

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 37534 B1** (51) Cl. internationale : **A61P 31/04; A61K 36/53**
(43) Date de publication : **31.01.2017**

(21) N° Dépôt : **37534**

(22) Date de Dépôt : **13.11.2014**

(71) Demandeur(s) : **UNIVERSITÉ MOHAMMED V DE RABAT, Angle avenue Allal El Fassi et Mfadel Cherkaoui, Alirfane 8007.N.U, Rabat Rabat-Chellah (MA)**

(72) Inventeur(s) : **LAKHDAR Leila ; FARAH Abdellah ; ENNIBI Oumkeltoum**

(74) Mandataire : **KARTIT ZAID**

(54) Titre : **Composition pharmacologique du Thym (huile essentielle) à effet antibactérien sur d'Aaggreatibacter actinomycetemcomitans**

(57) Abrégé : L'application de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de Thym (Thymus vulgaris) d'origine Marocaine sur une souche bactérienne orale virulente; Aggregatibacter actinomycetemcomitans clone JP2. Cette souche originelle n'a jamais fait l'objet de tests antimicrobiens à base d'huiles essentielles. Cette nouvelle application englobe aussi bien la méthodologie que les résultats obtenus. La technique utilisée est une méthode simple, claire, basée sur la preuve et offrant une meilleure précision et une meilleure reproductibilité des résultats.

Abrégé

L'application de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de **Thym (*Thymus vulgaris*)** d'origine Marocaine sur une souche bactérienne orale virulente; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clone JP2. Cette souche originelle n'a jamais fait l'objet de tests antimicrobiens à base d'huiles essentielles.

Cette nouvelle application englobe aussi bien la méthodologie que les résultats obtenus. La technique utilisée est une méthode simple, claire, basée sur la preuve et offrant une meilleure précision et une meilleure reproductibilité des résultats.

30 JUN 2016

Titre : Composition pharmacologique du Thym (huile essentielle) à effet antibactérien sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clone JP2

Description :

Notre invention concerne la phytothérapie, en particulier l'effet antibactérien de l'huile essentielle de Thym (*Thymus vulgaris*) d'origine Marocaine sur une souche bactérienne orale virulente; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clone JP2. Cette souche originelle n'a jamais fait l'objet de tests antimicrobiens à base d'huiles essentielles.

Cette nouvelle application englobe aussi bien la méthodologie que les résultats obtenus. La technique utilisée est une méthode simple, claire, basée sur la preuve et offrant une meilleure précision et une meilleure reproductibilité des résultats.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa) clone JP2 est une bactérie orale à Gram négatif anaérobie facultative, connue virulente, incriminée comme agent étiologique principal dans les parodontites agressives, réel problème de santé publique au Maroc. Il s'agit de maladies parodontales destructrices entraînant des pertes osseuses sévères et aboutissant à la perte des dents chez de jeunes adolescents Marocains (Haubek et al. 2001, Haubek et al. 2008, Ennibi et al. 2012). Ces dernières décennies, en raison de l'incidence croissante de ces parodontites, de la résistance accrue des bactéries orales aux antibiotiques et des effets secondaires liés aux agents antibactériens fréquemment utilisés en dentisterie, la recherche d'un nouvel agent thérapeutique alternatif sans danger pour la santé s'impose. Ainsi, les huiles essentielles, utilisés en Médecine traditionnelle, peuvent être considérées comme une bonne alternative thérapeutique. Ceci d'autant plus que le Maroc figure parmi les principaux pays producteurs d'huiles essentielles.

