(19) ORGANISATION AFRICAINE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE

(51) Inter. Cl.[8] A61K 36/00 (2018.01); A61K 36/324 (2018.01); A61P 31/00 (2018.01)

(11) N° 21004

FASCICULE DE BREVET D'INVENTION

(21) Numéro de dépôt : 1202200303

(22) Date de dépôt : 23/06/2022

(30) Priorité(s) :

(24) Délivré le : 09/06/2023

(45) Publié le : 24.08.2023

(73) Titulaire(s) :

Université Joseph KI-ZERBO (UJKZ),
03 B.P. 7021, OUAGADOUGOU 03 (BF)

(72) Inventeur(s) :

TIEMTORE Rahimatou Yasmine Wendkuni (BF);
METUOR DABIRE Amana (BF);
OUERMI Djénéba (BF);
DJIGMA Florencia Wendkuuni (BF);
ZONGO Luc (BF) ;
SIMPORE Jacques (BF)

(74) Mandataire :

(54) **Titre : Extrait de Boswellia dalzielii pour l'efficacité des antibiotiques de la famille des β-lactamines.**

(57) **Abrégé :**

L'invention concerne des extraits à base de *Boswellia dalzielii* utilisée en association avec les antibiotiques de la famille des β-lactamines. Elle est utilisée comme inhibiteur naturel dans la lutte contre les résistances bactériennes par production d'enzymes (β-lactamases à spectre élargi). L'obtention de l'inhibiteur passe par les étapes de récolte, d'obtention des extraits et de formulation de la substance Elle peut avoir trois formes galéniques, à savoir orale, injectable et cutanée.

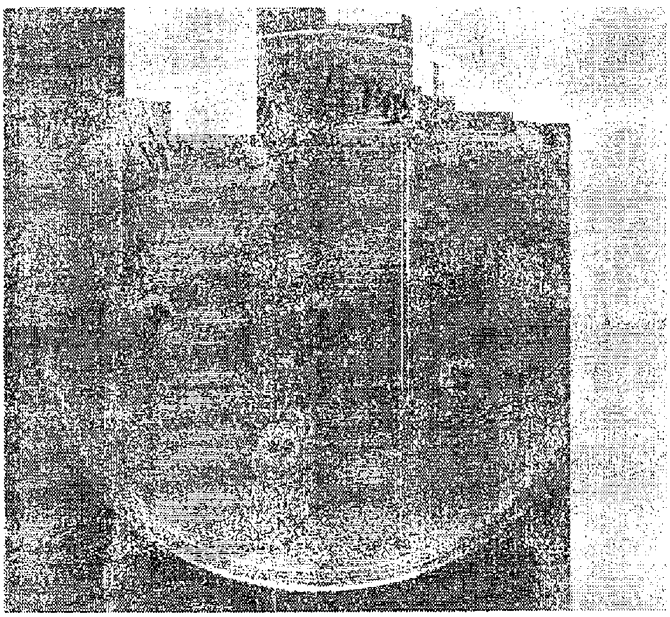


Fig. 1

La présente invention concerne des extraits à base de *Boswellia dalzielii.* Elle trouve avantageusement son utilisation dans la lutte contre les résistances bactériennes par production d'enzymes (β-lactamases) en association avec des antibiotiques de la famille des β-lactamines.

En l'état, l'utilisation des antibiotiques a pour but de ralentir la croissance ou de tuer les bactéries qui causent des infections et des maladies. Quand ces bactéries deviennent résistantes aux antibiotiques, ces derniers deviennent moins, voire complètement inefficaces. Cette résistance aux antibiotiques peut survenir parfois naturellement ou en cas d'utilisation inadéquate chez les personnes, les animaux et les plantes. Ainsi les bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent se propager facilement parmi les hommes et les animaux.

La synthèse d'antibiotiques existe dans la nature depuis plus de deux milliards d'années. Pendant tout ce temps, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance à leur action toxique. La résistance peut survenir comme un processus adaptatif sans rapport avec la structure d'un antibiotique ou se développer à la suite de la sélection de souches résistantes de micro-organismes sous l'influence d'antibiotiques. Les facteurs anthropiques associés à l'application des antibiotiques en médecine et, surtout, en agriculture depuis le milieu du 20ème siècle ont conduit à une évolution significative des mécanismes de résistance ; le temps nécessaire pour développer une résistance aux nouveaux médicaments a considérablement diminué (Holmes et al., 2016).

La résistance aux antibiotiques est un phénomène qu'on constate partout dans le monde, qui concerne un large éventail de microorganismes et dont la prévalence accrue menace la santé humaine et animale. Elle touche tous les domaines de la santé, intéresse de nombreux secteurs et a des effets sur l'ensemble de la société. La résistance aux antibiotiques menace le cœur même de la médecine moderne et la viabilité à long terme d'une riposte efficace de la santé publique mondiale face à la menace constante des maladies infectieuses. Les effets indirects de la résistance aux antibiotiques dépassent toutefois le cadre des seuls risques sanitaires et ses nombreuses conséquences sur le plan de la santé publique ont de vastes répercussions, notamment sur le développement. En effet, la résistance aux antibiotiques grève lourdement l'économie mondiale du fait des pertes économiques

liées à la baisse de la productivité provoquée par la maladie (de l'homme et de l'animal) et à l'augmentation du coût des traitements. Lorsque les bactéries résistent aux antibiotiques, les options dont on dispose pour traiter les maladies qu'elles provoquent deviennent plus limitées. Les conséquences directes d'une infection par des micro-organismes résistants peuvent être graves – durée plus longue de la maladie, hausse de la mortalité, hospitalisation prolongée, protection affaiblie lors d'une intervention chirurgicale ou d'autres actes médicaux et augmentation des coûts, notamment.

Des médicaments antimicrobiens efficaces sont des conditions indispensables pour les mesures préventives comme pour les mesures curatives, puisqu'ils protègent les patients de maladies potentiellement mortelles et garantissent que des procédures complexes, telles que la chirurgie et la chimiothérapie, peuvent être menées à moindre risque. Pourtant, la consommation abusive et excessive qui est systématiquement faite de ces médicaments dans la médecine humaine et la production alimentaire a mis chaque nation en danger. Rares sont les produits de remplacement actuellement en cours de mise au point. Le risque serait de se diriger inéluctablement vers une ère postantibiotiques où des infections courantes pourraient être à nouveau meurtrières.

