



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 36998 A1**
- (51) Cl. internationale : **A61K 36/00; A61P 29/02; A61P 25/04; A61P 1/06**
- (43) Date de publication : **29.01.2016**
-
- (21) N° Dépôt : **36998**
- (22) Date de Dépôt : **08.05.2014**
- (71) Demandeur(s) : **UNIVERSITE MOHAMMED V SOUISSI, ANGLE AVENUE ALLAL EL FASSI ET MFADEL CHERKAOUI AL IRFANE 8007. N.U RABAT (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **Yahia CHERRAH ; Faouzi MY ABBAS ; DOUDACH LATIFA**
- (74) Mandataire : **ZAOUI FATIMA**
-
- (54) Titre : **COMPOSITION D'EXTRAIT AQUEUX DE NIGELLA SATIVA AYANT UNE ACTIVITE ANTISPASMODIQUE ET ANALGESIQUE**
- (57) Abrégé : Dans la présente invention, les activités analgésiques et antispasmodiques de l'extrait aqueux de nigella sativa (a des doses de 1 et 2 mg/ kg ip) ont été étudiés. L'activité analgésique a été évalué par le test de sensibilité (pour l'action central), induite par l'acide acétique et par le test du Writhing pour l'action périphérique) chez la souris_ L'activité antispasmodique a été évalué par le transducteur isométrique chez le lapin. L'extrait aqueux a la dose de 1 et 2 mg/kg testée, prolonge significativement (P < 0,05) le temps de latence de la réaction a la douleur induite thermiquement chez les souris en comparaison a la morphine (M) a la dose de 0,1 mg/ kg et de fagson significative (P < 0,001) il inhibe les torsions induites par l'acide acétique. Il a été démontré que l'extrait présente une activité analgésique significative par rapport a l'acide acétylsalicylique (AAS) a la dose de 150 mg/ kg. En outre, l'extrait aqueux provoque une relaxation dose-dépendante dans l'intestin du lapin avec une IC50 de l'ordre de 64,7 :t 1,2 pg / ml et d' un effet antispasmodique très significatif par rapport au trimébutine comme témoin positif (IC50 = 49,6 :t 1,1 pg/ ml). H a été conclu que l'ex1rait aqueux de NS présente une activité anti- nociceptive et antispasmodique

Abrégé

Dans la présente invention, les activités analgésiques et antispasmodiques de l'extrait aqueux de *nigella sativa* (à des doses de 1 et 2 mg / kg ip) ont été étudiés. L'activité analgésique a été évalué par le test de sensibilité (pour l'action central), induite par l'acide acétique et par le test du Writhing pour l'action périphérique) chez la souris. L'activité antispasmodique a été évalué par le transducteur isométrique chez le lapin. L'extrait aqueux à la dose de 1 et 2 mg / kg testée, prolonge significativement ($P < 0,05$) le temps de latence de la réaction à la douleur induite thermiquement chez les souris en comparaison à la morphine (M) à la dose de 0,1 mg / kg et de façon significative ($P < 0,001$) il inhibe les torsions induites par l'acide acétique. Il a été démontré que l'extrait présente une activité analgésique significative par rapport à l'acide acétylsalicylique (AAS) à la dose de 150 mg / kg. En outre, l'extrait aqueux provoque une relaxation dose-dépendante dans l'intestin du lapin avec une IC_{50} de l'ordre de $64,7 \pm 1,2$ pg / ml et d' un effet antispasmodique très significatif par rapport au trimébutine comme témoin positif ($IC_{50} = 49,6 \pm 1,1$ pg / ml). Il a été conclu que l'extrait aqueux de NS présente une activité anti- nociceptive et antispasmodique

Titre : Composition de l'extrait aqueux de *Nigella sativa* ayant une activité Antispasmodique et analgésique.

Description : *Nigella sativa* L. (NS), est une plante de la famille des Ranunculaceae, utilisée en médecine traditionnelle en Afrique du Nord pour le traitement de plusieurs maladies : de l'asthme, la bronchite, l'inflammation et le diabète. Dans la présente invention, les activités analgésiques et antispasmodiques de l'extrait aqueux de *nigella sativa* (à des doses de 1 et 2 mg / kg ip) ont été étudiés. L'activité analgésique a été évaluée par le test de sensibilité (pour l'action central), induite par l'acide acétique et par le test du Writhing pour l'action périphérique) chez la souris. L'activité antispasmodique a été évaluée par le transducteur isométrique chez le lapin. L'extrait aqueux à la dose de 1 et 2 mg / kg testée, prolonge significativement ($P < 0,05$) le temps de latence de la réaction à la douleur induite thermiquement chez les souris en comparaison à la morphine (M) à la dose de 0,1 mg / kg et de façon significative ($P < 0,001$) il inhibe les torsions induites par l'acide acétique. Il a été démontré que l'extrait présente une activité analgésique significative par rapport à l'acide acétylsalicylique (AAS) à la dose de 150 mg / kg. En outre, l'extrait aqueux provoque une relaxation dose-dépendante dans l'intestin du lapin avec une IC50 de l'ordre de $64,7 \pm 1,2$ pg / ml et d'un effet antispasmodique très significatif par rapport au trimébutine comme témoin positif (IC50 = $49,6 \pm 1,1$ pg / ml). Il a été conclu que l'extrait aqueux de NS présente une activité anti-nociceptive et antispasmodique