A la date d'aujourd'hui, il n'existe pas de procédures standardisées concernant la détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles telles qu'il en existe pour les antibiotiques selon les recommandations de CLSI par National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA (NCCLS). Toutefois, l'évaluation de l'activité antibactérienne de ces agents a fait l'objet de plusieurs publications dont celles sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (clone non-JP2), et ce suivant différentes méthodes non standardisées pour la détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) des huiles sur cette bactérie. En effet, on retrouve une grande divergence entre les études concernant le protocole employé ainsi que le matériel utilisé. Certains auteurs utilisent la méthode de diffusion en milieu solide (Shih et al. 2013, Kędzia et al. 2013, Gursoy et al. 2009), d'autres rapportent la méthode de diffusion en milieu liquide, en macrodilution pour certains (Cha et al. 2005, 2007, Kulik et al. 2000) et en microdilution pour d'autres (Cunha et al. 2013, Francesca et al. 2013, Park et al. 2012, Taweekhaisupapong et al. 2010, Takarada et al. 2004, Shapiro et al. 1994).

La méthode de diffusion en milieu solide est moins précise et présente certaines limites dû au cloisonnement des composants de l'huile dans la gélose en fonction de leur affinité avec l'eau (Budzyńska et al. 2009). Concernant la méthode de diffusion en milieu liquide en macrodilution, la CMI est généralement déterminée visuellement ce qui également manque de précision. Quant à la technique de dilution en milieu liquide en microdilution, elle reste la plus sensible, la plus précise et la plus reproductible pour le calcul de la CMI (Budzyńska et al. 2009). Cependant, afin de mener à bien cette technique et obtenir des résultats probants, l'utilisation d'un indicateur de croissance est recommandée selon plusieurs auteurs (tel : Triphényl Tétrazolium Chloride (TTC), piodonitrotétrazolium violet (INT)...). Or, les études divergent concernant le choix de la dose appropriée de cet indicateur, sachant que ce dernier peut être toxique et peut avoir un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne à haute concentration. Ainsi, dans notre méthodologie adoptée, nous avons utilisé une concentration appropriée de TTC (qui ne montre aucun effet inhibiteur sur la croissance bactérienne), en se référant à l'étude de Rahman et al. 2004 sur les bactéries anaérobies à Gram négatif.

Il est important de signaler que les protocoles rapportés sur l'étude de l'effet des huiles essentielles sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sont souvent ambiguës, non clairs et/ou utilisant des matériaux ou appareils coûteux souvent compliqués tels que les systèmes automatisés (plaques microscan avec le système WalkAway-96 (Saiman et al. 2003), système de microbiologie automatisé Vitek (bioMérieux/Vitek, Inc.)(Barry et al. 2003)... ou semiautomatisés (spectrophotomètres, traitement d'image assistée par ordinateur (Canton et al. 2000, Korgenski et al. 1998)...).

Par ailleurs, il est judicieux de noter qu'il n'existe pas de standards internationaux concernant les tests de susceptibilité antimicrobienne pour les bactéries orales. Par conséquent, notre présent travail se propose de présenter une méthodologie précise basée sur la preuve, aboutissant à des résultats reproductibles et fiables.

Matériel et méthodes :

- Matériel :

- L'huile essentielle de Thym: Il s'agit de *Thymus vulgaris* de la famille des *Lamiaceae*. Elle a été extraite de plantes qui ont été cultivées au Maroc. Les spécimens authentifiés ont été déposés dans l'herbier de laboratoire de photochimie de l'Institut national de plantes médicinales et aromatiques - Université de Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc, selon le code FA/RP/INPMA/108.

Une solution mère de travail de cette huile est d'abord préparée selon la technique de Benjilali et al. 1986 comme suit:

Une solution de Tween 80 à 10% (diluée dans l'eau distillée) est préalablement autoclavée. Ensuite, 900 µl de cette solution est ajoutée à 100 µl d'huile essentielle et puis l'ensemble est homogénéisé : c'est la solution mère de l'huile essentielle émulsifiée.

- **Souche bactérienne** : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, clone JP2, sérotype b. Il s'agit d'un isolat clinique issu de prélèvements de plaque sous-gingivale de patients atteints de parodontite agressive, au Service de Parodontologie du Centre de Consultation et de traitement dentaire de Rabat.