Le rôle des enzymes bactériennes dans le développement de la résistance est plutôt polyvalent et implique plusieurs mécanismes clés (Wright, 2005). Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la paroi cellulaire, ainsi que la synthèse des acides nucléiques et des métabolites, servent de cible directe aux antibiotiques. Le mécanisme de résistance est associé à des modifications structurelles de ces enzymes. Un autre mécanisme est associé à la modification enzymatique des éléments structuraux affectés par les antibiotiques : par exemple, la modification des ribosomes par les méthyltransférases. Un grand groupe d'enzymes modifie ou détruit la structure des antibiotiques en les inactivant, c'est à ce groupe que nous nous sommes intéressés. Les enzymes bactériennes qui déterminent la résistance appartiennent généralement à de grandes superfamilles ; beaucoup d'entre eux provenaient d'enzymes qui avaient à l'origine d'autres fonctions (Morar and Wright, 2010). Les gènes responsables de la synthèse de ces enzymes et de leur variabilité mutationnelle sont souvent localisés sur des éléments génétiques mobiles, assurant ainsi la propagation rapide des résistances entre microorganismes. En effet la destruction ou la modification de la structure antibiotique est l'un des mécanismes les plus courants de résistance impliquant des enzymes. Selon le type de réactions

qu'elles catalysent, les enzymes impliquées dans ce mécanisme de résistance se subdivisent en hydrolases, transférases et oxydoréductases. Nous nous sommes focalisés principalement sur les Hydrolases plus précisément les β-lactamases. Les β-lactamases hydrolysent la liaison amide dans le cycle β-lactame, l'élément structurel commun de tous les antibiotiques β-lactamines (pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames). Ils forment une superfamille d'enzymes qui compte actuellement plus de 2 000 membres (Bonomo, 2017). Selon l'homologie des séquences d'acides aminés, les β-lactamases sont subdivisées en quatre classes moléculaires (Hall and Barlow, 2005). Les enzymes des classes A, C et D sont des hydrolases à sérine, les enzymes de la classe B sont des métalloenzymes. Les sérine β-lactamases ont des éléments structuraux similaires à ceux du domaine C des PBP, ce qui indique qu'ils sont liés au niveau de l'évolution (Ghuysen, 1994). L'évolution de la β-lactamase se développe via deux mécanismes principaux : l'émergence de nouvelles mutations dans les gènes d'enzymes connues et l'émergence d'enzymes avec une nouvelle structure. Le taux de mutation élevé des β-lactamases et la localisation de leurs gènes sur des éléments génétiques mobiles contribuent à la propagation rapide des bactéries résistantes, qui constituent une menace mondiale (Bush and Jacoby, 2010). Des bactéries portant simultanément jusqu'à huit gènes de β-lactamase ont été détectées (Bush, 2013).

Les β-lactamases de classe A (lactamases CTX-M, TEM, SHV et KPC) sont les plus courantes (Bush, 2013). La variabilité mutationnelle est une caractéristique des β-lactamases TEM et SHV. Les mutations clés du site actif augmentent le volume de l'enzyme et la rendent capable d'hydrolyser les molécules de masse des céphalosporines de la deuxième à la quatrième génération (Orencia et al., 2001). Ces formes mutantes sont connues sous le nom de β-lactamases à spectre élargi (BLSE). Certaines mutations de résidus d'acides aminés situés à distance du site actif sont compensatrices et peuvent avoir des effets multidirectionnels sur la stabilité (Grigorenko et al., 2018). Les β-lactamases de classe C hydrolysent efficacement les céphalosporines. Initialement, cette classe était représentée par les enzymes codées par des gènes chromosomiques et ayant un type d'expression inductible. Ensuite, des enzymes codées par les gènes situés sur des éléments mobiles ont été découvertes (Philippon et al., 2002). Les β-lactamases de classe D comprennent les β-lactamases de type OXA et sont les enzymes les plus structurellement diverses parmi les sérine

β-lactamases. La classe moléculaire B est une famille hétérogène de métallo-β-lactamases (MBL) (Bebrone, 2007). Ils contiennent un ou deux ions zinc dans leur site actif, hydrolysent la quasi-totalité des antibiotiques β-lactamines à l'exception des monobactames, et sont inhibés par des agents chélatants (EDTA, acide dipicolinique et o - phénanthroline). L'émergence de nouveaux variants de MBL (par exemple, les carbapénémases de type NDM) et leur co-expression avec les β-lactamases à sérine entraînent l'émergence de bactéries résistantes à tous les antibiotiques β-lactamines (Nordmann et al., 2011).

Afin de vaincre la résistance induite par la production de β-lactamases, une recherche active d'inhibiteurs de ces enzymes est actuellement en cours (Docquier and Mangani, 2018) (King et al., 2016). En pratique clinique, des combinaisons de β-lactames avec de l'acide clavulanique, du sulbactam et du tazobactam (qui contiennent un cycle β-lactame, forment un complexe acyl-enzyme plus stable et ont un faible taux de désacylation) sont utilisées de manière intensive pour inhiber les enzymes de classe A. Les inhibiteurs les plus récents qui sont structurellement similaires aux β-lactames mais ne contiennent pas de cycle β-lactame comprennent les diazabicyclooctanes (avibactam et MK-7655). Ils forment des complexes carbamyl-enzyme avec implication de la sérine catalytique, qui sont ensuite soumis à une recyclisation lente et réversible, accompagnée de la libération d'une molécule inhibitrice. Ces inhibiteurs se sont avérés efficaces contre les β-lactamases de classe A, C et en partie D. Les dérivés de l'acide boronique capables d'inhiber les carbapénémases de classe A sont largement étudiés.