Les plantes médicinales ont été utilisées comme une thérapie alternative pour le traitement de la douleur. Les principes actifs analgésiques les plus utilisés comme l'acide salicylique et de la morphine ont été isolés des plantes, l'étude des espèces végétales utilisées traditionnellement pour calmer la douleur doit toujours être considérée comme une stratégie de recherche de nouveaux médicaments analgésiques et antispasmodiques. La colique a été définie comme des périodes d'irritabilité inexplicée ou d'agitation. La mise en évidence de cette pathologie reste limitée en dépit de nombreuses études et théories sur son origine et ses causes. La cause de colique n'est pas clair. Les troubles Gastro-intestinaux, psychosociaux et neurologiques sont supposées comme la cause des coliques. Ce remède est difficile à traiter et à étudier ou à mesurer. Le grand effet placebo, la nature transitoire des symptômes et l'étiologie indéterminée font sont responsables uniquement de la colique. De nombreuses études sont portées sur des médicaments prescrits pour le traitement des coliques. L'évaluation de l'effet placebo contrôlé et des essais multicentrique nous a montré que le traitement par d'autre produit induit des résultats similaires à ceux observés par l'effet placebo. Des revues systématiques des études utilisant des médicaments anti-cholinergiques dans le traitement des coliques montrent qu'ils sont plus efficaces que l'effet placebo.

Bromure de cimétropium, un antagoniste muscarinique à activité spasmolytique directe est un ammonium quaternaire et un dérivé semi-synthétique de la scopolamine. Selon l'Organisation mondiale de la Santé, 80% des populations dans les pays en voie de développement ont recours à la médecine traditionnelle à base de plantes. Actuellement, l'exploitation des plantes aromatiques et médicinales a un impact sur le secteur économique et social. Au Maroc l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales a connu un succès pour le traitement des coliques. La pharmacopée traditionnelle dispose d'un arsenal de remèdes à base de plantes médicinales, en raison de la diversité et de la flore, en effet plus de 42 000 espèces de plantes sont réparties en 150 familles et 940 genres, dans l'ensemble du pays sur une superficie de 715 000 km². *Nigella sativa* est une plante de la famille des Annonaceae. Cette espèce est

29 JAN 2016

connue pour son effet hypotenseur, hépatoprotecteur, immunomodulateurs et antidiabétique. La bibliographie a montré qu'il n'y a aucune études scientifiques menées sur les activités antinociceptives et antispasmodiques de l'extrait aqueux de NS. Le but de la présente invention était d'établir un inventaire de *Nigella sativa*, une plante traditionnellement utilisée pour le traitement de la colique et d'évaluer son activité analgésique et antispasmodique et de démontrer que l'approche expérimentale peut être utilisée pour expliquer les usages traditionnels

Materiels et méthodes

Nigella sativa a été récolté de la region Rabat-Salé-Zemour-Zaers la plante a été séchée à l'ombre, à l'abri de l'humidité et stockée soigneusement. Un spécimen (RAB10359) d'herbier est déposé à l'institut scientifique de Rabat-Maroc. Un extrait aqueux a été ainsi préparer, 250 g de graines de plantes réduites en poudre est macérée dans 500 ml d'eau distillée pour une durée de 48 h. L'extrait est ainsi filtré et ensuite lyophilisé (TELSTAR, France). Pour chaque étape, l'extrait aqueux lyophilisé a été soigneusement préparée dans les mêmes conditions (temps, température, la quantité de matière végétale et l'eau utilisée pour l'extraction et lyophilisation). L'extrait final était noir semi-solide, le pourcentage de la matière sèche est de 15% (p / p), l'extrait est maintenu à 4 ° C jusqu'à utilisation.

Etude de l'activité analgésique centrale

Animaux

Les animaux utilisés pour ce test sont des souris Swiss mâles, exempt d'organismes pathogènes spécifiques d'un poids compris entre 20 et 30 g. Elles sont mises à jeun 24 h avant le test. Chaque groupe compte 6 souris (n=6) et chaque animal est utilisé à l'état vigile et une seule fois par essai

Réactifs

- Sulfate de morphine dilué dans du NaCl 9 ‰ : Une dose a été utilisé 0,1 mg/kg et injectée par voie sous-cutanée
- Suspensions d'extrait aqueux de NS dans du NaCl 9‰ : 2 doses ont été expérimentées 1, et 2 mg/kg P.C.

Principe:

La queue de l'animal est soumise à une source de chaleur rayonnante. Lorsque l'animal ressent un inconfort, il réagit par un mouvement brusque de la queue ("Tail Flick") qui stoppe automatiquement la stimulation et le chronomètre mesurant le temps de latence de la réaction. Ce test est particulièrement adapté à l'étude des propriétés analgésiques de substances pharmacologiques. Il peut également être utilisé pour évaluer la sensibilité de base à la douleur ou pour la détermination des différences génétiques putatives entre animaux non drogués. La méthode décrite par d'Amour et Smith (1941) est utilisée. Les souris sont

reparties en lots de 6. Le dispositif expérimental utilisé pour produire la chaleur est un appareil composé d'une ampoule émettant une chaleur irradiante de 55 à 60 °C, d'un chronomètre qui est déclenché en même temps que la source de chaleur irradiante, et d'une cellule photoélectrique qui arrête automatiquement le chronomètre dès que l'animal retire sa queue.

Au début de chaque épreuve, la souris est immobilisée dans une cage en plexiglas, la queue de l'animal est positionnée à sa mi-longueur sur le trajet lumineux, et repose sur l'orifice photoélectrique situé sur ce même trajet. Le comptage de la latence de retrait de la queue et l'émission de la chaleur irradiante sont simultanément déclenchés. L'émission de la chaleur et le chronomètre sont automatiquement arrêtés dès que la queue subit une brusque déflexion. La distance lampe queue et l'intensité de l'irradiation sont ajustées en vue d'obtenir le retrait de la queue pour un temps compris entre 1 et 3 secondes lors des tests contrôles effectués avant l'injection de la substance à l'étude. Après l'administration du produit, le temps maximum d'irradiation sera de 20 secondes, afin d'éviter la brûlure de la queue, ce qui rendrait les essais ultérieurs aléatoires.