- Méthode expérimentale :

- **Extraction de l'huile essentielle**

Une portion (100 g) des parties aériennes des plantes a été hydrodistillée, pendant au moins trois heures, en utilisant un appareil de type Clevenger. Pour éliminer toute trace d'eau, l'huile extraite a été traitée avec du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄), filtrée et ensuite stockée à l'obscurité à 4 ° C. Le rendement en huiles essentielles est calculé selon la formule : $Yield = \frac{Volume}{Mass} \times 100$

Ce dernier est exprimé en ml/100 g de matière sèche.

- **Analyse chromatographique et caractérisation de l'huile essentielle**

CG : analyse par la chromatographie en phase gazeuse (CG) est effectuée sur un chromatographe Hewlett -Packard (HP 6890) gazeuse (FID) , équipé d'une colonne capillaire HP- 5 (5% de phényl méthyl silicone) . La caractéristique de cette colonne était de: 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre et de 0,25 mm d'épaisseur de film. La température est programmée de 50 ° C (5min d'attente initiale) à 200 ° C à 4 ° C / min . Des conditions de chromatographie en phase gazeuse ont été les suivantes : N₂ comme gaz porteur (1,8 ml / min) ; mode partagé (débit: 72,1 ml / min , le rapport : 1/50) a été utilisée , les températures de l'injecteur et le détecteur sont de 275 ° C et 250 ° C respectivement . Les échantillons dilués (1/20 dans l'hexane) de 1 ml ont été injectés manuellement. La machine a été dirigée par un type de système informatique « HP ChemStation ».

GC / MS : chromatographie en phase gazeuse /spectrométrie de masse : La composition chimique des huiles essentielles ont été analysées en utilisant un chromatographe en phase gazeuse (GC Ultra TRACE) monté sur un spectromètre de masse (Polaris Q-Ion Trap MS). Fonctionnement en mode impact électronique d'assurance-emploi (70 eV). VB- 5 (méthylpolysiloxane 5% phényle) et une colonne (30m x 0,25 mm x épaisseur de 0,25 pm) ont été utilisés (Centre national de la recherche scientifique et technique - (CNRST) , Rabat , Maroc) . Les conditions chromatographiques sont les suivantes: températures de l'injecteur et du détecteur à 220 et 300 ° C respectivement; gaz porteur, de l'hélium à un débit de 1,4 ml / min, température de programme rampe de 40 à 300 ° C avec un gradient de 4 ° C / min (maintien de la température initiale et finale pendant 4min). La quantité relative des composants individuels de l'huile totale a été exprimée en pourcentage d'aire du pic par rapport à la zone de pic totale. Une recherche bibliographique a été réalisée en utilisant la combinaison de NIST MS Recherche et de la littérature. Les composants des huiles ont également été identifiés par leurs indices de rétention relatifs à n-alcanes (C8 - C24)

- **Etude de l'activité antibactérienne in vitro de *Thymus vulgaris***

Le protocole fait appel dans un 1^{er} temps à la technique de contact direct par diffusion en milieu gélosé (en puits), qui permet de prévoir l'efficacité in vitro de l'huile essentielle. Ensuite, pour le calcul de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) de L'huile testée

efficace, la méthode de microdilution sur microplaque de 96 puits est utilisée. La CMB (Concentration Minimale Bactéricide) est également mesurée suivant le protocole ci-après.

1. Méthode de diffusion en puits

Ce test est réalisé par dépôt de l'huile essentielle dans des puits creusés dans la gélose suivant une modification de la technique de Dorman et Deans 2000. Elle assure une diffusion totale de l'huile essentielle à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et de diamètre facilement mesurable sur géloseensemencée par la suspension bactérienne.

