultry or pigs, or ruminants, such as cattle, sheep or goats.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation d'au moins un thiosulfinate ou thiosulfonate de dialkyle pour réduire le nombre d'apicomplexes, tels que les coccidies et en particulier les Eimeria, présents chez des animaux monogastriques, tels que la volaille ou le porc, ou des ruminants, tels que les bovins, les ovins ou les caprins.



**UTILISATION D'AU MOINS UN THIOSULFINATE OU THIOSULFONATE DE  
DIALKYLE POUR RÉDUIRE LE NOMBRE D'APICOMPLEXES CHEZ UN  
ANIMAL**

5 L'invention concerne l'utilisation d'au moins un thiosulfinate ou thiosulfonate de dialkyle pour réduire le nombre d'apicomplexes présents chez des animaux monogastriques, tels que la volaille ou le porc, ou des ruminants, tels que les bovins, les ovins ou les caprins.

10

**Arrière-plan de l'invention**

Les apicomplexes ou sporozoaires sont des organismes unicellulaires qui sont des parasites des vertébrés ou des invertébrés. Ces parasites peuvent provoquer des pathologies  
15 diverses.

Ainsi, par exemple, la coccidiose aviaire, qui est une infection protozoaire intestinale universelle perturbant gravement l'alimentation et la croissance de la volaille, est provoquée par plusieurs parasites du groupe des  
20 apicomplexes, en particulier du genre Eimeria, qui infestent l'intestin et se propagent d'un animal à l'autre par ingestion d'oocystes infectés.

Les Néospora et cryptosporidies, d'autres organismes appartenant au groupe des apicomplexes, peuvent également  
25 infester l'intestin des animaux.

Toutes ces infections entraînent des pertes économiques pour l'industrie de l'élevage et il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin efficace contre elles.

Les stratégies classiques de contrôle de ce type  
30 d'infections sont très coûteuses car elles reposent principalement sur la chimio-prophylaxie. De plus, l'émergence continue de souches résistant aux médicaments, comme les souches d'Eimeria, combinée au

durcissement de la réglementation et aux interdictions de l'utilisation de médicaments contre les coccidies dans l'élevage industriel de la volaille, obligent à de nouvelles approches et stratégies de contrôle des maladies.

5 En raison de la complexité de l'immunité de l'hôte et du cycle de vie des parasites, il s'avère particulièrement difficile de mettre au point de nouvelles stratégies d'intervention ou de nouveaux vaccins contre les apicomplexes.

10 La tendance actuelle est alors d'utiliser des vaccins à base de parasites vivants pour contrôler la coccidiose. Il y a dans le commerce, au niveau mondial, au moins dix vaccins de ce type. Tous ces vaccins recourent à des oocystes vivants infectés pour produire une infection réelle qui est  
15 destinée à déclencher une immunisation naturelle qui protège les poulets âgés de 3 à 4 semaines, ce qui correspond à l'âge où se déclare la majorité des cas de coccidiose.

Cette technique de vaccination a l'inconvénient majeur que les oocystes vivants ne peuvent être produits que par  
20 des poulets vivants, ce qui demande beaucoup de travail et implique de nombreuses manipulations.

Le document US 2006/122266 mentionne l'utilisation de, entre autres composés, l'allicine qui est un thiosulfinate de diallyle, c'est-à-dire un thiosulfinate de  
25 dialkylène, donc un produit contenant 2 insaturations, pour traiter la malaria.

Le document EP 2 110 128 cite le propyl propyl thiosulfinate (PTS) et le propyl propyl thiosulfonate (PTSO) comme composés anti-bactériens et anti-microbiens ; tous les  
30 organismes cités dans ces documents sont des bactéries, c'est-à-dire des procaryotes, alors que les apicomplexes sont des eucaryotes ; les structures cellulaires entre les procaryotes et les eucaryotes sont totalement différentes.

Le document WO 2004/084645 traite des utilisations de l'allicine. Aucune utilisation contre les apicomplexes n'est mentionnée ou suggérée dans ce document.

L'extrait de la banque de données WPI, Week 199838, Thomson Scientific, London, GB, AN 1998-440169 & HU 9 602 190 A2 du 28 mai 1998 mentionne l'utilisation d'une combinaison d'huile d'ail, de thymol, d'huile de menthe poivrée, d'huile citrique et de diluants ou supports pour traiter et prévenir les coccidioses ; étant donné qu'il existe une grande variété de constituants dans ces composés, rien dans ce document ne permet de dire lequel de ces composés est actif, seul ou en combinaison avec d'autres constituants.