Protocole expérimental

Au total 4 lots de 6 souris chacun ont été étudiés. La morphine est administrée par voie sous cutanée à 0,1 ml/20 g P.C tandis que l'extrait aqueux de NS est administré par voie orale à la concentration de 0,2 ml/20 g P.C. La morphine a été utilisée comme référence.

Le lot témoin : reçoit le liquide physiologique (solution isotonique de NaCl à 9‰) par voie orale 1h avant l'irradiation de la queue au focus 40

- Le lot 2 : reçoit la suspension de morphine à la dose de 0,1 mg/kg P.C par voie sous cutanée 30 min avant de subir le même traitement que le lot témoin
- Le lot 3 : reçoit la suspension de NS. à 1 mg/kg P.C par gavage 1H avant le test
- Le lot 4 : reçoit la suspension de NS. à 2 mg/kg P.C par gavage 1H avant le test

Après administration des produits, le test est réalisé pendant 2H. Les souris sont immobilisées dans la cage de contention, la queue positionnée sur le trajet du faisceau lumineux de telle sorte que ce soit la partie inférieure de la queue qui soit irradiée. Le comptage de la latence de retrait de la queue (Tr) et l'émission de la chaleur irradiante sont simultanément déclenchés.

L'émission de la chaleur et le chronomètre sont automatiquement arrêtés dès que la queue subit une brusque déflexion pour se mettre hors du trajet lumineux calorifique. On effectue les mesures en 5 temps : T₀, T 30min, T 1H, T 1H 30min et T 2H. Le temps maximum d'irradiation de la queue est de 20 s pour éviter toute brûlure et lésion de la peau des souris.

Etude de l'activité analgésique périphérique

Animaux

Les animaux utilisés sont des souris mâles Swiss exempt de germes pathogènes et dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont détaillées dans le paragraphe consacré aux animaux. Chaque groupe compte 6 souris (n=6).

Réactifs

- Acide acétique 1,2%
- Extrait aqueux de NS : en suspension dans du NaCl à 9 % à 2 doses 1, et 2 mg/kg
- Aspirine : à 150 mg/kg
- Solution isotonique de NaCl à 9 %

Principe : Test du Writhing

Le test du Writhing permet de mettre en évidence l'activité des analgésiques majeurs de type morphine et mineurs de type aspirine. La technique utilisée est inspirée de la méthode de Koster et al. La substance testée est administrée par voie orale, une heure avant l'agent algique. L'extrait aqueux de NS est testé à 2 doses 1 et 2 mg/kg P.C.

Le produit de référence testé est l'acide acétylsalicylique (Aspro*eff, Laboratoire Casablanca), à la dose de 150 mg/kg. Les témoins reçoivent le véhicule, dans les mêmes conditions. Une heure après l'administration de produit, l'agent algique (acide acétique à 1,2 %) est injecté par voie I.P. à 0,15 ml/20g de PC (acide acétique Rectapur* 99-100 %, Prolabo, Paris). Les animaux sont aussitôt placés en cage individuelle (24 x 11 x 10 cm), pour être observés durant dix minutes.

Le paramètre pris en compte est le nombre total de contorsions et/ou d'étirements des pattes postérieures, permettant de calculer, pour chaque lot traité, le % de protection par rapport au lot témoin, selon le rapport :

$$\% \text{ de protection} = [(N_{\text{témoin}} - N_{\text{traité}}) / N_{\text{témoin}}] \times 100$$

N : nombre de crampes pendant 10 min

Protocole expérimental

Au total 4 lots de 6 souris chacun ont été étudiés. Tous les produits sont administrés par voie orale à 0,2 ml/20 g P.C.

- Le lot témoin : ne reçoit que la solution physiologique P.O 1h avant l'injection de l'acide acétique à 1,2% I.P
- Le lot 2 : lot de référence reçoit l'aspirine à 150 mg/kg P.O 1H avant de subir le même traitement que le lot témoin
- Les lots 3 et 4: reçoivent la plante NS respectivement à 1 et 2 mg/kg P.O

Une heure après le gavage, l'acide acétique est injecté par voie I.P à raison de 0,15 ml/20g de P.C. On attend 5 min puis on place les souris dans des cages individuelles pour comptabiliser le nombre de crampes pendant 10 min.

Etude de l'activité antispasmodique

Animaux

Les bronches pulmonaires du lapin, coupés en anneaux sont utilisés pour tester NS. Le lapin est non à jeun e poids entre 1,5 et 2 kg, il est maintenu dans les conditions d'élevage décrites dans le chapitre consacré aux animaux.

Le jéjunum du rat coupé en morceaux de 1 à 2 cm de longueur est utilisé pour mettre en évidence l'activité antispasmodique. Les rats pesant entre 150-250 g sont maintenus dans les mêmes conditions d'élevage. ils sont mis à jeun la veille du test.