➤ Préparation de l'inoculum

A partir de souches conservées à -20°C (sous formes de billes), une mise en culture est réalisée sur gélose au sang cuit en condition d'anaérobiose sous 5% de CO₂ à 37°C pendant 24h. Une suspension bactérienne d'une densité de 0.5 Mc Farland est ensuite préparée à partir de cette culture pure et jeune (âgée de 24 heures) dans une solution de 0,85% NaCl, en utilisant un étalon. La suspension ajustée devra ainsi contenir approximativement 10⁸ CFU/ml (colony forming units /ml).

➤ Ensemencement des boîtes de pétri :

1ml de l'inoculum préparé estensemencé en surface du milieu gélosé par inondation. Après 15 min, des puits sont creusés à l'aide de pipettes Pasteur (l'extrémité épaisse de 6 mm). Il est à signaler que l'inoculum ainsi préparé ne doit pas être utilisé au delà de 30 minutes au risque d'une augmentation de la densité de l'inoculum à cause de la croissance bactérienne. Ensuite, 50 ul de l'huile essentielle est versée dans chaque puits. On teste l'huile essentielle pure et diluée dans du Tween 80 à 1/10 (10%).

La doxycycline en disque de 30ug est utilisée comme contrôle positif, Tween 80 pur et dilué à 10% sont utilisés comme contrôle négatif. Une boîte de pétriensemencée par inondation a été prise comme témoin de croissance bactérienne. Tous les tests sont effectués en triplicata.

➤ Incubation : Les boîtes de pétriensemencées sont incubées à l'étuve à 37°C, dans des jarres, sous 5% de CO₂, pendant 48h.

2. Méthode de microdilution

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile testée sur l'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) est réalisée sur microplaque à 96 puits de culture cellulaire selon une modification de la méthode décrite par Shapiro et al. 1994 et Carson et al. 1995. A partir de colonies de Aa datant de 48h, on inocule 2 tubes contenant 10 ml de BHI (Brain Heart Infusion) stérile. Après 24h d'incubation à 37°C dans une jarre sous 5% de CO₂, on ajuste la densité à 0.5 Mc Farland. Parallèlement, des dilutions en série successives par progression géométrique de raison 2 de la solution mère obtenue pour chaque huile essentielle testée sont préparées dans un milieu de culture stérile (BHI), de façon à obtenir successivement les dilutions : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512. En prenant en compte la solution mère de base préparée de l'huile essentielle (10%), ces dilutions correspondent, par conséquent, à : 5%, 2,5%, 1,25%, 0,6%, 0,3%, 0,15%, 0,07%, 0,03%, 0,01%. Ensuite, des aliquotes de 100 µl de chaque dilution préparée d'huile testée ont été ajoutées, dans chaque puits de microplaque, à 100 µl d'inoculum préparé. Le Tween

80 à 10% est utilisé comme contrôle négatif. Un contrôle de croissance (inoculum seul) pour chaque souche est inclus également dans l'essai. Les tests sont effectués en triplicata sur la même microplaque et l'expérimentation est répétée 2 fois. Le schéma de la distribution expérimentale au niveau des microplaques est illustré ci-après (Fig 1).

Concernant le contrôle positif : nous avons utilisé l'Amoxicilline que nous avons préparé et dont nous avons déterminé la CMI sur *Aa* en utilisant la méthode de microdilution dans un bouillon de culture adapté. En l'absence de méthode standardisée d'antibiogramme de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) pour ce type de souche, nous avons adopté la procédure suivante en s'inspirant de celle des « entérobactéries » dans les recommandations de CLSI (2006):

Une suspension bactérienne en bouillon BHI (Brain Heart Infusion) équivalente au standard McFarland 0,5 est préparée et ajoutée aux solutions antibiotiques à différentes concentrations (0,01mg/ml, 0,1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/ml). Un contrôle négatif (eau stérile + inoculum) est utilisé comme témoin de croissance bactérienne et une solution contenant du bouillon stérile est utilisée comme contrôle de contamination. Ainsi, la concentration de 10 mg/ml, dont la solution est restée claire (non trouble) est considérée comme la CMI de l'Amoxicilline sur *Aa* et qui sera utilisée comme contrôle positif dans notre essai.

