



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 34628 B1**
- (51) Cl. internationale : **A61K 31/00; A61K 31/03; A61P 33/00; A61P 33/02**
- (43) Date de publication : **02.11.2013**
-
- (21) N° Dépôt : **34758**
- (22) Date de Dépôt : **06.04.2012**
- (71) Demandeur(s) : **AINANE TARIK, HAY ERRAHMA AVENUE ABDELKADER SAHRAOUI N°133 20660 CASABLANCA (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **LEMrani Meriem ; ABOURRICHE Abdelmjid ; KABBAJ Mohamed ; BENNAMARA Ahmed ; TALBI Mohamed ; CHARROUF M'hammed ; EL KOUALI M'hammed ; AINANE Tarik**
-
- (54) Titre : **UTILISATION DES PRODUITS EXTRAITS D'UNE ALGUE MARINE BIFURCARIA BIFURCATA DANS LE TRAITEMENT DE LEISHMANIOSE**
- (57) Abrégé : LA PRÉSENTE INVENTION DÉCRITE L'UTILISATION DES PRODUITS EXTRAITS DE L'ALGUE MARINE BRUNE BIFURCARIA BIFURCATA DANS LE TRAITEMENT DE LEISHMANIOSE. AU COURS DE CETTE ÉTUDE, LES PRODUITS H, E ET C SONT OBTENUS À PARTIR DES EXTRACTIONS SUCCESSIVEMENT AU SOXHLET EN UTILISANT DES SOLVANTS DE POLARITÉ CROISSANTE (HEXANE, ÉTHER ET CHLOROFORME), ET ILS REPRÉSENTENT ENVIRON DE 1% AU 8% DU POIDS DE L'ALGUE BRUTE. D'AUTRE PART, L'ACTIVITÉ ANTILESHMANIEN A ÉTÉ RÉALISÉE IN VITRO PAR LA MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE MTT (3-4-5- DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM BROMIDE) SUR DES PARASITES DE TYPE LEISHMANIA INFANTUM. L'ENSEMBLE DES RÉSULTATS OBTENUS MONTRENT QUE LES PRODUITS EXTRAITS DE L'ALGUE BIFURCARIA BIFURCATA PRÉSENT UNE ACTIVITÉ ANTILEISHAMNIEN REMARQUABLE, D'OÙ LES VALEURS DES CONCENTRATIONS D'INHIBITION DE 50% DE CI50 DES PRODUITS H, E ET C SONT RESPECTIVEMENT DE L'ORDRE : 46,83 UG/ML, 51,64 UG/ML ET 63,83 UG/ML. CES RÉSULTATS POUVANT FAIRE L'OBJET DE L'APPLICATION DES PRODUITS OBTENUS DE L'ALGUE BIFURCARIA BIFURCATA DANS LE TRAITEMENT DES LEISHMANOISES.

Abrégé du contenu technique de l'invention

La présente invention décrit l'utilisation des produits extraits de l'algue marine brune *Bifurcaria bifurcata* dans le traitement de Leishmaniose.

Au cours de cette étude, les produits H, E et C sont obtenus à partir des extractions successivement au soxhlet en utilisant des solvants de polarité croissante (hexane, éther et chloroforme), et ils représentent environ de 1 % au 8 % du poids de l'algue brute. D'autre part, l'activité antileishmanien a été réalisée in Vitro par la méthode colorimétrique MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) sur des parasites de type *Leishmania infantum*.

L'ensemble des résultats obtenus montrent que les produits extraits de l'algue *Bifurcaria bifurcata* présentent une activité antileishmanien remarquable, d'où les valeurs des concentrations d'inhibition de 50 % de CI_{50} des produits H, E et C sont respectivement de l'ordre : 46,83 $\mu\text{g/mL}$, 51,64 $\mu\text{g/mL}$ et 63,83 $\mu\text{g/mL}$. Ces résultats pouvant faire l'objet de l'application des produits obtenus de l'algue *Bifurcaria bifurcata* dans le traitement des Leishmanoses.