La publication de Lewis M. R. et al., « Effects of dietary inclusion of plant extracts on the growth performance of male broiler chickens », British Poultry Science, Longman Group, GB LNKD-DOI :10.1080/00071660301940, vol. 44, no. Suppl. 1, 1<sup>er</sup> janvier 2003, page S43, XP008104094ISSN : 0007-1668, ainsi que la publication de Demir E. et al., « The use of natural feed additives as alternatives for an antibiotic growth promoter in broiler diets », British Poultry Science, Longman Group, GB LNKD-DOI:10.1080/00071660301944, vol. 44, no. Suppl. 1, 1<sup>er</sup> janvier 2003, pages S44 et S45, XP008104095ISSN:0007-1668, se rapportent à la croissance d'animaux auxquels on fait ingérer divers composés, dont de l'ail ; aucun effet sur les apicomplexes n'est mentionné dans ces documents.

Le document US 2009/018194 a trait à l'utilisation de PTS ou de PTSO pour traiter des plantes.

Le document EP 1 721 534 concerne l'utilisation de dérivés du genre Allium comme conservateurs dans l'industrie alimentaire ou agroalimentaire.

### Exposé sommaire de l'invention

L'invention a pour but majeur de lutter contre les apicomplexes présents dans l'organisme d'animaux monogastriques, tels que la volaille ou le porc, ou des ruminants, tels que les bovins, les ovins ou les caprins.

Les recherches menées par les inventeurs leur ont permis de trouver des agents capables de détruire les apicomplexes. De façon surprenante, ces agents sont des composés connus, les thiosulfates et les thiosulfonates de dialkyle, en particulier, le thiosulfate de di(n-propyle) et le thiosulfonate de di(n-propyle), qui seront appelés respectivement PTS et PTSO dans la suite de la description.

L'utilisation de ces composés s'est révélée particulièrement efficace pour détruire les apicomplexes, en particulier les Eimeria.

En outre, ces composés peuvent être produits indépendamment de l'animal auxquels ils sont destinés, c'est-à-dire sans nécessiter d'oocystes, à partir de produits naturels ou par synthèse organique.

Par ailleurs, ils présentent l'avantage surprenant d'être efficaces même à très faibles doses.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention vont maintenant être décrits en détail dans l'exposé qui suit et qui est donné en référence à la figure unique annexée qui est un diagramme comparatif représentant la réduction du nombre de sporozoïtes en fonction des composés utilisés.

### Exposé détaillé de l'invention

Les thiosulfates et thiosulfonates de di-alkyle sont des composés répondant à la formule F suivante :



dans laquelle :

R et R', identiques ou différents, représentent chacun un groupement alkyle ; et

a vaut 1 ou 2.

De préférence, les groupements alkyle R et R' 5 comprennent de 1 à 5 atomes de carbone.

De plus, on utilise plus particulièrement comme groupements R et R', des groupements propyle, généralement n-propyle.

Au sein d'un même composé de formule F, les groupements 10 R et R' sont de préférence identiques.

Pour un thiosulfinate de dialkyle, dans la formule F, a vaut 1.

Pour un thiosulfonate de dialkyle, a vaut 2.

Comme composé(s) de formule F, il est avantageux 15 d'utiliser un thiosulfinate de dipropyle et/ou un thiosulfonate de dipropyle, en particulier le PTS et/ou le PTSO.

En effet, bien que le PTS puisse être un produit de 20 synthèse, on peut avantageusement l'extraire de plantes appartenant à la famille des alliées (selon la classification phylogénétique APG) et en particulier au genre *Allium*, qui est un membre de cette famille.

Les plantes les plus connues appartenant au genre 25 *Allium* sont le poireau (*Allium ampeloprasum*), l'oignon (*Allium cepa* L.), l'ail cultivé (*Allium sativum* L.), l'échalote (*Allium ascalonicum*), la ciboule (*Allium fistulosum* L.) et la ciboulette (*Allium schoenoprasum* L.).

Selon l'invention, on utilise de préférence un extrait 30 d'ail, en particulier d'ail cultivé (*Allium Sativum* L.). Il s'agit en général d'un extrait de bulbe d'ail.

Le PTSO peut être obtenu par synthèse ou décomposition (ou oxydation) du PTS.

L'obtention du PTS par extraction et du PTSO est notamment décrite dans la demande de brevet EP-A1-1 721 534, de la page 15, ligne 34, à la page 16, ligne 26.

Les thiosulfinates peuvent également être obtenus selon  
5 le procédé décrit dans la demande de brevet FR-A-2 813 884.

Bien entendu, on peut utiliser des mélanges en toutes proportions de

- plusieurs thiosulfinates de dialkyle ;
- plusieurs thiosulfonates de dialkyle ;
- 10 - au moins un thiosulfinate de dialkyle et au moins un thiosulfonate de dialkyle.