Les microplaques, recouvertes de leurs couvercles, ont été mises à l'étuve pour incubation dans des sachets en plastique sous 5% de CO₂ à 37°C pendant 48h.

Après la période d'incubation, 40 ul d'une solution à 2 mg / mL de Triphényl Tétrazolium Chloride (TTC) (indicateur de croissance bactérienne) (Shafiei et al. 2012) est ajouté dans chaque puits et la plaque est incubée à 37 ° C pendant 1 heure à 2 heures environ. La solution d'indicateur TTC change du clair au pourpre en présence d'activité bactérienne, tandis qu'elle reste claire lorsque la croissance microbienne est inhibée. CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est définie comme la plus faible concentration de l'huile essentielle qui ne montre aucune croissance bactérienne visible après la période d'incubation (pas de changement de couleur (claire) de TTC). Pour déterminer la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), une aliquote de 10 ul est prélevée à partir de cultures au niveau des puits ne présentant pas de turbidité visible, etensemencée sur des milieux de gélose de sang cuit et incubée pendant 48h à 37 ° C sous 5% de CO₂ (Hammer et al. 2003). La détermination des valeurs de CMB a été réalisée en triplicata. Le rapport CMB / CMI a également été calculé pour mettre en évidence la nature de l'effet antibactérien de l'huiles essentielle testée. Lorsque le rapport est inférieur à 4, l'huile essentielle est considérée comme une huile essentielle bactéricide et lorsque le ratio est supérieur à 4, elle est considérée comme une huile essentielle bactériostatique (Levison et al. 2004).

- **Analyse statistique**

Les diamètres des zones d'inhibition, la CMI et CMB, variables continues avec distribution normale, ont été présentés en moyenne \pm écart type. Pour les différences statistiques entre *Thymus vulgaris*, Doxycycline et Tween 80, l'analyse à un facteur (ANOVA) avec correction Bonferroni a été effectuée. La valeur du $P < 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative. L'analyse statistique a été menée en utilisant SPSS pour Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTATS

1. Composition chimique :

L'analyse chimique de l'huile essentielle étudiée a mis en évidence les constituants majeurs suivants : Thymol (42.01%), *P*-Cymene (14.34%), γ -Terpinene (12.04%), Carvacrol (5.07%) (Tableau 1).

2. Activité antibactérienne :

➤ Essai de diffusion en puits :

Après la période d'incubation (48h), des zones d'inhibition de croissance bactérienne sur gélose sont obtenues et mesurées par un pied à coulisse (Tableau 2). Cependant, aucun halo d'inhibition n'est obtenu pour les contrôles négatifs (Tween 80 pur et dilué à 10%). Concernant, le témoin de croissance utilisé, une croissance bactérienne sous forme d'un film recouvrant la gélose est obtenue. Le diamètre moyen des zones d'inhibition induits par la Doxycycline ($22,67 \pm 1,15$ mm) est significativement plus petit que celui produit par l'huile essentielle testée à l'état pur ($45,00 \pm 6,24$ mm). Les diamètres des zones d'inhibition observés pour l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* à l'état brut, ont montré des valeurs supérieures à 20 mm (Tableau 2), traduisant une forte sensibilité de la souche *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clone JP2 à l'huile étudiée.

➤ Essai de microdilution :

Les valeurs enregistrées de CMI, CMB et rapport CMB/CMI sont représentés dans le Tableau 3. La CMI ($0,06 \pm 0,01$ %) et la CMB ($0,15 \pm 0$ %) obtenues témoignent d'une activité antibactérienne effective de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. Le rapport CMB/CMI obtenu est inférieur à 4, ce qui renseigne sur la nature de l'effet antibactérien de l'huile essentielle testée qui s'avère ainsi bactéricide.