Réactifs :

- Solution de Tyrode : barboté en continu par du carbogène (95% O₂ et 5% CO₂) à 37°C et pH=7,4 et dont la composition en mM est la suivante:
NaCl=136,9 KCl=2,7 CaCl₂=1,8 MgCl₂=1,05 NaHCO₃=11,9
NaH₂PO₄=0,4 Glucose=5,6 ; Eau distillée QSP 1 L
- Extrait aqueux de *Nigella sativa* : en suspension dans la solution physiologique 1 mg/ml et 2 mg/ml), sont évaluées sur les contractions spontanées du muscle lisse jéjunal et bronchique.
- Adrénaline 10⁻⁵ M
- Charbachol 10⁻⁵ M
- KCl 80 mM

Principe :

Des fragments de jéjunum et de bronches pulmonaires de 1 à 2 cm chacun, respectivement prélevés chez des rats Wistar (150 - 200 g) et le lapin (1,5 à 2 kg) sont conservés pendant les essais dans le liquide physiologique de Tyrode (8 g NaCl ; 0,2 g KCl ; 0,1 g MgSO₄ ; 0,05 g NaH₂PO₄ ; 1 g NaHCO₃ ; 0,2g CaCl₂ ; 1 g glucose ; E.D. qsp 1 000 ml) oxygéné et maintenu à 37°C. Par unité, ces fragments d'iléon sont montés dans une cuve à organe isolé de 15 ml de volume et relié à un transducteur isotonique (type Ugo Basile 7006). Les contractions toniques sont enregistrées et visualisées simultanément sur le moniteur de l'ordinateur. Un volume d'extrait est ajouté au milieu de perfusion sans dépasser 10% du volume de la cuve et les effets sont observés. Après 2 à 3 lavages au Tyrode et stabilisation pendant 20 min, une dose supérieure d'extrait est ajoutée dans la chambre à organe.

Les effets de différentes doses de l'extrait aqueux de la Nigelle (1 µg/ml et 2 mg/ml), est évaluée sur les contractions spontanées du muscle lisse jéjunal et bronchique.

Protocole expérimental:**➤ Préparation du jéjunum :**

Une fois tué par exsanguination, le rat a été placé en décubitus dorsal, ses pattes ont été écartées latéralement. Une incision de la peau a été réalisée le long de la partie ventrale par une paire de ciseaux à dissection en partant du dessous du menton, en ligne droite le long de la ligne blanche, et la plupart des organes internes ont été visualisés en place y compris la masse digestive.

Le jéjunum montre des anses horizontales contrairement à l'iléon ou les anses sont verticales. Ensuite, plusieurs segments de jéjunum ont été isolés à partir de l'intestin grêle et ont été rapidement placés dans la solution du Tyrode refroidie à 4°C pour stopper toute déperdition de l'ATP afin de faciliter la relance de la contraction du jéjunum. Des segments du jéjunum de 1 à 2 cm ont été débarrassés du tissu conjonctif et montés sur une cuve à organe isolé contenant du Tyrode barboté en continu par du carbogène.

➤ Prélèvement des bronches

L'appareil respiratoire comprend les voies aérifères d'une part (cavités nasales, larynx, trachée, bronches) et les poumons d'autre.

- Après l'anesthésie de l'animal on découpe la peau jusqu'à la tête en commençant par l'abdomen
- Dégager la peau vers les pattes à l'aide de scalpel.
- Ouverture de la cage thoracique par l'incision de la paroi musculaire.
- On souffle l'aire à travers la bouche de lapin à l'aide d'une paille
- On essaye de bien extérioriser la trachée et les bronches puis on effectue le prélèvement

➤ Expériences à réaliser:

1 : témoin ne reçoit rien, on ne mesure que les contractions spontanées du jéjunum pour avoir un tracé témoin et mettre à la fin le charbachol 10^{-5} M ou le KCl 80 mM qui sont spasmogènes

2 : Faire l'effet dose de N.S. sur les morceaux du jéjunum sur la contraction spontanée de l'intestin allant de la concentration $1 \mu\text{g/ml}$ à 2mg/ml en utilisant des doses cumulatives sur le même tissu. Toujours terminer avec une concentration de 10^{-5} M de l'adrénaline qui est un spasmolytique.

➤ Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés par leur moyenne \pm écartype. Pour déterminer si la ou les différences éventuelles entre ces moyennes sont significatives, les résultats sont soumis aux tests de variance (one et two way ANOVA) afin de comparer plusieurs moyennes. L'intervalle de confiance a été fixé à 95%, c'est-à-dire que les différences sont considérées comme significatives lorsque la probabilité d'erreur est inférieure à 5% ($P < 0,05$)

Résultats :

Activité analgésique

L'activité analgésique de l'extrait des graines de NS a été évaluée par le test de sensibilité (pour l'analgésie central), induite par l'acide acétique et par le test du Writhing pour l'analgésie périphérique). L'administration intra-péritonéale de l'extrait aqueux de NS a réduit de manière significative ($P < 0,05$) le nombre de torsions induites par l'acide acétique chez la souris (Figure 1). L'activité était comparable à celle de l'acide acétyle salicylique (150mg/kg , par os) utilisé en tant que médicament de référence. L'extrait à des doses de 1 et 2mg/kg de poids corporel a induit respectivement une inhibition significative de torsions de l'ordre de 45% ($p < 0,001$) et 60% ($p < 0,001$).

L'extrait a augmenté également le temps de réaction de 5,8 à 7 s ($p < 0,05$) et de 6 à 7,2 s ($p < 0,05$) à 30 et à 120 min respectivement après l'injection intra-péritonéale de l'extrait à des doses de 1 et 2mg/kg de poids corporel (figure 2). Le traitement par l'extrait aqueux de N. sativa à une dose de 1 et 2mg/kg a protégé significativement ($p < 0,01$) les animaux contre les stimulus thermiques. Le pourcentage d'inhibition de la douleur des animaux induite par les stimulus thermiques a été comparé avec celui du chlorhydrate de morphine (de $0,1 \text{mg/kg}$). Les inhibitions étaient de l'ordre de 77,4%, 89,9%, 88,6% et 82,9% pour l'extrait aqueux de NS à la dose de 1mg/kg , après 0, 30, 60, 90 et 120 min respectivement. A la dose de 2mg/kg de l'extrait aqueux de NS, les inhibitions de la douleur étaient de 87,7%, 91,9%, 97% et 84,3% respectivement après 0, 30, 60, 90 et 120 min.

les analgésiques centraux et périphériques sont détectés. Les analgésiques narcotiques de type (central) comme la morphine, pentazocine, péthidine et non-narcotiques de type (périphérique), tel que l'aspirine, l'ibuprofène, l'indométhacine, peuvent inhiber la réponse de contorsion chez la souris.