Des études ont montré que les animaux, en particulier, les volailles, ne développent pas de résistance contre ces composés, ce qui rend leur utilisation dans l'élevage  
15 industriel particulièrement intéressante.

Le PTS et/ou le PTSO sont utilisés à titre prophylactique.

Pour leur utilisation à titre prophylactique, on peut ajouter le ou les thiosulfinate et/ou thiosulfonate de  
20 dialkyle à la nourriture pour les animaux, par exemple, en les mélangeant quotidiennement à leur ration.

La quantité mise en œuvre est alors généralement de 2 mg par kg à 60 mg par kg de matière sèche d'aliment.

On peut éventuellement les diluer dans l'eau servie aux  
25 animaux, à raison de 1 à 30 mg/l d'eau, sur la base de la quantité moyenne bue par l'animal.

L'invention s'applique aux animaux monogastriques tels que la volaille ou le porc, ou des ruminants, tels que les bovins, les ovins ou les caprins.

30

#### Exemple comparatif

On a testé les propriétés anti-parasitiques des composés suivants :

- une oléorésine de capsicum (pigment *Capiscum frutescens*) contenant 6% en poids d'un mélange de capsaïcine et de dihydrocapsaïcine ;
- du carvacrol ;
- 5 - du cinnamaldéhyde ;
- de la curcumine ;
- de l'anéthol ;
- du PTS (selon l'invention) ;
- du PTSO (selon l'invention); et
- 10 - un extrait (selon l'invention) appelé « Garlicon 40 » contenant 400 ppm de composés organo-sulfurés caractéristiques de l'ail/oignon, 6,7% en poids de PTS et 34,3% en poids de PTSO.

On a préparé une première série d'échantillons constitués d'une solution aqueuse contenant 100 ppm des  
15 composés à tester précités et une deuxième série d'échantillons contenant seulement 10 ppm de ces composés.

Ensuite, afin de pouvoir tester l'effet des composés précités sur des *Eimeria*, on a procédé comme suit. On  
20 s'est procuré des oocystes fraîchement sporulés d'*Eimeria tenella* que l'on a conservés à 4°C dans une solution de dichromate de potassium à 2,5% (poids/volume) jusqu'à utilisation.

Puis, on a stérilisé les oocystes à l'eau de Javel avant d'isoler des sporozoïtes. On a détruit  
25 mécaniquement les parois des oocystes pendant 5 à 7 secondes à l'aide d'un broyeur à billes ayant des billes de 0,5 mm.

Le produit obtenu a ensuite été incubé pendant 45  
30 minutes à 41°C dans une solution tampon de PBS contenant

0,014 mol/l d'acide taurodésoxycholique et 0,25% en poids de trypsine pour libérer les sporozoïtes.

Les fluides libérés par l'excystation ont été filtrés et les sporozoïtes recueillis ont été lavés trois fois  
5 avec du milieu RPMI-1640 sous agitation à 2100 tours par minutes pendant 10 minutes à 4°C.

On a ensuite préparé des solutions de  $10^6$  sporozoïtes par millilitre que l'on a laissé incuber avec le même volume d'échantillon de composé à tester pendant 24  
10 heures.

Puis, on a mesuré la viabilité des sporozoïtes suivant la méthode d'exclusion du trypan bleu.

Les résultats sont visualisés sur la figure unique annexée où les nombres situés au-dessus de chaque bâton  
15 indiquent le pourcentage d'inhibition du composé correspondant et les nombres figurant à la suite du nom du composé sa concentration.

Une mesure a également été effectuée avec une solution témoin (dépourvue de composé à tester) appelée  
20 « Control » sur la figure.

Il apparaît, d'une part, que tous les composés testés à une concentration de 100 ppm, sauf l'anéthol, ont un effet d'inhibition ou destruction des sporozoïtes d'Eimeria tenella marqué (d'au moins 61%) et, d'autre  
25 part, que la curcumine, le cinnamaldéhyde, le carvacrol, le PTS et le PTSO ou l'extrait Garlicon 40 sont les plus performants (au moins 74%).

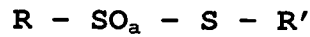
De plus, on constate avec étonnement que seuls le PTS et le PTSO présentent une efficacité élevée,  
30 respectivement, de 87% et 61%, à un taux de concentration de seulement 10 ppm.

Qui plus est, de façon surprenante, le PTSO a même une efficacité plus élevée à 10 ppm qu'à 100 ppm.