Description de l'invention

Utilisation des produits extraits d'une algue marine *Bifurcaria bifurcata* dans le traitement de Leishmaniose

La leishmaniose est une maladie très fréquente dans le monde. Elle affecte de très nombreuses espèces de mammifères, dont l'homme. Dans certaines formes l'évolution spontanée sans traitement est mortelle en quelques mois.

Au Maroc, comme dans la plupart des pays circumméditerranéens, les leishmanioses constituent un important problème de santé publique. Qu'elles soient zoonotiques ou anthroponotiques, cutanées ou viscérales, ces affections y sont largement représentées, depuis les montagnes du Rif jusqu'aux palmeraies perarides des piémonts de l'Anti-Atlas. ^(1,2)

Pour le traitement de Leishmanioses, ils existent des dizaines de produits, on cite l'Amphotéricine B, la pentamidine, la Miltéfosine, La Paromomycine, la Sitamaquine, L'imiquimod et le Fluconazole ..., le coût de ces traitements, très élevé pour la majorité des populations contaminées, rend la progression de la maladie plus facile. ^(3,4)

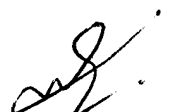
Les extraits et les molécules biologiquement actives d'origine naturelles occupent aujourd'hui une place prépondérante dans notre société puisqu'elles sont à la base de nombreux principes actifs utilisés en pharmacie, d'où l'objectif de ce travail est d'exploiter les extraits de l'algue marine *Bifurcaria bifurcata* dans le traitement de Leishmanioses par le test MTT in Vitro.

1. Procédé de préparation des produits H, E et C :

Après la récolte de l'algue marine *Bifurcaria bifurcata* dans la région du sud de Casablanca (Maroc) dans la période de basse marée, elle est lavée par l'eau, et elle est séchée pendant une journée à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis elle est séchée à l'étuve à 60°C pendant trois jours.

Trois produits extraits H, E et C sont obtenus à partir des extractions successivement au Soxhlet (**figure 1**) avec des solvants de polarité croissante : l'hexane, l'éther, le chloroforme.

Une fois les produits ont été obtenus, on a déterminé leurs couleurs et leurs rendements par rapport à la quantité initiale d'algue marine sèche. Les données concernant les produits obtenus sont portées sur le **tableau 1** :



Produit	Couleur	Rendement (%)
H	Verte foncée	4,04
E	Verte – jaune	0,92
C	Verte	1,43

Tableau 1 : La couleur et le Rendement de différents extraits de *Bifurcaria bifurcata*.

2. Utilisation des produits H, E et C dans le traitement de Leishmaniose :

2.1. Principe de la méthode de test antileishmanien MTT :

La méthode MTT utilisée est celle décrite par A. Dutta (2005).⁽⁵⁾ C'est une technique colorimétrique, qui permet de déterminer l'activité antileishmanienne des formes promastigote du genre *Leishmania*. Le principe du test est basé sur la transformation d'un sel de tétrazolium MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide) en formazan par réduction enzymatique (**figure 2**). En bref, le cycle tétrazolique qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives en formazan. Le formazan est un produit coloré (violet foncé), insoluble dans l'eau et l'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique.

2.2. Protocole expérimental :

Les évaluations antileishmaniens ont été réalisées sur des cultures des promastigotes de *Leishmania infantum*. Les promastigotes sont maintenus à 25°C par repiquage tous les cinq jours en utilisant le milieu RPMI 1640 dépourvu de phénol rouge, tamponné avec 25 mM NaHCO₃ (pH = 7,2) et supplémenté avec 20 % du sérum bovine foetal (SVF). Les parasites sont incubés dans des flacons de culture avec une concentration initiale de 5 x 10⁵ parasites par mL.⁽⁶⁾