Sur la base des résultats obtenus, on peut en déduire que l'extrait aqueux avait une action analgésique importante central et périphérique. L'activité analgésique peut être due à la présence des constituants actifs dans l'extrait de graines.

➤ **Activité antispasmodique**

Pour chaque extrait nous avons mesuré l'amplitude et la fréquence de la contraction spontanée, la relaxation et la contraction du tissu avant et après l'addition cumulative de l'extrait de la plante. Pour le contrôle, la fréquence de contraction spontanée de jéjunum était de 28 contractions par minute.

L'amplitude de la contraction spontanée de tissu a été ainsi évaluée, cette amplitude (20 et 6,5 mm / min) était stable avant d'introduire une concentration cumulative de NS de l'ordre de 1 µg/ml à 2 mg/ml, l'amplitude a ensuite diminué avec l'augmentation de la concentration. A des concentrations allant jusqu'à 1 mg/ml, la fréquence de contraction a diminué et à la dose de 2 mg/ml d'extrait de NS la diminution est significative par rapport à celle obtenue par de l'adrénaline 10⁻⁵ M. On ajoutant de la Carbamycholine 10⁻⁵ M (Carb) une contraction du tissu pré-traité avec NS est ainsi observée.

L'extrait aqueux de NS a été testé pour son activité antispasmodique, la Trimébutine est utilisée comme contrôle, il s'agit d'un inhibiteur fort et dose-dépendant des contractions spontanées de jéjunum isolé du lapin. L'activité de l'extrait a été évaluée en % de l'effet spasmolytique maximal de l'adrénaline (à une dose de 2 mg/ml). L'effet de l'extrait (1 µg/ml à 2 mg/ml) est dose-dépendante, il inhibe les contractions spontanées de jéjunum isolé de lapin avec des IC₅₀ (50% d'inhibition de la concentration) de l'ordre de 31,72 pour la plante NS et de 91,8 µg/ml pour la Trimébutine. Les résultats sont présentés dans le tableau 1 et les figures 3-4. L'extrait (à une dose de 1-2 mg/ml) a exercé un effet inhibiteur significatif sur les contractions induites par l'ACh. L'Acétylcholine a induit des contractions du jéjunum et l'effet atteint son maximum dans les première 30 s. L'acétylcholine, est un neurotransmetteur excitant les muscles lisses des viscères, son action est au niveau de l'intestin par la stimulation des récepteurs muscariniques M₃ et des canaux Ca²⁺ voltage-dépendants.

L'extrait réduit la réponse maximale pour l'ACh à 30,3 ± 2,1% (1mg/ml de NS) et à 80 ± 2,24% (2 mg/ml de NS) respectivement. Les résultats ont montré que l'extrait exerce son activité antispasmodique par blocage des récepteurs M₃. L'effet obtenu par NS a confirmé que cette plante a une activité antispasmodique et relaxante sur le muscle lisse avec une IC₅₀ = 88,3 µg/ml, les intervalles de confiance l' IC 95% [32,2-105,6 µg/ml], IC₅₀ = 120,3 ± 1 µg/ml de fréquence et d'une IC₅₀ = 78,4 ± 0,1 µg/ml d'amplitude. Nous avons comparé ce résultat avec un médicament antispasmodique la Trimébutine avec IC 50 = 91,8 ± 0,1 µg/ml de relaxation, IC 50 = 246 ± 0,1 µg/ml de fréquence et IC₅₀ = 106,5 ± 1,2 µg/ml d'amplitude (tableau 1). L'effet de la trimébutine [acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque 2 - (diméthylamino)-2-phenylbutylester] sur le tractus gastro-intestinal est agoniste sur les récepteurs opiacés périphérique µ, κ et δ et la libération de peptides gastro-intestinaux comme motilin et la

modulation de la libération d'autres peptides, y compris le peptide intestinal vasoactif, la gastrine et le glucagon. Récemment, la trimébutine a montré également une diminution des réflexes induites par la distension de la lumière intestinale des animaux et on peut donc moduler la sensibilité viscérale. La contraction de muscle lisse dépend de l'augmentation du Ca^{2+} cytoplasmique libre. Cette augmentation peut être principalement induite par l'afflux de Ca^{2+} via les canaux voltage, ligand ou les canaux Ca^{2+} dépendants, qui s'ouvrent lors de l'extension lorsque les dépôts Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique sont petits.

L'extrait brut testé a inhibé les contractions spontanées cette inhibition est dose-dépendante, on suppose que les ou le principe actif contenu dans l'extrait blocs les canaux voltages Ca^{2+} ou peut ouvrir les canaux K^{+} ce qui induit l'hyperpolarisation et réduit l'excitabilité des muscles lisses. L'extrait de NS inhibe les contractions de jéjunum de lapins induites par l'acétylcholine, grace aux phytoactifs contenus dans cet extraitt et qui sont responsables de la diminution des contractions de l'acétylcholine ou ont un effet potentiel comme astringents, au niiveeeau de tractus gastro-intestinal, en réduisant le mouvement péristaltique et les sécrétions intestinales. L'activité observée justifie clairement l'utilisation des plantes pour soulager les douleurs de coliques et d'autres troubles gastro-intestinaux.