Certaines études ont démontré une résistance des entérobactéries à certains inhibiteurs existant (acide clavulanique) (Amana et al., 2019), pour cela la découverte d'inhibiteurs ayant une bonne pénétration au niveau de la membrane des bactéries à Gram négatif serait en plus un grand pas dans le combat contre la résistance aux entérobactéries plus précisément les entérobactéries productrices de β-lactamases à spectre élargi (BLSE).

Les plantes médicinales constituent une réserve importante de molécules inhibitrices qui pourraient être très efficaces contre les bactéries productrices de β-lactamases.

Partie expérimentale (Test biologique)

Profil de résistances des souches d'entérobactéries

Des souches cliniques d'entérobactéries collectées à l'Hôpital Saint Camille de Ouagadougou (HOSCO) et au Centre Hospitalier Universitaire de Tengandogo (CHU-T) ont été utilisées pour les tests de résistances. Les antibiotiques suivants ont été testés : l'amoxicilline/acide clavulanique (AUG), Cefotaxime (CTX), ceftriaxone (CRO), Ceftazidime (CAZ), aztréonam (ATM), et imipenème (IMP).

Production de Bêta-lactamases par les souches d'entérobactéries

La production de Bêta-lactamases de nos souches d'entérobactéries résistantes a été prouvé par la méthode classique de Polymerase Chain Reaction (PCR), en utilisant des amorces spécifiques des gènes de Bêta-lactamases. Ainsi plusieurs types de gènes de Bêta-lactamases ont été identifiés, confirmant la résistance de ces souches par production d'enzymes.

Inhibition des Bêta-lactamases par *Boswellia dalzielii*

Protocole d'extraction de *Boswellia dalzielii*

Les différents organes (Feuilles et Racines) de *Boswellia dalzielii* ont été pulvérisés à l'aide d'un mortier en aluminium. 15 à 75 grammes de poudre ont été extraites avec du méthanol (150 à 350 ml) par macération pendant 48 heures à 37° C sous agitation mécanique à 200 tours/minute. Les filtrats ont été concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide, récupérés dans des boîtes de pétri et séchés à l'étuve à 37° C. Ces extraits obtenus ont été utilisés pour les tests phytochimiques et biologiques.

Préparation des extraits de *Boswellia dalzielii*

Cinquante (50) mg de l'extrait ont été pesés et ajoutés dans un volume de DMSO 99,9% compris entre 3 et 10 ml. Le mélange a été homogénéisé pour dissoudre l'extrait et obtenir une concentration comprise entre 5 et 20 mg/ml. À partir de la solution précédente nous avons fait une dilution au 1/10. La solution obtenue est d'une concentration comprise entre 0,5 et 5 mg/ml avec le DMSO 1%. À partir de la solution précédente, une autre dilution a été faite et nous avons obtenu une solution finale de concentration comprise entre 50 et 200 µg/ml.

Préparation de la solution d'antibiotique

Une solution mère d'antibiotique a été préparée en pesant 40 à 70 mg d'antibiotique en poudre. Elle a été dissoute dans 4 à 7 ml d'eau distillée stérile pour obtenir une concentration initiale comprise entre 5000 et 15 000 µg/ml, à partir de laquelle les différentes concentrations d'antibiotique ont été préparées. Toutes les manipulations ont été faites dans des conditions stériles soit sous la hotte, soit à côté de la flamme.

Activité inhibitrice des extraits des plantes A sur une souche d'entérobactérie résistante par production d'enzymes

Préalablement nous avons déterminé la plus grande concentration de l'antibiotique utilisé pour les tests in vitro n'inhibant pas la croissance des bactéries. Nous avons ensuite sélectionné une souche résistante à tous les antibiotiques et porteuse d'au moins deux gène de résistance pour les tests avec les extraits de Boswellia dalzielii.

C'est ainsi qu'à partir d'une pré culture d'une souche nommée U29, des ensemencements sur milieu liquide ont été effectués. Afin de déterminer la présence d'un inhibiteur dans Boswellia dalzielii, les conditions suivantes ont été utilisées :

- Tube 1 : Témoin négatif = LB seul
- Tube 2 : Témoin positif = LB + Souche U29
- Tube 3 : LB + Souche U29 + Antibiotique
- Tube 4 : LB+ Extrait de *Boswellia dalzielii*
- Tube 5 : LB+ Extrait de Boswellia dalzielii + Antibiotique

10 à 30 ug d'extraits de *Boswellia dalzielii*

- Tube 6 : LB+ Extrait de *Boswellia dalzielii*
- Tube 7 : LB+ Extrait de *Boswellia dalzielii* + Antibiotique

30 à 60 ug d'extraits de *Boswellia dalzielii*

Les Densités optiques (DO) initiales de tous les tubes ont été lues à 630 nm en triplicata à partir du spectrophotomètre, et les tubes ont été mis en incubation à 37°C pendant 18 à 24h. Les densités optiques finales ont également été lues de nouveau à 630 nm en triplicata.

Cinétique Enzymatique

Extraction des β-lactamases

Chez les bactéries à gram-négatif, les β-lactamases sont normalement sécrétées et maintenues dans le périplasme. En pratique, les extraits bruts effectués à des fins analytiques (mise en évidence et mesure de l'activité β-lactamases) ont porté sur un volume compris entre 2 et 10 mL de suspension bactériennes. Le culot bactérien obtenu après centrifugation compris entre 1000 et 5000 tours par minutes pendant 30minutes à 4°C à la centrifugeuse a été mis en suspension par 300µl de tampon phosphate compris en 50 mM et 100 mM pH 7. Les contenus de l'espace périplasmique ont été libérés par la méthode physique des cycles de congélation /décongélation (Bidwell et Reeves, 1980). Le principe de la méthode consiste à préparer un bain froid en refroidissant de l'acétone par la neige carbonique. On obtient un milieu liquide qui se trouve à une température allant de -65°C à -75°C. Les cellules sont immergées pendant 8mn dans ce milieu, ce qui entraîne une congélation instantanée. Ensuite elles sont transférées dans un Bain-marie à 37°C pour décongélation également instantanée. Ces changements brusques d'état (état congelé – état décongelé et inversement) provoquent une pulvérisation des parois bactériennes avec libération des Bêta-lactamases qui sont localisées dans le compartiment périplasmique des bactéries. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 8000 tours par minute pendant 20mn. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés et les surnageants récupérés et testés pour l'activité β-lactamase. Le surnageant est conservé à -20° C.