Les parasites sont dénombrés sur une cellule de Thoma, puis partagés dans une plaque Elisa de 96 puits à une concentration de 2x10⁵ parasites/puits dans 90 µL de milieu RPMI. Les produits à tester sont dissouts dans le DMSO 1 % (à concentrations finales de 20, 30, 40 et 50 µg.mL⁻¹) ainsi le témoin solvant (100 µL de la culture parasitaire + 10 µL DMSO) sont alors additionnés en triplicat dans les puits pour un volume additionnel de 10 µL. Après 72 heures d'incubation à 25°C, on ajoute un volume de 10 µL de MTT (5 mg.mL⁻¹) et les plaques sont

remises dans les incubateurs. Après 1 heure d'incubation à température ambiante et 3 heures à 37°C la coloration violette est développée, les plaques sont centrifugées à 2000 rpm pendant 5 min et on ajoute un volume de 200 µL de DMSO. L'absorbance de chaque puits est mesurée à 492 nm sur un Spectrophotomètre ELISA.

La détermination de la valeur de concentration d'inhibition de 50 % **CI₅₀** est déterminée par interpolation linéaire sur des courbes donnant le pourcentage de viabilité en fonction de logarithme de la concentration testée.

On note que le pourcentage de viabilité est donné par la relation :

$$\% \text{ Viabilité} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{Contrôle}} - \text{Absorbance}_{\text{Echantillon}}}{\text{Absorbance}_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

2.3. Résultats et discussions :

Les produits H, E et C ont été testés à des concentrations 20, 30, 40 et 50 µg.mL⁻¹. Les valeurs des pourcentages de viabilité des Leishmania en fonction de la concentration sont données dans le **Tableau 2**.

Produit	Concentration (µg.mL ⁻¹)	Absorbance échantillon	Absorbance contrôle	Viabilité (%)
H	20	0,536	0,579	7,309
	30	0,436	0,579	24,604
	40	0,420	0,579	27,453
	50	0,206	0,579	64,431
E	20	0,534	0,579	7,654
	30	0,493	0,579	14,762
	40	0,430	0,579	25,669
	50	0,232	0,579	59,942
C	20	0,559	0,579	3,338
	30	0,540	0,579	6,676
	40	0,431	0,579	25,553
	50	0,316	0,579	45,381

Tableau 2 : Résultats de l'activité antileishmanien des produits H, E et C.

A partir du tableau 2, on déduit que le pourcentage de viabilité augmente avec la concentration. Ceci est bien illustré par les courbes de viabilité en fonction de concentration des produits H, E et C (**figure 3**). Ainsi, Les valeurs des concentrations d'inhibition de 50 % CI_{50} obtenus à partir des expressions linéaires de viabilité en fonction de logarithme de la concentration testée sont représentées dans le **tableau 3**.

Produit	CI_{50} (µg/mL)
H	46,83
E	51,64
C	63,83

Tableau 3 : Valeurs de CI_{50} des produits H, E et C.

L'ensemble des résultats obtenus montrent que les produits H, E et C présentent des valeurs importants d'où une activité antileishmanien remarquable, ce qui prouve l'utilisation des produits extraits de *Bifurcaria bifurcata* dans le traitement de Leishmanioses.

Références bibliographiques :

- (1) R. Nejjar, M. Lemrani, A. Malki, S. Ibrahimy, H. Amarouch, A. Benslimane ; *Journal Parasite*, 5, 325-330, 1998.
- (2) M. Lemrani, R. Nejjar, F. Pratlong ; *Annals of tropical medicine and parasitology*, 96, 637-638, 2002.
- (3) C.P. Thakur¹, A.K. Pandey, G.P. Sinha¹, S. Roy¹, K. Behbehani, P. Olliaro ; *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90, 319-322, 1996.
- (4) S.L. Croft, M.P. Barrett, J.A. Urbina ; *Trends in Parasitology*, 21, 508-512, 2005.
- (5) A. Dutta, S. Bandyopadhyay, C. Mandal, M. Chatterjee ; *Parasitology International*, 54, 119-122, 2005.
- (6) P. Agnew, P.Holzmuller, Y. Michalakis, D. Sereno, J.L. Lemesre, F.Renaud ; *American Society For Microbiology*, 45, 1928-1929, 2001.