Liste des tableaux :

Fig 1: Distribution expérimentale de la microplaque pour l'huile testée pour la détermination de la CMI : C1
 → C4 : différentes concentrations de l'huile testée + inoculum, Cc : contrôle de croissance (inoculum seul), C- : contrôle négatif (tween 80 à 10% + inoculum), C+ : contrôle positif (Amoxicilline + inoculum)

Tableau 1 : Composition chimique de *Thymus vulgaris* huile essentielle

Tableau 2 : Diamètres d'inhibition (mm) obtenues par la méthode de diffusion en puits

Tableau 3: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB) (%) (v/v) de l'huile essentielle testée sur la souche *A. actinomycetemcomitans* clone JP2

| IR | Constituants* | Pourcentage (%)** |
|------|------------------------|-------------------|
| 931 | α -Thujene | 2.10 |
| 939 | α -Pinene | 1.87 |
| 980 | β -Pinene | 0.79 |
| 988 | Octan-1-en-3-ol | 0.16 |
| 991 | Myrcene | 2.18 |
| 1005 | α -Phellandrene | 0.51 |
| 1018 | α -Terpinene | 2.04 |
| 1026 | <i>P</i> -Cymene | 14.34 |
| 1031 | Limonene | 1.01 |
| 1033 | 1,8-cineole | 0.82 |
| 1062 | γ -Terpinene | 12.04 |
| 1068 | Cis-sabinen hydrate | 0.05 |
| 1087 | Fenchone | 0.06 |
| 1088 | Terpinolene | 0.78 |
| 1098 | Linalool | 4.41 |
| 1177 | Terpinene-4-ol | 1.08 |
| 1235 | Thymol methyl ether | 2.14 |
| 1290 | Thymol | 42.01 |
| 1298 | Carvacrol | 5.07 |
| 1352 | Terpinyl acetate | 0.41 |
| 1356 | Eugenol | 0.25 |
| 1391 | β -elemene | 0.15 |
| 1401 | Methyl Eugenol | 0.41 |
| 1418 | β -Caryophyllene | 0.82 |
| 1430 | β -copaene | 0.16 |
| 1454 | α -Humulene | 0.26 |
| 1480 | Germacrene D | 0.34 |
| 1509 | β -Bisabolene | 0.37 |
| 1520 | δ -cadinene | 0.07 |
| 1581 | Caryophyllene oxide | 0.32 |
| | Total | 97,02 |

IR: Index de Rétention, *: constituants identifiés par GC-IK and GC-MS, **: Pourcentages des constituants donnés par GC

Revendications

1. Composition pharmacologique d'extrait de Thym comprenant au moins :
Thymol (42.01%)
P-Cymene (14.34%)
 γ -Terpinene (12.04%)
Carvacrol (5.07%)
Caractérisée en ce que la dite composition produit un effet antibactérien sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans clone JP2*
2. Composition pharmacologique d'extrait de Thym selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'effet antibactérien se produit avec l'utilisation de l'extrait de l'huile essentielle de Thym (tableau 1);
3. Composition pharmacologique d'extrait de Thym selon la revendication 1 et 2 caractérisée en ce que l'effet est bactéricide sur espèce *Aggregatibacter actinomycetemcomitans clone JP2*.
4. Composition pharmacologique d'extrait de Thym selon la revendication 1,2 et 3 caractérisée en ce que la composition se présente sous les formes galéniques liquide et solide.

| Agents | <i>Thymus vulgaris</i> pur | <i>Thymus vulgaris</i> dilué 1/10 | Doxycycline (30mg) | Tween 80 | Tween 80 (10%) | P |
|---|----------------------------|-----------------------------------|--------------------|-------------|----------------|--------|
| Diamètre de zone d'inhibition (mm) † (M±ET) | 45,50 ± 6,24 | 18,67 ± 1,15 | 22,67 ± 1,15 * | 6,00 ± 0 †† | 6,00 ± 0 ° | <0,001 |

