



## (12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 37729 A1**
- (51) Cl. internationale : **A61K 36/00; A61K 36/53; A61P 43/00; A61P 31/04; A61K 36/534**
- (43) Date de publication : **29.07.2016**
- 
- (21) N° Dépôt : **37729**
- (22) Date de Dépôt : **31.12.2014**
- (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) : **LAKHDER LEILA ; OUMKELTOUM ENNIBI ; ABDELLAH FARAH**
- (74) Mandataire : **ZAOUI FATIMA**
- 
- (54) Titre : **COMPOSITION PHARMACOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE LA MENTHE POULIOT CITRONNELLE, ORIGON, THYME, BIGARADIER ET PALMAROSA A EFFET ANTIBACTERIEN SUR L'AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS**
- (57) Abrégé : Composition chimique : L'analyse chimique de l'huile essentielle étudiée a mis en évidence les constituants majeurs suivants : R(+)-pulégone (71.48%) et carvone (5,66%) (Tableau 1). 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 a 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 i 1,15 mm) est significativement plus petit que celui produit par l'huile essentielle testée a l'état pur (39 i 1,00 mm). Les diamètres des zones d'inhibition observés pour l'huile essentielle de Menthe pulegium L. à l'état brut, ont montré des valeurs supérieures à 20 mm (Tableau 2), traduisant une forte sensibilité de la souche Aggregatibacter actinomycetemcomitans clone IP2 a l'huile étudiée. Essai de microdilution : Les valeurs enregistrées de CMI, CMB et rapport CMB/CMI sont représentés dans le Tableau 3. La CMI (0,3%) et la CMB (0,6%) obtenues témoignent d'une activité antibactérienne effective de l'huile essentielle Mentha pulegium L. Dans l'étude de Shapiro et al.1994, une valeur de CMI similaire (0,3%) sur Aa (clone non IPZ) a été trouvée pour Mentha piperita, qui est de la même espèce (Mentha) que Mentha pulegium, ce qui vient

appuyer nos résultats. 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.

29 JUL 2016

**Titre : Composition pharmacologique de la Menthe pouliot, de la Citronnelle du Bigaradier, Palmarosa, du Thym, de l'Origan (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 **Menthe pouliot (*Mentha pulegium* L)** de la **Citronnelle du Bigaradier, Palmarosa, du Thym, de l'Origan** 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,

microdilution pour d'autres (Cunha et al. 2013, Francesca et al. 2013, Park et al. 2012, Taweechaisupapong 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 : TriphénylTétrazoliumChloride (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 (bioMérieuxVitek, 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 Menthe pouliot de la Citronnelle du Bigaradier, Palmarosa, du Thym, de l'Origan :**  
Une solution mère de travail de cette huile est d'abord préparée selon la technique de Benjlali 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 h. 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 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrée et ensuite stockée à l'obscurité à 4 ° C. Le rendement en huiles essentielles est calculé selon la

$$\text{Yield} = \frac{\text{Volume}}{\text{Mass}} \times 100 \text{ formule :}$$

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

- **Analyse chromatographique et caractérisation de l'huiles 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 : N<sub>2</sub> 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 Mentha pulegium L.**

Le protocole fait appel dans un 1<sup>er</sup> 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 gélose ensemencée 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 CO<sub>2</sub> 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 10<sup>8</sup> CFU/ml (colonyformingunits /ml).

#### ➤ Ensemencement des boîtes de pétri :

1ml de l'inoculum préparé est ensemencé 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 pétri ensemencée par inondation a été prise comme témoin de croissance bactérienne. Tous les tests sont effectués en triplicata.