Revendications

1. Produits extraits d'une algue marine, caractérisés en ce que le procédé d'extraction suit les étapes suivantes :
 - Récolte de l'algue marine.
 - Lavage à l'eau.
 - Séchage à température ambiante et à l'abri de lumière pendant une journée.
 - Séchage à l'étuve pendant 3 jours à 60°C.
 - Extraction par soxhlet en utilisant des solvants de polarité croissante (hexane, éther et chloroforme).
 - Evaporation des solvants, et l'obtention des produits H, E et C.
2. Produits selon les revendications 1, caractérisés en ce qu'ils sont subit de l'activité antileishmanien in Vitro selon la méthode colorimétrique MTT.
3. Utilisation des produits H, E et C selon les revendications précédentes, pour le traitement des Leishmanioses.
4. Produits extraits H, E et C, caractérisés selon les revendications 1, 2 et 3, en ce qu'ils sont naturelles.
5. Produits extraits H, E et C selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus d'une algue marine : *Bifurcaria bifurcata*.

Planches de dessins

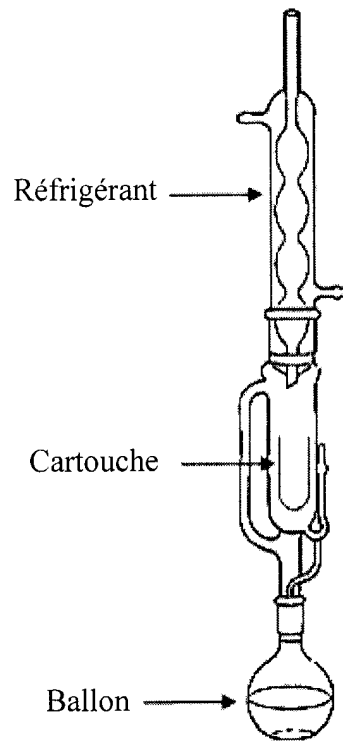


Figure 1 : Système d'extraction au Soxhlet.

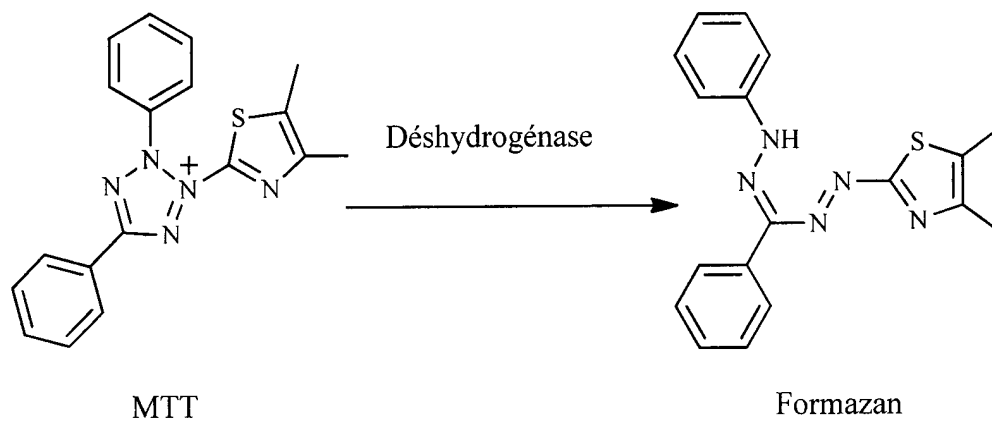


Figure 2 : Déshydrogénase de MTT en Formazan.