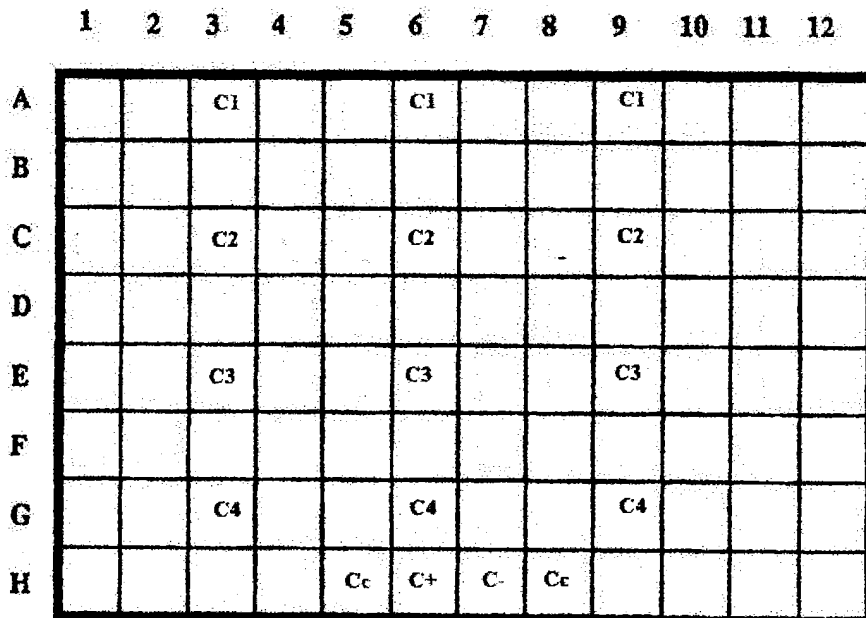
N : nombre de l'effectif, M± ET : Moyenne ± Ecart Type (pour une expérimentation en triplicata), †: diamètre de la zone d'inhibition incluant le diamètre du puits (6mm).* : P <0,001: Doxycycline Vs *Thymus vulgaris* pur.

†† : P <0,001 : Tween 80 (pur) Vs *Thymus vulgaris* (pur et dilué) et Doxycycline.

° : P <0,001 : Tween 80 (10%) Vs *Thymus vulgaris* (pur et dilué) et Doxycycline.

| Variables | CMB (%) (M ± ET) | CMB (%) (M ± ET) | CMB (%) (M ± ET) |
|--|------------------|------------------|------------------|
| <i>Thymus vulgaris</i> M ± ET: moyennes écart type | 0,00 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 | 2,4 ± 0,69 |

FIG1





**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 : 37534 | Date de dépôt : 13/11/2014 |
| Déposant : UNIVERSITÉ MOHAMMED V DE RABAT | |
| Intitulé de l'invention : Composition pharmacologique du Thym (huile essentielle) à effet antibactérien sur d'Aggregatibacter actinomycetemcomitans | |
| 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 : 26/05/2015 |
| 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
6
- Revendications
1 - 4
- Planches de dessin
7 - 8

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB : A61K 36/53

CPC : A61K 36/53

Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :

EPOQUE, Orbit

| Catégorie* | Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | N° des revendications visées |
|------------|--|------------------------------|
| A | Aida Rodriguez-Garcia ET AL, DEVELOPMENT AND IN VITRO EVALUATION OF BIOPOLYMERS AS A DELIVERY SYSTEM AGAINST PERIODONTOPATHOGEN MICROORGANISMS, Acta Odontol. Latinoam. 2010 ISSN 0326-4815 Vol. 23 N° 2 / 2010 / 158-163. | 1 - 4 |
| A | AYMAN AL-MARIRI ET AL; ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THYMUS SYRIACUS BOISS ESSENTIAL OIL AND ITS COMPONENTS AGAINST SOME SYRIAN GRAM-NEGATIVE BACTERIA ISOLATES, IRAN J MED SCI SUPPLEMENT JUNE 2013; VOL 38 NO 2. | 1 - 4 |
| A | http://www.phytomania.com/thym.htm | 1 - 4 |

***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) les revendications 1 et 3 présentent un problème de clarté, car elles définissent un mécanisme d'action au lieu de définir l'application pratique à prévoir.
- b) La revendication 2 manque de clarté du fait qu'elle se fonde sur une référence des dessins (Tableau 1) pour exprimer les caractéristiques techniques.