#### ➤ Incubation : Les boîtes de pétri ensemencées sont incubées à l'étuve à 37°C, dans des jarres, sous 5% de CO<sub>2</sub>, 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 CO<sub>2</sub>, 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

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 CO<sub>2</sub> 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, et ensemencée sur des milieux de gélose de sang cuit et incubée pendant 48h à 37 ° C sous 5% de CO<sub>2</sub> (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 des huiles essentielles testées. 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 *Mentha pulegium*, 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 : R(+)-pulégone (71.48%) et carvone (5,66%) (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 ( $39 \pm 1,00$  mm). Les diamètres des zones d'inhibition observés pour l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. 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 (0,3%) et la CMB (0,6%) obtenues témoignent d'une activité antibactérienne effective de l'huile essentielle *Mentha pulegium* L. Dans l'étude de Shapiro et al.1994, une valeur de CMI similaire (0,3%) sur *Aa* (clone non JP2) a été trouvée pour *Mentha piperita*, qui est de la même espèce (*Mentha*) que *Mentha pulegium*, ce qui vient appuyer nos résultats.

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.



## Revendications

- 1- Composition pharmacologique de mélange d'huile essentielle de Menthe pouliot de la Citronnelle du Bigaradier, Palmarosa, du Thym, de l'Origan d'origine Marocaine sur une souche bactérienne orale virulente; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clone JP2 caractérisée en ce que l'effet antibactérien se produit avec l'utilisation de l'extrait de l'huile essentielle de la Menthe pouliot entre 0,2 à 0,6 %; de la Citronnelle entre 0,05 à 0,2 %; Bigaradier entre 0,2 à 0,5 % de Palmarosa entre 0,05 à 0,2 %; l'Origan entre 0,02 à 0,1 %; de Thym entre 0,04 à 0,2 %;
- 2- Composition pharmacologique de mélange l'huile essentielle de la Menthe pouliot selon la revendication 1 et 2 caractérisée en ce que l'effet du mélange est bactéricide sur espèce *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clone JP2 ;
- 3- Composition pharmacologique de l'huile essentielle du mélange des six plantes selon la revendication 1,2 et 3 caractérisée en ce que l'effet antibactérien s'observe avec l'application locale de la composition sur les muqueuses ou sous les formes galéniques liquide et solide.

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE

المملكة المغربية

المكتب المغربي  
للملكية الصناعية والتجارية

**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 telle que modifiée et complétée  
par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 37729	Date de dépôt : 31/12/2014
Déposant : UNIVERSITÉ MOHAMMED V DE RABAT.	
Intitulé de l'invention : COMPOSITION PHARMACOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE LA MENTHE POULIOT CITRONNELLE, ORIGON, THYM, BIGARADIER ET PALMAROSA A EFFET ANTIBACTERIEN SUR L'AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS	
<p>Le présent document est le rapport de recherche préliminaire avec opinion écrite sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément à l'article 43 et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17/97 relative à la protection de la propriété industrielle.</p> <p>- Les documents cités par l'examineur dans la partie Rapport de recherche sont joints au présent document</p>	
<p>Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :</p> <p>Partie 1 : Considérations générales</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés</p> <p>Partie 2 : Rapport de recherche</p> <p>Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quand à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle effectuée.</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée.</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention.</p>	
Examineur: TELLAA REDOUANE	Date d'établissement du rapport : 29/10/2015
Téléphone: 0522586414	

**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  
Pages 1 - 6
- Revendications  
3

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

CIB: A61K 36/53; A61K 36/00; A61K 36/534; A61P 31/04; A61P 43/00.  
 CPC: A61K 36/53; A61K 36/00; A61K 36/534.

Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :

**EPOQUE, Espacenet, Orbit, PUBMED.**

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
1 - 3	JP2007210922; KITASATO GAKUEN; 23/08/2007	A
1 - 3	H BOUKHEBTI ET AL; CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MENTHA PULEGIUM L. AND MENTHA SPICATA L. ESSENTIAL OILS; 01/01/2011.	A
1 - 3	A. HAJ AMMAR ET AL; CHEMICAL COMPOSITION AND IN VITRO ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF CITRUS AURANTIUM L.FLOWERS ESSENTIAL OIL; 01/11/2012	A
1 - 3	A RODRIGUEZ-GARCIA; DEVELOPMENT AND IN VITRO EVALUATION OF BIOPOLYMERS AS A DELIVERY SYSTEM AGAINST PERIODONTOGENIC MICROORGANISMS; 01/01/2010	A
1 - 3	BOUHDID, S ET AL; ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF ORIGANUM COMPACTUM ESSENTIAL OIL; 16/05/2008.	A

**\*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 de la revendication 1 doit être rédigée soit entant que revendication de produit ou d'utilisation. certaines des caractéristiques énoncées dans la revendication 1 portent sur une utilisation de la composition, au lieu de définir clairement la composition en termes de caractéristiques techniques.
- b) L'objet de la revendication 2 présente un problème de clarté, car il définit un mécanisme d'action au lieu de définir l'application pratique à prévoir.