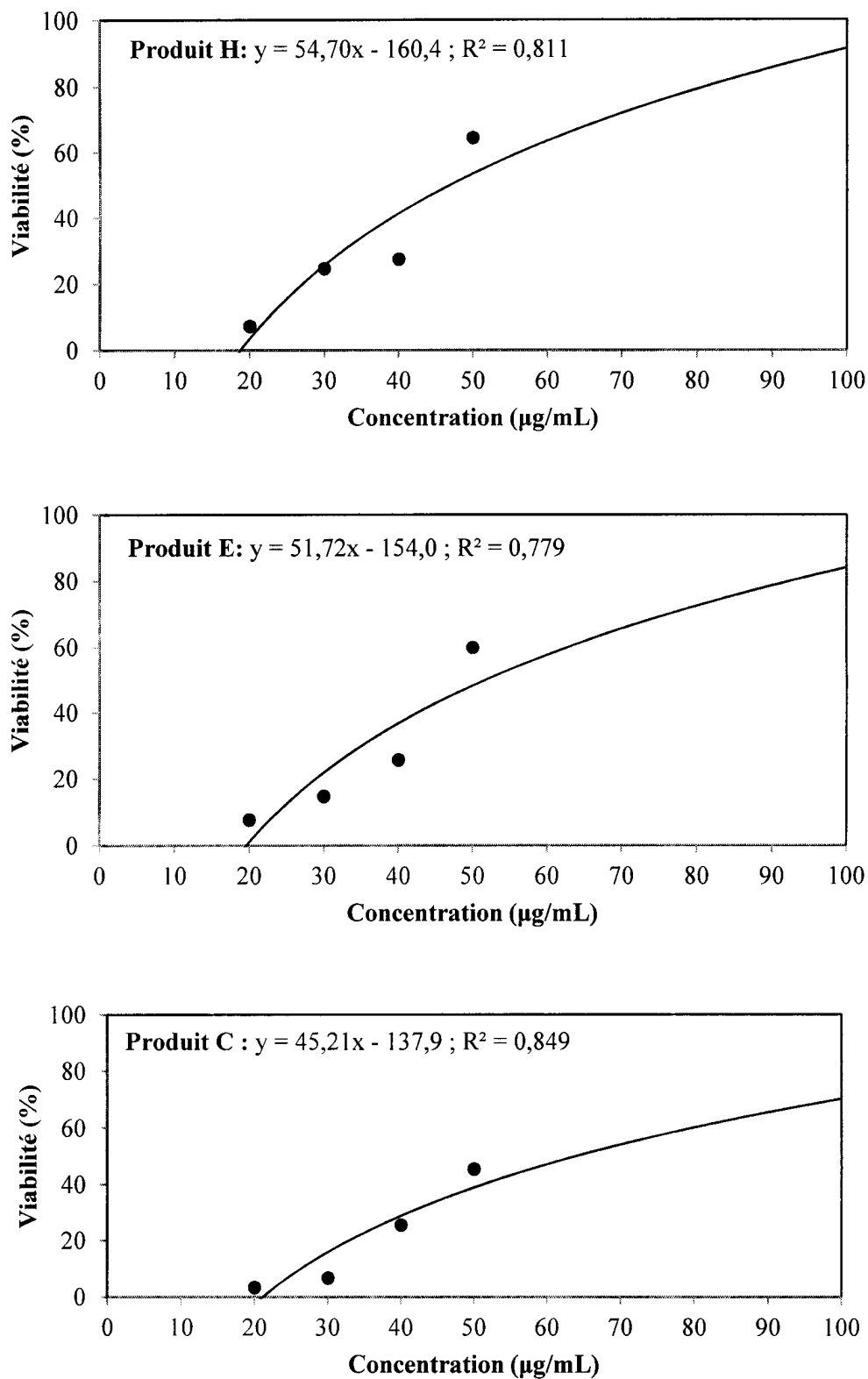


Figure 3 : Courbes de viabilité en fonction de concentration, des produits H, E et C.