Revendications

1.- Utilisation prophylactique d'au moins un composé répondant à la formule F suivante :

5



dans laquelle :

R et R', identiques ou différents, représentent chacun un groupement alkyle ; et

10

a vaut 1 ou 2 ;

pour réduire le nombre d'apicomplexes chez un animal monogastrique ou un ruminant.

15 2.- Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle, dans la formule F, les groupements R et R' sont des groupements alkyle comprenant de 1 à 5 atomes de carbone.

20 3.- Utilisation selon la revendication 2, dans laquelle, dans la formule F, les groupements R et R' sont des groupements propyle.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, dans laquelle les groupements R et R' sont identiques.

25

5.- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, dans laquelle, dans la formule F, a vaut 1.

6.- Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle dans le composé de formule F est le thiosulfinate de dipropyle.

30

7.- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, dans laquelle, dans la formule F, a vaut 2.

8.- Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle dans le composé de formule F est le thiosulfonate de dipropyle.

5 9.- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans laquelle le ou les composé(s) de formule F se présente(nt) au moins en partie sous la forme d'un extrait de plante appartenant à la famille des alliées.

10 10.- Utilisation selon la revendication 9, dans laquelle le ou les composé(s) de formule F se présente(nt) au moins en partie sous la forme d'un extrait de plante appartenant au genre *Allium*.

15 11.- Utilisation selon la revendication 10, dans laquelle la plante du genre *Allium* est l'ail cultivé (*Allium Sativum* L.).

20 12.- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 11, dans laquelle l'animal est un monogastrique.

13.- Utilisation selon la revendication 12, dans laquelle l'animal est une volaille.

25 14.- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 11, dans laquelle l'animal est un ruminant.

15.- Utilisation selon la revendication 14, dans laquelle l'animal est un bovin.

30

16.- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 15, dans laquelle les apicomplexes sont des coccidies.

17.- Utilisation selon la revendication 16, dans laquelle les coccidies sont des Eimeria.

18.- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 15, dans  
5 laquelle les apicomplexes sont des Neospora ou des Cryptosporidies.

19.- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 18, à  
raison de 2 à 60 mg/kg de matière sèche d'aliment ou de 1 à  
10 30 mg/l d'eau de boisson.

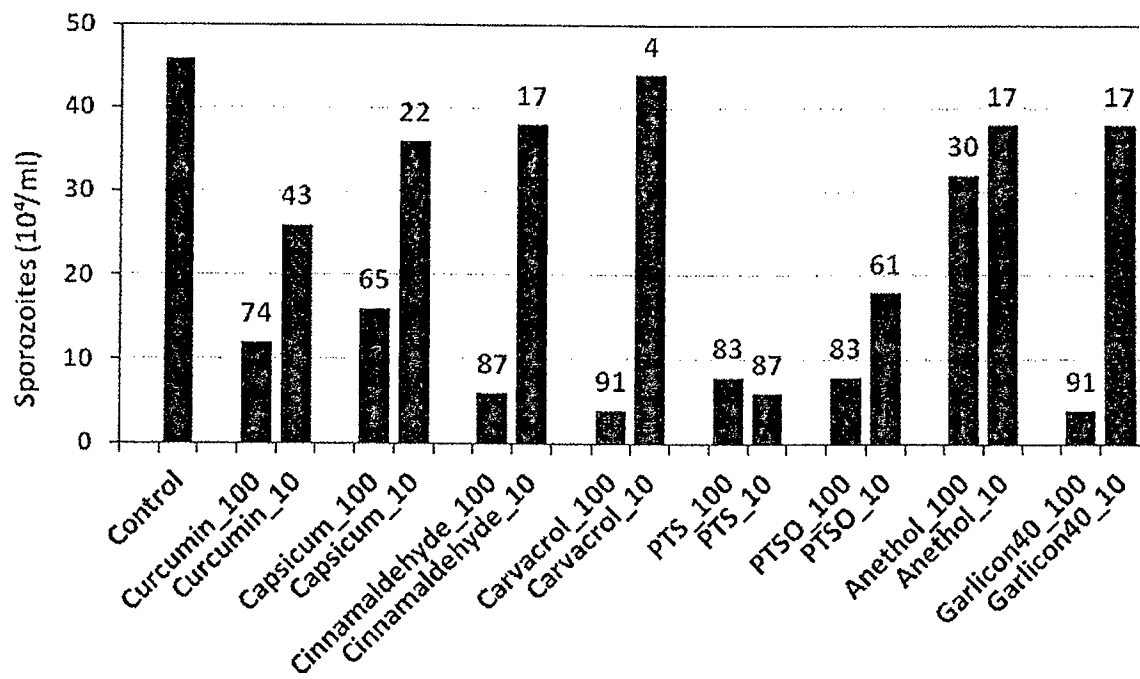


Figure unique