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

| | | |
|--|---|------------|
| Nouveauté (N) | Revendications 1 - 4 Revendications aucune | Oui Non |
| Activité inventive (AI) | Revendications 1 - 4 Revendications aucune | Oui Non |
| Possibilité d'application Industrielle (PAI) | Revendications 1 - 4 Revendications aucune | Oui 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 : Aida Rodriguez-Garcia ET AL, DEVELOPMENT AND IN VITRO EVALUATION OF BIOPOLYMERS AS A DELIVERY SYSTEM AGAINST PERIODONTOPATHOGEN MICROORGANISMS, Acta Odontol. Latinoam. 2010 ISSN 0326-4815 Vol. 23 N° 2 / 2010 / 158-163.
- D2 : AYMAN AL-MARIRI ET AL; ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THYMUS SYRIACUS BOISS ESSENTIAL OIL AND ITS COMPONENTS AGAINST SOME SYRIAN GRAM-NEGATIVE BACTERIA ISOLATES, IRAN J MED SCI SUPPLEMENT JUNE 2013; VOL 38 NO 2.
- D3 : <http://www.phytomania.com/thym.htm>

1. Nouveauté (N) :

Le document D1 a pour objet des polymères qui peuvent être utilisés comme système de délivrance de principes actifs extraits à partir des plantes, parmi les plantes citées en peut trouver le *Thymus Vulgaris*.

Le document D2 a pour objet l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus Syriacus* contre certaines bactéries Gram négatif.

D3 décrit les bienfaits de la plante du thym qui contient 0,5 à 2,5 % d'huile essentielle répartie entre les essences suivantes : thymol, carvacrol, linalol, thuyanol, alpha terpinéol, géraniol, et paracymène. L'article énumère également les différentes propriétés médicales et pharmacologiques de l'huile essentielle extraite à partir de la plante du thym, à savoir, l'effet bactéricide (antibactérien).

Aucun des documents de l'art antérieur ne décrit une composition pharmacologique d'extrait de Thym avec des proportions des huiles essentielles telles que décrites dans la revendication 1.

Par conséquent l'objet des revendications 1 – 4 est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97

modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive (AI) :

Le document D1 considéré comme l'état de la technique le plus proche a pour objet des polymères qui peuvent être utilisés comme système de délivrance de principes actifs extraits à partir des plantes, parmi les plantes citées en peut trouver le *Thymus Vulgaris*. L'effet de cette dernière contre *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* a été divulgué dans les figures 1 et 2 page 162.

L'objet de la revendication 1 diffère de D1 en ce qu'il a pour objet une composition pharmacologique d'extrait de Thym avec des proportions des huiles essentielles bien spécifiées pour une utilisation contre *A. Actinomycetemcomitans* clone JP2.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme la fourniture d'une composition pour le traitement des maladies parodontites agressives, spécialement celles causées par l'*A. Actinomycetemcomitans* clone JP2.

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

l'utilisation d'extrait de thymus vulgaires contre *A. Actinomycetemcomitans* est connue de D1, mais son utilisation spécifique contre *A. Actinomycetemcomitans* clone JP2 pour le traitement de la parodontite avec les proportions telles que revendiquées n'est pas décrite dans l'art antérieur. L'homme de métier n'aurait arrivé à cette solution d'une manière évidente, l'effet a été démontré par les essais dans la page 8.

Par conséquent l'objet des revendications 1 - 4 implique une activité inventive au sens de 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.