De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que l'extrait aqueux de *N. sativa* a montré une activité analgésique et un effet antispasmodique important. Par conséquent, ces résultats présentent une base importante pour de nouvelles recherches sur l'application potentielle de *N. sativa* à des fins médicinales. Pour déterminer le ou les principes actifs d'autres études doivent être entreprises.

Listes des tableaux et figures

Tableau 1: Comparaison des CI50 de l'extrait de NS avec le médicament antispasmodique. Les valeurs de CI50 sont exprimées en tant que moyenne géométrique avec des intervalles de confiance de 95%. Amplitude: IC 50 = 34,31 pg / ml, les intervalles de confiance à 95% [12,72 à 33,44]; Fréquence: IC 50 = 25,49 pg / ml, les intervalles de confiance à 95% [3,52 à 41,67]; Détente: IC 50 = 31,72 pg / ml, les intervalles de confiance à 95% [11,88 à 25,11]

Figure 1: L'inhibition de contorsions (induites par l'acide acétique) par l'extrait aqueux de NS à différentes doses. l'effet de NS à la dose de 1 mg / kg est comparable à l'effet d'acide acétylsalicylique (AAS) à 150 mg / kg. les résultats sont soumis au test de variance (one-way ANOVA) par la suite aux tests de comparaison multiple de Dunnett. les différences sont considérés comme significatives lorsque la probabilité d'erreur est inférieure à 5% ($P < 0,05$)

Figure 2: Temps de Réaction observée chez la souris après administration de NS et de la morphine. L'effet de NS intérêt Similaire à Celle de la morphine. Le Résultat Est Représenté Comme différence (Δ) de Temps de latence entre la stimulation et la Réaction de la souris. Les résultats sont soumis au test de variance (two-way ANOVA) ainsi par des post-tests de Bonferroni

Figure 3: Effet de l'extrait Aqueux de NS (1-500 μ /ml) sur l'amplitude des contractions spontanées de jéjunum du Lapin. Les valeurs sont exprimées en Moyenne \pm S.E.M. avec $n = 6$ de Tissus étudiés

Figure 4: Effet de l'extrait Aqueux de NS (1-500 μ /ml) sur la fréquence des contractions spontanées de jéjunum du Lapin. Les valeurs sont exprimées en Moyenne \pm S.E.M. avec $n = 6$ de Tissus étudiés

Figure 5: L'effet de l'extrait de NS sur la relaxation de l'intestin du lapin. IC 50 = 31,72 pg / ml, les intervalles de confiance à 95% [11,88 à 25,11]. Les valeurs des CI50 sont exprimées en tant que moyenne géométrique avec des intervalles de confiance fixés à 95%. $n = 7$ de tissus étudiés. avec *** $P < 0,001$ est considéré significatif.

Tableau 1

Produits	Relaxation (%)	Frequence (nombre de contraction/min)	Amplitude (mm/min)
Trimebutine	91.8	246.0	106.5
<i>Nigella sativa</i>	31.72	25.49	34.31

Revendications

- 1- Composition, comprenant un extrait aqueux de *Nigella Sativa* pour son application en tant qu'analgésique et antispasmodique.
- 2- Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est présentée sous forme de poudre pour dilution ou sirop, obtenue par atomisation ou séchage ou lyophilisation à partir de l'extrait aqueux.
- 3- La composition pharmaceutique selon la revendication 1 et 2 caractérisé en ce que la dite composition est présentée sous forme administrable par voie orale, anale ou intraveineuse
- 4- Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que médicament est analgésique des douleurs viscérales nociceptives.
- 5- Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la composition pharmaceutique ou diététique inhibe les torsions induites expérimentalement chez la souris par l'acide acétique.
- 6- Composition selon revendication 1 à 3 caractérisée en ce que le médicament antispasmodique lutte contre les douleurs abdominales.
- 7- Composition selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 3 et 6 caractérisé en ce que la composition pharmaceutique ou diététique bloque la contraction des muscles lisses ou anticholinergique.

