

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication :
MA 38023 A1

(51) Cl. internationale :
A61K 36/00

(43) Date de publication :
30.11.2016

(21) N° Dépôt :
38023

(22) Date de Dépôt :
21.04.2015

(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) :
FARDI Bouchra ; Y.Cherrah ; k.Allaoui

(74) Mandataire :
KARTIT ZAID

(54) Titre : **LES EXTRAIT DES GRAINES DE DELPHINIUM STAPHYSAGRIA
(RENONCULACEAE) A ACTIVITE ANTIFONGIQUE SUR LES DERMATOPHYTES**

(57) Abrégé : **LES EXTRAIT DES GRAINES DE DELPHINIUM STAPHYSAGRIA
(RENONCULACEAE) A ACTIVITE ANTIFONGIQUE SUR LES DERMATOPHYTES**

Abregé

Un intérêt croissant pour les plantes médicinales comme alternative aux molécules de synthèse se développe actuellement, même s'il n'existe pas pour le moment de médicament d'origine végétale ou qui en soit directement inspiré. Cette recherche de substances biologiquement actives contre les infections fongiques a encouragé l'étude et l'utilisation des extraits de plante en particulier des huiles essentielles **des graines de *Delphinium staphysagria***

Titre : Les extraits des graines de *Delphinium staphysagria* (Renonculaceae) à activité antifongique sur les dermatophytes

Descriptif

La staphysaigre, *Delphinium staphysagria* DS (Renonculaceae) est signalée au Maroc dans le Rif et la péninsule tingitane. Elle pousse spontanément dans les forêts et les broussailles fraîches de la plaine et les basses montagnes méditerranéennes. Les données traditionnelles rapportent que les graines de *Delphinium Staphysagria* sont surtout utilisés contre la chute des cheveux et contre les poux. Sur le plan pharmacologique, des travaux ont rapporté l'activité anti-inflammatoire et l'activité analgésique centrale et périphérique des extraits éthanolique et alcaloïdique des graines de DS ; L'étude de la toxicité aigue par voie orale des graines de DS témoigne d'une faible toxicité. Les graines de DS contiennent, en plus des flavonoïdes et des hétérosides dianthramidiques, une fraction importante d'alcaloïdes. L'étude phytochimique réalisée par Diaz et al sur l'espèce marocaine DS a montré l'existence d'alcaloïdes diterpénoïdes (MDL).

Près de 90 % des mycoses humaines sont provoquées par des espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton*. Les champignons et les levures causent de graves pathologies atteignant l'homme, parmi lesquelles on peut citer les mycotoxicoses (genres *Aspergillus*, *Fusarium*), les mycoallergies (genres *Penicillium*, *Mucor*) et les mycoses superficielles ou profondes (*Candida albicans*, *Microsporum*, *Trichophyton*).

Les mycoses ont augmenté de manière drastique au cours de la dernière décennie et se classent au quatrième rang des infections nosocomiales [10].

La recherche de nouveaux médicaments d'origine naturelle à action antifongique constitue un axe important de recherche au niveau mondial ; malgré la découverte des processus de synthèse organique l'activité antifongique des plantes médicinales été confirmée par de nombreux auteurs. Contrairement au grand nombre d'antibiotiques et malgré d'importants progrès, la gamme d'antifongiques disponibles reste limitée à un petit nombre de produits. En effet, il n'existe à ce jour que trois classes d'antifongiques : les polyènes, les dérivés pyrimidiques et les dérivés azotés En raison des nombreux cas d'effets secondaires indésirables, de contre-indications et d'échec thérapeutique reportés suite à l'usage de nombreux antifongiques utilisés actuellement, un besoin urgent de nouveaux agents est nécessaire. C'est dans cette optique que depuis un certain nombre d'année, des efforts ont été consentis sur les plantes médicinales, en vue de découvrir de nouveaux médicaments.

Dans le but d'apporter notre contribution à la lutte contre les mycoses opportunistes, Nous nous sommes donc intéressés à rechercher l'activité antifongique des extraits Aqueux, éthanolique, alcaloïdique et Huile essentielle des graines de l'espèce marocaine DS. Notre étude a pour but d'évaluer l'effet des graines sur la croissance des champignons. L'étude de l'activité antifongique

montre que presque tous les extraits possèdent une activité inhibitrice sur les dermatophytes et sont sans effet sur *Candida albicans* et *Aspergillus niger* sauf pour l'huile essentielle.

Les alcaloïdes étant des molécules possédant des propriétés biologiques très intéressantes nous nous sommes consacrés à leur extraction dans le but d'évaluer leur activité pharmacologique. En effet les alcaloïdes possèdent plusieurs applications pharmaceutiques chez l'Homme, ces applications ont été prouvées cliniquement. Les alcaloïdes de l'Aconit et de Delphinium sont d'un grand intérêt pour le développement de nouvelles préparations médicinales, car ces composés sont connus pour posséder diverses activités biologiques et pharmacologiques.

Matériels et méthodes

1 – Matériel végétal

A partir de la poudre obtenue après broyage, nous avons préparé l'extrait total aqueux (Eaq), l'extrait éthanolique 80% (Eeth) et l'extrait alcaloïdique (Ealc).