Hydrolyse de la Nitrocéfine et des β-lactamines par les extraits bruts des β-lactamases

Les différents extraits bactériens obtenus ont été testés en vue de doser leur activité βlactamase avec la Nitrocéfine.

Cette β-lactamine chromogénique est un substrat passe-partout de la quasi-totalité des β-lactamases. Un milieu réactionnel constitué de tampon phosphate 50mM pH7, d'enzyme (5 à 10µl) et de Nitrocéfine en concentration finale de 100µM est réalisé dans une cuvette en quartz.

Les extraits présentant une activité β-lactamase ont été testés avec différents β-lactamines dans le but de déterminer leur profil hydrolytique. À cet effet, une solution d'antibiotique à une concentration de 2 mM a été préparée dans des tubes Eppendorf. Cette solution est utilisée comme substrat dans un milieu réactionnel où la

concentration finale d'antibiotique était de 25µM. Les activités enzymatiques ont été suivies sur un spectrophotomètre BioTek EL808. Les courbes d'hydrolyse des noyaux β-lactames par les différents extraits ont été enregistrées aux longueurs d'ondes appropriées. Toutes ces expériences ont été effectuées à 30°C dans du tampon phosphate 50mM pH 7.

La vitesse initiale (Vo) d'hydrolyse de chaque composé (exprimée en unités d'absorbance par seconde) a été évaluée selon la relation $Vo = \Delta A\lambda / \Delta t$ dans laquelle $\Delta A\lambda / \Delta t$ représente la pente à l'origine de la courbe de variation d'absorbance à la longueur d'onde λ en fonction du temps. La Vo obtenue et exprimée en unités d'absorbances/s est convertible en µM de substrats transformés ou de produits libérés par la relation $Vo = \Delta A\lambda / \Delta t \times 1 / \Delta\varepsilon\lambda$ dans laquelle $\Delta\varepsilon\lambda$ est la différence entre l'extinction molaire du produit et du substrat à la longueur d'onde λ (Zeba *et al.*, 2004).

Activité inhibitrice des extraits des plantes A sur les β-lactamases

L'activité des ß-lactamases a été déterminée en présence et en absence des extraits des plantes A et B. Pour cela, afin de déterminer le profil hydrolytique des β-lactamases, un volume réactionnel finale de 500 µl a été préparé, composé de Tampon phosphate (50 µM pH 7), d'Enzyme (5-20ul) et d'antibiotique. Les DO ont été lues immédiatement aux longueurs d'onde appropriées toutes les 10 secondes pendant 5 mn.

Pour la détermination de l'inhibition des β-lactamases par l'extrait de *Boswellia dalzielii*, un volume réactionnel finale de 500 µl a été préparé, composé de Tampon phosphate (50 µM pH 7), d'Enzyme (5-20ul) et de 5-20 µl d'extrait de plante (Feuille et Ecorce). Le mélange a été incubé à 37°C pendant 30 mn. L'antibiotique qui est le substrat a été ajouté ensuite, puis les DO ont été lues aux longueurs d'onde appropriées toutes les 10 secondes pendant 5 mn.

Le taux d'inhibition a été déterminé suivant la formule :

$$\textbf{Taux d'inhibition} = \frac{V_{0\ \text{sans inhibiteur}} - V_{0\ \text{avec inhibiteur}}}{V_{0\ \text{sans inhibiteur}}} \times 100$$

$V_{0\ sans\ inhibiteur}$: V_0 (Tampon phosphate + enzyme + CRO)

$V_{0\ avec\ inhibiteur}$: V_0 (Tampon phosphate + enzyme +Extrait de *Boswellia dalzielii* + CRO)

Résultats

Profil de résistances des entérobactéries

Ces souches ont présenté une résistance à tous les antibiotiques testés (**Figure 1**).

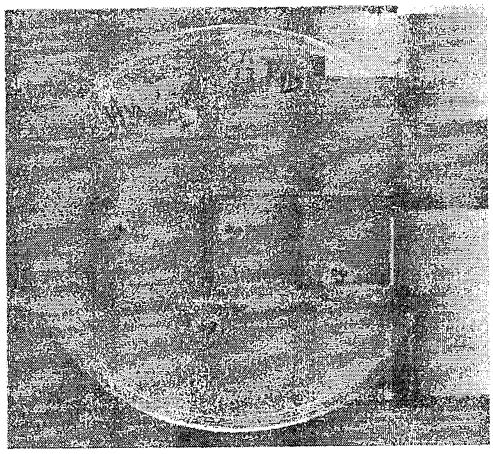


Figure 1 : Profil de résistance d'une des souches étudiées

Gènes de Résistances

Des gènes de résistances de résistance par production d'enzyme ont été détectés dans les entérobactéries étudiées (PER, GES, SFO, CTX-M, SHV, VIM et IMP).

Activité de *Boswellia dalzielii* sur une souche d'entérobactérie productrice de Bêta-lactamases

La souche d'entérobactérie résistante à des concentrations de 300µg/ml d'antibiotique a été utilisé pour les tests. Les tests dans les tubes à essai en présence du témoin négat*if,* et des tubes positifs ont montré que l'extrait de *Boswellia dalzielii* inhibe l'effet des bêta-lactamases sur les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines (Figure 2).