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

Nouveauté (N)	Revendications 1 - 3 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1 - 3 Revendications aucune	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1 - 3 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 : JP2007210922
- D2 : CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MENTHA PULEGIUM L. AND MENTHA SPICATA L. ESSENTIAL OILS.
- D3 : CHEMICAL COMPOSITION AND IN VITRO ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF CITRUS AURANTIUM L.FLOWERS ESSENTIAL OIL.
- D4 : DEVELOPMENT AND IN VITRO EVALUATION OF BIOPOLYMERS AS A DELIVERY SYSTEM AGAINST PERIODONTOGENIC MICROORGANISMS.
- D5 : ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF ORIGANUM COMPACTUM ESSENTIAL OIL.

**1. Nouveauté (N) :**

Le document D1 a pour objet une composition orale ayant un effet bactéricide et bactériostatique et qui peut être utilisé dans les maladies parodontales. Cette composition orale contient des huiles essentielles extraites de (*Cymbopogon martinii*), (*Cymbopogon winterianus*) et (*Cymbopogon flexuosus*). Le document décrit une forte inhibition de la croissance d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* par l'huile essentielle de *Cymbopogon martinii* (exemple 2).

D2 dévoile l'effet antibactérien d'extrait de la menthe pouliot contre plusieurs types de bactérie pathogènes gram négatif ne comprenant pas l'espèce *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Le document D3 divulgue l'effet antibactérien de l'essence de Néroli extraite à partir de *Citrus Aurantium* contre plusieurs types de bactérie pathogènes gram négatif ne comprenant pas l'espèce *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

D5 a pour objet une étude de la composition chimique et l'analyse des huiles essentielles de l'*Origanum compactum*, l'étude porte aussi sur l'activité antibactérienne in vitro.

Aucun des documents ci-dessus ne divulgue une composition de mélange d'huile essentielle de menthe pouliot, Citronelle de Bigaradier, Palmarosa, Thym et de l'Origan pour son utilisation contre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clone JP2.

Par conséquent l'objet des revendications 1-3 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 décrit une composition orale de plusieurs plantes contenant les huiles essentielles extraites de *Cymbopogon martinii*, les essences ont montrés une forte inhibition de la croissance d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (exemple 2), et alors une éventuelle utilisation dans les maladies parodontales.

L'objet de la présente demande diffère de D1 en ce qu'il a pour objet une composition pharmaceutique contenant en plus de l'huile essentielle de Plamarosa celui de menthe pouliot, Citronelle de Bigaradier, Thym et de l'Origan.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme la fourniture d'une composition pharmaceutique à base des huiles essentielles de menthe pouliot, Citronelle de Bigaradier, Palmarosa, Thym, et d'Origan, pour une utilisation dans le traitement des maladies parodontites agressives causées par l'A. *Actinomycetemcomitans* clone JP2.

la solution apportée par la présente demande semble non évidente pour l'homme de métier à l'égard de l'art antérieur pour les raisons suivantes :

l'utilisation d'extraits de Citronelle, Menthe Pouliot, *thymus vulgaris* indépendamment contre A. *Actinomycetemcomitans* est connue de D1, D2 et D4, mais l'utilisation de la composition contre A. *Actinomycetemcomitans* clone JP2 pour le traitement de la parodontite avec les proportions telles que décrites dans la revendication 1 n'est pas décrite dans l'art antérieur. L'homme du métier n'aurait pas arrivé à cette solution d'une manière évidente.

L'activité antibactérienne contre l'A *Actinomycetemcomitans* clone JP2 est démontrée dans la page 6.

Par conséquent, Les revendications 1-3 de la présente demande impliquent 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.