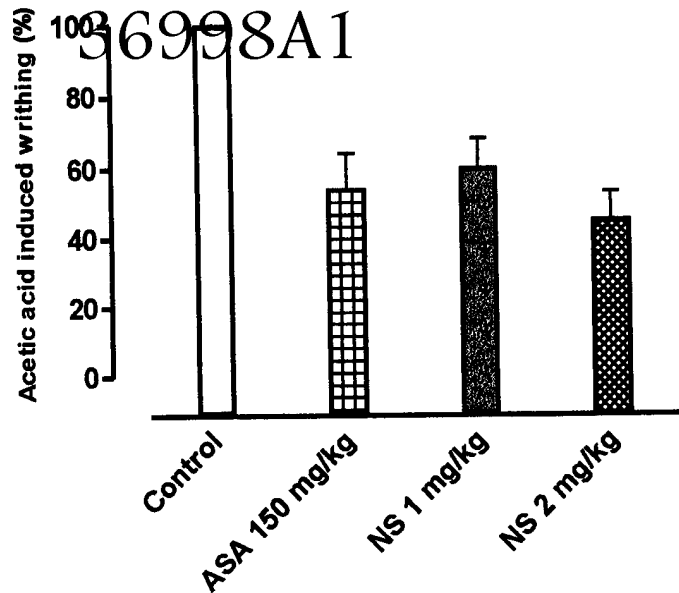


Figure 2

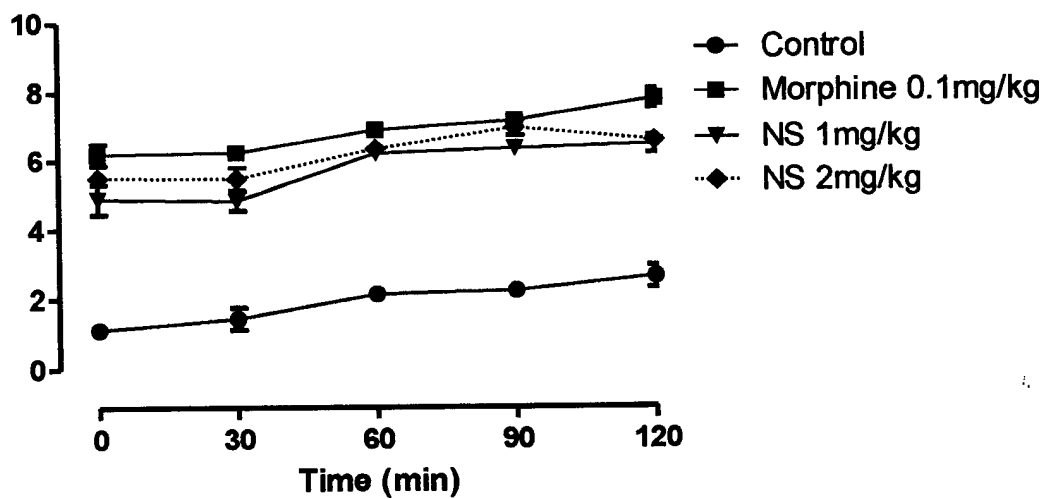


Figure 3

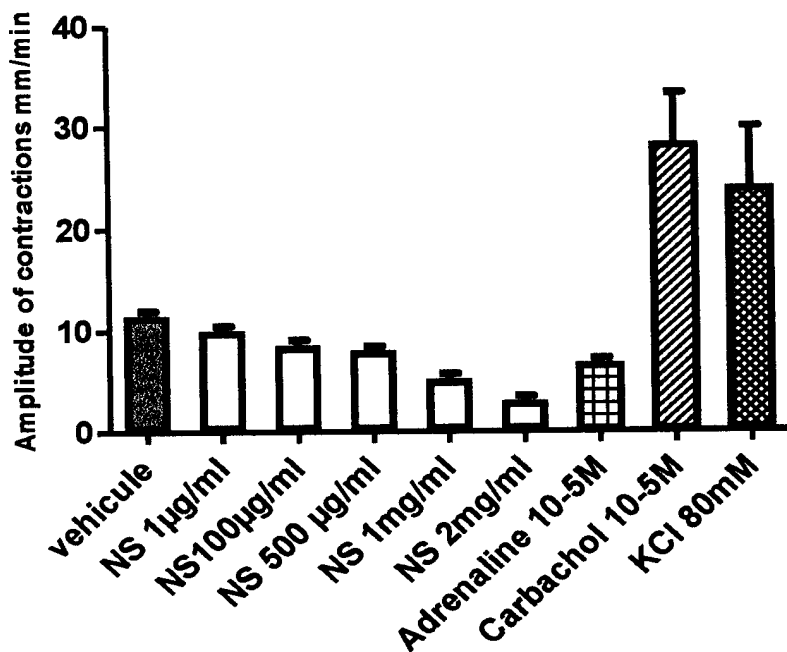


Figure 4

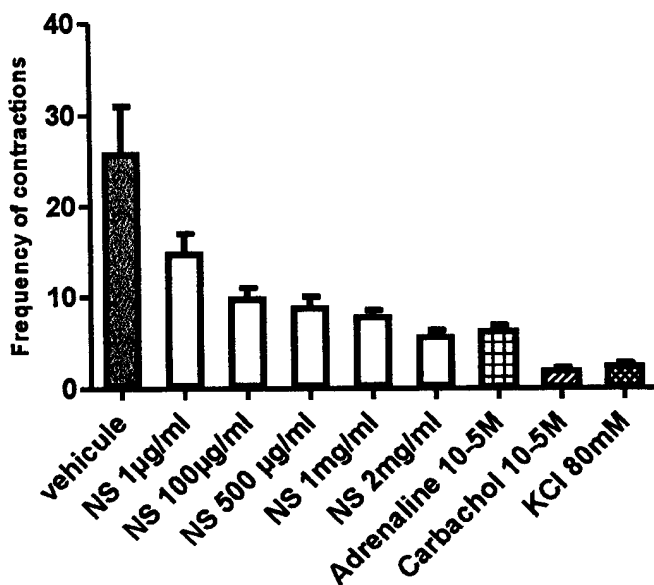
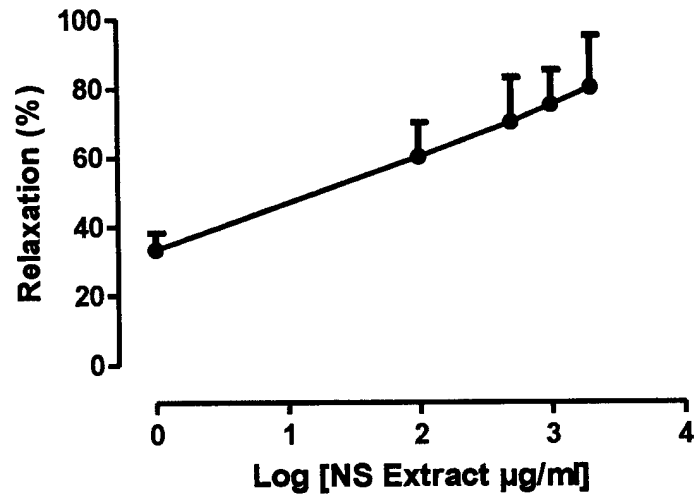