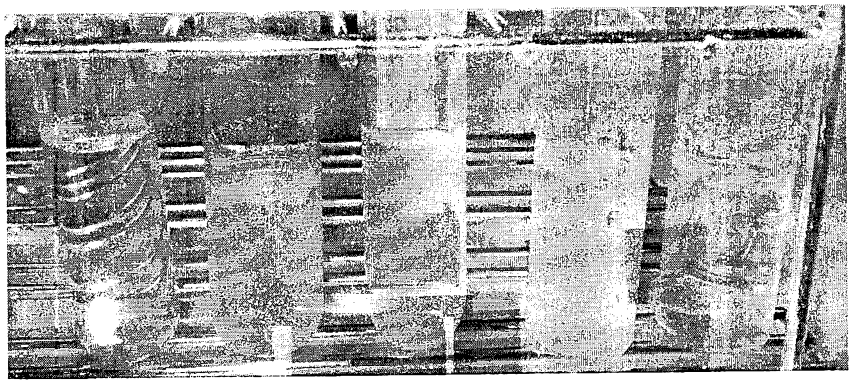


Figure 2 : Test d'inhibition d'une entérobactérie par l'extrait de *Boswellia dalzielii*

Légende : (a) = Témoin négatif, LB seul ; **(b)** =LB+U29, **(c)** = LB+U29+CTR, **(d)** = LB + extraits de *Boswellia dalzielii* (25µg/ml, **(e)** = LB + CRO + extraits de *Boswellia dalzielii* (25 µg/ml)

Les densités optiques avant et après 18 à 24h d'incubation à 37°C ont été lus au spectrophotomètre. Les résultats après incubation ont été consignés dans la Figure 3.

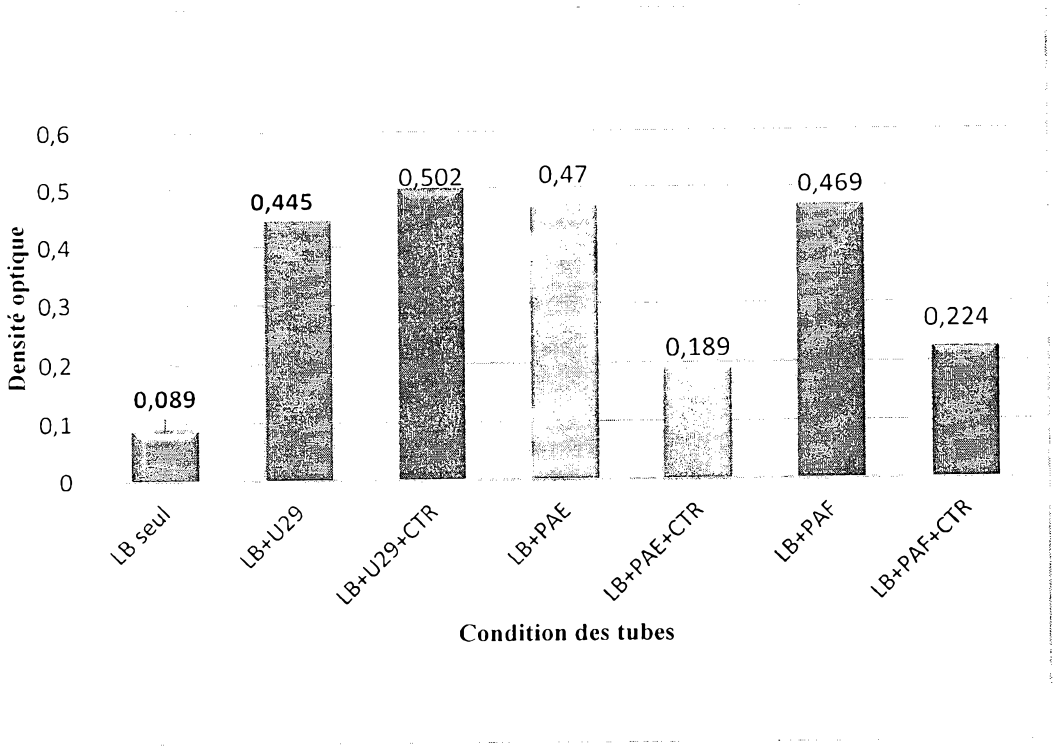


Figure 3 : Densité optiques obtenues lors des différentes conditions d'étude pour une concentration d'extraits de *Boswellia dalzielii* à 25 µg/ml

Légende : LB Seul= Témoin négatif, LB+U29= souche seul, LB+U29+CTR= souche+ entérobactérie, LB+(PAE) ou (PAF)= Extraits de *Boswellia dalzielii* + entérobactéries, LB+PAE ou (PAF)+CTR= Extraits de *Boswellia dalzielii* + entérobactéries+ antibiotique,

Le profil hydrolytique des antibiotiques de la famille des Bêtalactamines par les Bêta-lactamases

Les enzymes des souches d'entérobactéries ont été extraites et analysées au spectrophotomètre. Les substrats utilisés sont : la Nitrocéfine qui est un substrat test de bêta-lactamases et des antibiotiques.

Les courbes d'hydrolyse de la Nitrocéfine pour quelques extraits enzymatiques sont représentées par les **Figures 4, 5 et 6**:

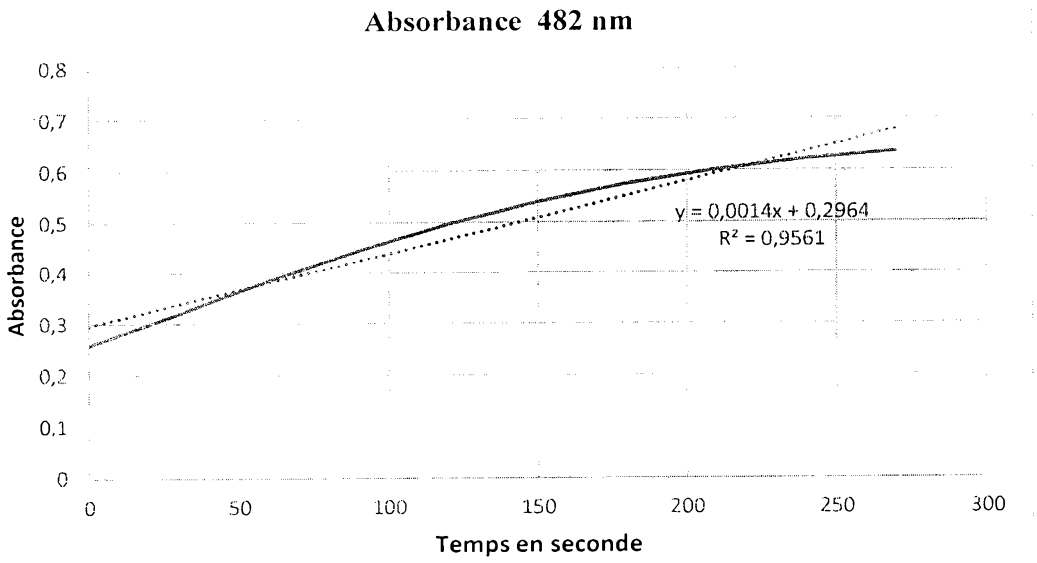


Figure 4 : Courbe d'hydrolyse de la Nitrocéfine (CPR) par l'extrait enzymatique de *Klebsiella pneumoniae*

La Nitrocéfine est un substrat test des bêta-lactamases. L'activité enzymatique a été mesurée en fonction de l'apparition du produit dans le milieu réactionnel d'où la croissance de la courbe.

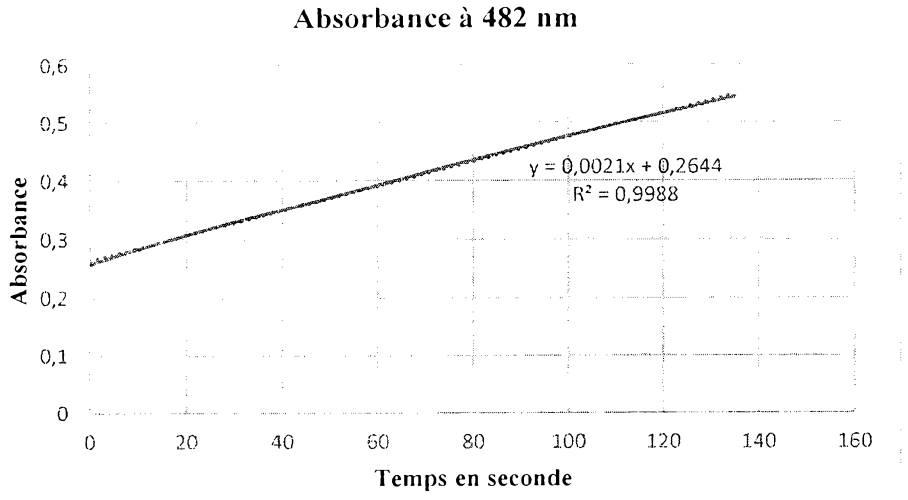


Figure 5 : Courbe d'hydrolyse de la Nitrocéfine (CPR) par l'extrait enzymatique d'*Escherichia coli*

L'activité enzymatique a également été mesurée en fonction de l'apparition du produit dans le milieu réactionnel d'où le fait que la courbe soit est également croissante.

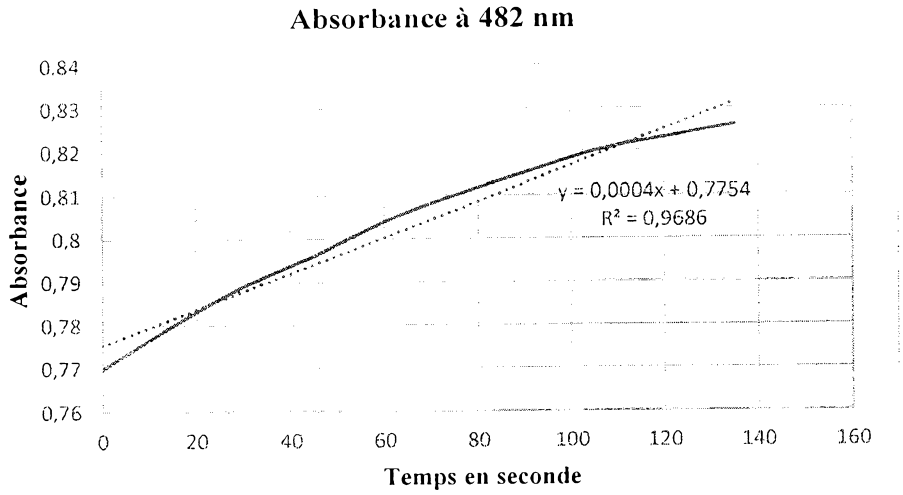


Figure 6 : Courbe d'hydrolyse de la Nitrocéfine (CPR) par l'extrait enzymatique de *Stenotrophomonas maltophilia*

L'activité enzymatique a été mesurée en fonction de l'apparition du produit dans le milieu réactionnel.

Une fois l'activité des Bêta-lactamases confirmées avec le substrat test (Nitrocéfine), le profil hydrolytique des antibiotiques a été étudié. La courbe d'hydrolyse d'un antibiotique est représentée dans la **Figure 7** :

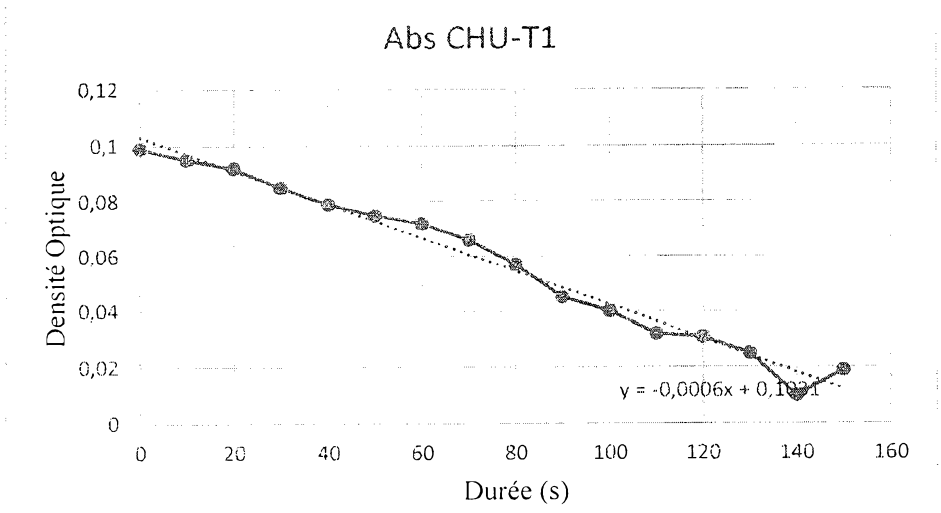


Figure 7 : La courbe d'hydrolyse de la Ceftriaxone (CRO) par l'extrait enzymatique de *Klebsiella pneumoniae* en absence d'extrait des plantes médicinales

L'activité enzymatique a été mesurée en fonction de la disparition du substrat (antibiotique) dans le milieu réactionnel d'où la décroissance de la courbe.