Figure 5





**RAPPORT DE RECHERCHE
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la
protection de la propriété industrielle)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 36998	Date de dépôt : 08/05/2014
Déposant : UNIVERSITE MOHAMMED V SOUISSI	
Intitulé de l'invention : COMPOSITION D'EXTRAIT AQUEUX DE NIGELLA SATIVA AYANT UNE ACTIVITE ANTISPASMODIQUE ET ANALGESIQUE	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents cités par l'examineur dans la partie rapport de recherche sont joints au présent document	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport	
<input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
<input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée	
<input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: TELLAA REDOUANE	Date d'établissement du rapport : 09/07/2015
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	
Email : tellaa@ompic.ma	

Partie 1 : Considérations générales

Cadre 1 : base du présent rapport

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description
1 - 14
- Revendications
7
- Planches de dessin
5 pages

Partie 2 : Rapport de recherche**Classement de l'objet de la demande :**

CIB: A61K 36/71, A61P1/06, A61P29/02, A61P25/04.

CPC : A61K 36/71

Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :

EPOQUE, Orbit, PUBMED

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
X	AFTAB AHMAD ET AL, A REVIEW ON THERAPEUTIC POTENTIAL OF NIGELLA SATIVA: A MIRACLE HERB; DÉPOSANT; DATE DE PUBLICATION; 01/05/2013.	1 - 7
X	ALIREZA GHANNADI ET AL; AN INVESTIGATION OF THE ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF NIGELLA SATIVA SEED POLYPHENOLS; 01/01/2005.	1 - 7
A	A H. GILANI et al; BRONCHODILATOR, SPASMOLYTIC AND CALCIUM ANTAGONIST ACTIVITIES OF NIGELLA SATIVA SEEDS (KALONJI): A TRADITIONAL HERBAL PRODUCT WITH MULTIPLE MEDICINAL USES; Mars 2011.	1 - 7

***Catégories spéciales de documents cités :**

-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
 -« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
 -« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
 -« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs
 -« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité*Cadre 4 : Remarques de clarté*

- a- L'objet des revendications 5 et 7 ne satisfait pas à l'exigence de clarté, car l'objet de la protection demandée n'est pas clairement défini. La revendication tente de définir l'objet par le résultat recherché, ce qui revient simplement à énoncer le problème sous-jacent, sans indiquer les caractéristiques techniques nécessaires pour parvenir à ce résultat.
- b- Le terme « comprenant » utilisé dans la revendication 1 n'est pas limitatif, il n'exclut pas la présence d'autres agents thérapeutique que NIGELLA SATIVA.

Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté (N)	Revendications 1 - 7	Oui
	Revendications aucune	Non
Activité inventive (AI)	Revendications aucune	Oui
	Revendications 1 - 7	Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1 - 7	Oui
	Revendications aucune	Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

- D1 : ALIREZA GHANNADI ET AL; AN INVESTIGATION OF THE ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF NIGELLA SATIVA SEED POLYPHENOLS ; 01/01/2005
- D2 : AFTAB AHMAD ET AL, A REVIEW ON THERAPEUTIC POTENTIAL OF NIGELLA SATIVA: A MIRACLE HERB; DÉPOSANT; DATE DE PUBLICATION; 01/05/2013
- D3 : A H. GILANI et al; BRONCHODILATOR, SPASMOLYTIC AND CALCIUM ANTAGONIST ACTIVITIES OF NIGELLA SATIVA SEEDS (KALONJI): A TRADITIONAL HERBAL PRODUCT WITH MULTIPLE MEDICINAL USES; Mars 2011.

1. Nouveauté (N) :

Le document D1 décrit une étude effectuée sur une composition comprenant un extrait hydro-alcoolique des graines de NIGELLA SATIVA pour démontrer l'activité analgésique et anti-inflammatoire des polyphénols présents dans cet extrait, ce dernier est présenté sous forme d'une masse semi-solide obtenue après évaporation du solvant et administré par voie orale ou Intra-péritonéal.

Le document D2 a pour objet une revue sur le potentiel pharmacologique de NIGELLA SATIVA, parmi les effets cités, l'action analgésique et anti-inflammatoire (p 5.7), et l'action antispasmodique (p 5.13).

Aucun des documents de l'art antérieur ne cite une composition comprenant un extrait aqueux de NIGELLA SATIVA, pour son application en tant qu'analgésique et antispasmodique Par conséquent, l'objet de la revendication 1 et des revendications dépendantes 2-7 est nouveau

conformément à l'article 26 de la loi 17-97 modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive (AI) :

Le document D2 considéré comme l'état de la technique le plus proche a pour objet une revue sur le potentiel pharmacologique de NIGELLA SATIVA, parmi les effets cités, l'action analgésique et anti-inflammatoire (p 5.7), et l'action antispasmodique (p 5.13).

L'objet de la revendication 1 de la présente demande diffère de D2 en ce qu'il décrit une composition comprenant un extrait aqueux de NIGELLA SATIVA, pour son application en tant qu'analgésique et antispasmodique.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut être considéré comme la fourniture d'une composition à base de NIGELLA SATIVA pour le traitement des douleurs et des spasmes.

La solution semble évidente à l'homme de métier à l'égard de l'art antérieur pour les raisons suivantes :

La formulation d'une composition à base d'extrait aqueux de NIGELLA SATIVA ne peut pas être considérée comme inventive, vu que le document D2 divulgue le potentiel analgésique et antispasmodique de NIGELLA SATIVA incitant ainsi l'homme de métier à arriver à cette solution.

Par conséquent, l'objet des revendications 1 à 7 n'implique pas d'activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.