La Vitesse initiale (V_0) de l'hydrolyse enzymatique sans extrait des plantes médicinales A est égale à 0.0006 UA/s (unité d'absorbance par seconde).

Activité inhibitrice des extraits de *Boswellia dalzielii* sur les β-lactamases

Les extraits de *Boswellia dalzielii* ont montré une bonne activité inhibitrice sur les β-lactamases comme l'indiquent la **Figure 8**.

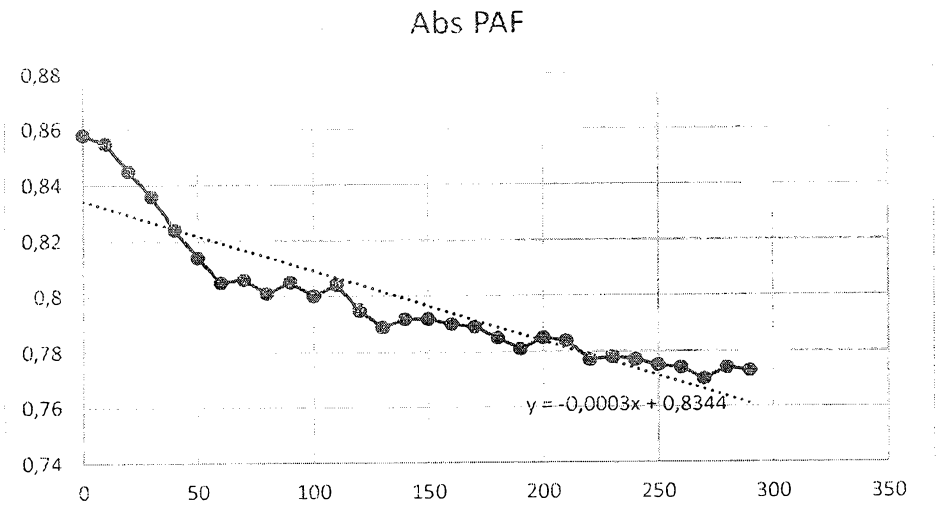


Figure 8 : La courbe d'hydrolyse de la Ceftriaxone par l'extrait enzymatique de *Klebsiella pneumoniae* en présence de l'extrait des feuilles de *Boswellia dalzielii*.

L'activité enzymatique a été mesurée en fonction de la disparition du substrat (antibiotique) dans le milieu réactionnel d'où la décroissance de la courbe.

La vitesse initiale V_0 est de 0,0003 UA/s (unité d'absorbance par seconde).

Le taux d'inhibition des extraits des feuilles a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'inhibition} = \frac{0,0006 - 0,0003}{0,0006} \times 100$$

Le taux d'inhibition pour les extraits provenant des feuilles est de 50%.

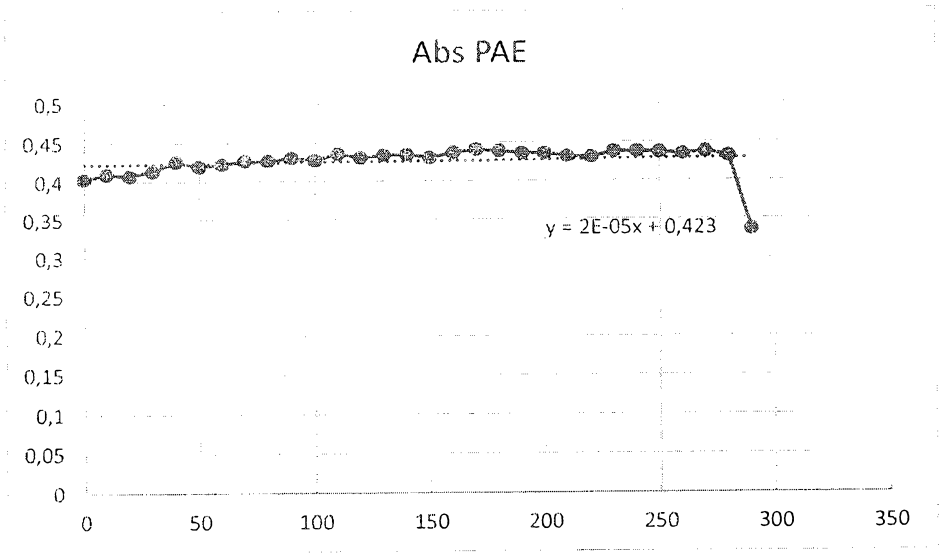


Figure 9 : La courbe d'hydrolyse de la Ceftriaxone par l'extrait enzymatique de *Klebsiella pneumoniae* en présence de l'extrait des écorces de *Boswellia dalzielii*

L'activité enzymatique a été mesurée en fonction de la disparition du substrat (antibiotique) dans le milieu réactionnel d'où la décroissance de la courbe. La vitesse initiale V_0 est de 0,00002 uA/s.

Le taux d'inhibition des extraits des écorces a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'inhibition} = \frac{0{,}0006 - 0{,}00002}{0{,}0006} \times 100$$

Le taux d'inhibition pour les extraits provenant des Racines est de 96,66%.

Toxicité aiguë in vivo

Nous avons utilisé pour la réalisation des tests de toxicité douze (12) Souris de souche NMRI, âgées de 8 à 12 semaines dont 6 males et 6 femelles ayant un poids moyen de 45,65 g et 31,08 g respectivement. Ces animaux ont été divisés en deux groupes de 6 en ce qui concerne chaque sexe : le groupe test et le groupe témoin. Tous les animaux ont été pesés avant d'être répartis dans les différents groupes puis mis à jeun pendant 24 heures au bout desquelles ils ont reçu pour les groupes tests une solution d'extrait concentrée à 2000 mg/kg à l'aide d'une sonde gastrique et les groupes témoin

n'ont reçus que de l'eau distillée. Les animaux ont été à nouveau privés de nourriture pendant quatre heures durant lesquelles étaient observés leurs comportements, et pendant les 14 jours de l'expérimentation étaient suivis et notés leur consommation hydrique et alimentaire, leur variation de poids, leur comportement.

A la fin des 14 jours, les animaux ont été pesés juste avant leur sacrifice qui s'est fait après anesthésie à un excès de Kétamine+Lidocaïne.

Aucun décès d'animal n'a été enregistré pendant l'expérimentation, la LD_{50} de cette plante est donc supérieure à 2000 mg/kg.

La présente invention vise ainsi à proposer un inhibiteur des enzymes de résistances à partir des extraits de *A* capables de restaurer l'activité d'une classe d'antibiotiques usuels de la famille des β-lactamines (céphalosporines) vis-à-vis des souches bactériennes présentant des résistances par production d'enzymes (β-lactamases).

Le procédé d'obtention de l'inhibiteur des enzymes de résistance suit les étapes suivantes :

- 1ère étape : Récolte des organes de la *A*
- 2ème étape : Obtention des extraits de la *A*
- 3ème étape : Formulation de la substance de la *A*

Récolte des organes de la *A*

Les différents organes de la *A* sont récoltés en saison pluvieuse avant le lever du soleil. Il s'agit principalement des feuilles et des écorces. Ces organes sont ensuite séchés à une température ambiante à l'ombre.

Obtention des extraits de la *A*

Les feuilles et écorces séchées sont ensuite pulvérisées. Quinze à soixante-quinze grammes de poudre ont été extraites avec du méthanol (150 à 350 ml) par macération pendant 48 heures à 37° C sous agitation mécanique à 200 tours/minute. Les filtrats sont concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide, récupérés dans des boîtes de pétri et séchés à l'étuve à 37° C. 10 à 70 mg de l'extrait ont été pesés et ajoutés à un volume de DMSO 99,9% compris entre 3 et 10 ml. Le mélange a été homogénéisé pour dissoudre l'extrait et obtenir une concentration comprise entre 5 et 20 mg/ml.

Formulation de la substance de la *A*

Dans sa formulation, les formes galéniques suivants pour l'utilisation chez l'homme sont envisagées :

1. Forme Orale

Le meilleur compromis pour une bonne activité antibiotique des combinaisons d'un antibiotique de la famille des céphalosporines et des extraits de la *A* est de 500 µg / 25 µg, *i.e.*, 500 µg d'antibiotique et 25 µg pour les extraits de la *A*

Ainsi, les combinaisons possibles avec un antibiotique pour les différentes doses sont :

Poudre séchée pour suspension : administré chez l'enfant

1. 125 mg Antibiotique + 6,25 mg de l'extrait de la *A*
2. 250 mg Antibiotique + 12,50 mg de l'extrait de la *A*

Capsules : administré chez l'adulte

1. 250 mg Antibiotique + 12,50 mg de l'extrait de la *A*
2. 500 mg Antibiotique + 25 mg de l'extrait de la *A*

Pour la poudre sèche pour suspension, les excipients suivants peuvent être utilisé acide citrique, sucre, benzoate de sodium, gomme de xanthane, jaune soleil, vanille et aerosil, talc, glycolate d'amidon sodique, aerosil, Stéarate de magnésium, amidon de maïs sec.

2. Forme Injectable

Le meilleur compromis pour une bonne activité antibiotique des combinaisons d'un antibiotique de la famille des céphalosporines et des extraits de la *A* est de 500 µg / 25 µg, *i.e.*, 500 µg d'antibiotique et 25 µg pour les extraits de la *A*.

Ainsi, les combinaisons possibles avec un antibiotique pour les différentes doses sont :

1. 250 mg antibiotique + 12,5 mg de l'extrait de la *A* administré chez l'adulte et l'enfant
2. 500 mg antibiotique + 25 mg de l'extrait de la *A* administré chez l'adulte et l'enfant
3. 1000 mg antibiotique + 50 mg de l'extrait de la *A* administré chez l'adulte

La présente invention est destinée particulièrement à la lutte contre les résistances bactériennes par production d'enzymes aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

Elle n'est nullement limitée aux formulations et aux dosages décrits plus haut. L'homme du métier saura y apporter toute variante conforme à son esprit.

REVENDICATIONS

1. Extrait de plante associé aux antibiotiques caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir de différents organes de *Boswellia dalzielii* pour augmenter l'efficacité des antibiotiques.
2. Extrait de plante associé aux antibiotiques selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il inhibe les enzymes de résistance bactérienne à un taux d'au moins 96%.
3. Extrait de plante associé aux antibiotiques selon les revendications 1 et 2, caractérisée en ce qu'il est utilisé en association avec un antibiotique de la famille des β-lactamines.
4. Extrait de plante associé aux antibiotiques selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'antibiotique de la famille des β-lactamines est la céphalosporine de troisième génération.
5. Extrait de plante associé aux antibiotiques selon les revendications précédentes, caractérisée en ce qu'il est actif à des concentrations d'antibiotique de 500 ± 200 µg/ml et d'extrait de *Boswellia dalzielii* à des concentrations de 25 ± 20 µg/ml.
6. Extrait de plante associé aux antibiotiques selon les revendications précédentes, caractérisée en ce que l'association de l'extrait de *Boswellia dalzielii* et de l'antibiotique présentent trois formes galéniques pour l'utilisation chez l'homme et chez l'animal à savoir la forme orale, la forme injectable et la forme cutanée.

Abrégé de description

L'invention concerne des extraits à base de *Boswellia dalzielii* utilisée en association avec les antibiotiques de la famille des β-lactamines. Elle est utilisée comme inhibiteur naturel dans la lutte contre les résistances bactériennes par production d'enzymes (β-lactamases à spectre élargi). L'obtention de l'inhibiteur passe par les étapes de récolte, d'obtention des extraits et de formulation de la substance Elle peut avoir trois formes galéniques, à savoir orale, injectable et cutanée.