1 – 2 Matériel biologique

Les souches *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton Mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* sur les quelles nous avons travaillé, nous a été fournie par le Laboratoire de Mycologie de l'Hopital Avicenne Rabat.

L'ensemencement s'est fait sur la gélose de Sabouraud pour les Dermatophytes. Sabouraud Chloromphenicol pour *Candida* et Sabouraud Actidione pour *Aspergillus*.

2 - Méthodes

2- 1 Préparation des extraits

Les extraits totaux aqueux, éthanolique 80% et alcaloïdique ont été préparés selon la méthode décrite par Diaz et *al* (2000).

Extrait aqueux

L'extrait total aqueux est préparé à partir des graines pulvérisées (250 g) macérés dans un (0.5l) litre d'eau distillée puis homogénéisés sous agitation magnétique pendant 24 heures à T ambiante à l'aide d'un agitateur magnétique. L'homogénat obtenu est filtré successivement deux fois sur du coton hydrophile puis sur du papier wattman 3mm. Le filtrat obtenu est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. La pâte résultante est lyophilisée.

Extrait éthanolique

L'extrait éthanolique est obtenu par macération à froid. 250 g de graines de DS sont mis à macérer à l'abri de lumière dans l'éthanol 80% pendant 24h sous agitation. L'extrait est filtré et concentré sous pression réduite à 50°C ; le résidu sec obtenu est ensuite placé au dessiccateur afin d'éliminer totalement toute trace de solvant, puis l'extrait éthanolique est réservé à -4°C.

Extrait alcaloïdique

Le changement de pH permet de purifier l'extrait alcaloïdique. L'extrait éthanolique est repris par l'acide sulfurique 0.5 M, les alcaloïdes se solubilisent sous forme de sels dans la

phase aqueuse et sont alcalinisées par une base, NaOH 20%, l'extraction se fait par le dichlorométhane [11,12].

Ces différents extraits ont été testés sur la croissance *in vitro* de trois souches de dermatophytes, une souche moisissure et une souche levuriformes.

2 -2 Évaluation de l'activité antifongique

L'étude de l'activité antifongique est réalisée par la technique de diffusion en gélose décrite par Grange et Davery. Deux millilitre de chaque extrait de la plante est ajouté à 18 mL de gélose de Sabouraud (Becton Dickinson, Royaume-uni) maintenu à 45 °C. Le milieu Agar Sabouraud est préparé en dissolvant 42 g de gélose en poudre dans 1 litre d'eau distillée. Ce mélange est porté à ébullition et agité par un agitateur magnétique chauffant. Nous avons reparti le milieu dans des tubes à essai (6 cm de long et 2 cm de diamètre) à raison de 18 mL dans le tube. Les tubes préparés sont stérilisés à 121°C à l'autoclave. L'incorporation est réalisée pendant que la gélose est à l'état liquide selon la méthode de la double dilution. Une dilution verticale qui permet d'obtenir une solution à 1/2 à partir de la solution mère et une dilution horizontale qui permet d'obtenir des concentrations finales dans les milieux de culture (boîte de pétrie) à partir de la dilution verticale qui nous a permis d'obtenir une variation de concentration de graines de *Delphinium staphysagria* allant de 1000 µg /mL dans le tube n°19 à 0,01 µg /mL dans le tube n°1 (avec des dilutions au 1/2). Le mélange est ensuite versé dans des boîtes de Pétri, ces dernières sont séchées pendant 15 minutes à 37 °C. Cent microlitres de la suspension de microorganismes à 10⁵ conidies/mL pour les moisissures et 10⁶ cellules/mL pour les levures, sont ensemencés par inondation en surface de la gélose nutritive. Les boîtes de pétri sont incubées à 30 °C pendant 48 heures pour les levures et 72 heures pour les moisissures. Les cultures sont considérées positives s'il existe une croissance fongique visible à l'œil nu. L'ensemencement des dermatophytes se fait par dépôt d'un disque mycélien au centre de la boîte de Pétri. Avec cette approche, il est possible de lire la concentration inhibitrice minimale (CIM, exprimée en µg/ml) déterminée par une absence totale de croissance du champignon. Les témoins négatifs ont été préparés en ajoutant des souches testées aux milieux adéquats sans inhibiteur. La Griséofulvine est utilisée comme référence pour l'ensemble des dermatophytes testées, le fluconazole pour les levures. Avant d'évaluer l'activité antifongique des extraits, la toxicité du solvant peut également être critique. A cet effet, nous avons testé (test control) l'innocuité du DMSO (diméthyl sulfoxyde) utilisé à la place de l'éthanol pour solubiliser les fractions sèches de *delphinium staphisagria*. Cette substitution de solvant est basée sur les travaux précédents indiquant l'effet positif de l'éthanol sur la croissance de certaines souches fongiques. Toutes les expériences sont réalisées en duplicata pour vérifier la reproductibilité des résultats.

Les extraits sont préparés avec une concentration de départ de 1000 µg/mL, ces extraits sont considérés actifs pour des valeurs de CIM inférieures ou égales à 1000 µg/mL (Svetaz et al. 2010). Les souches

sont réparties en trois groupes: une espèce du genre *Candida*, une des causes les plus importantes des mycoses superficielles et systémiques dans les zones tropicales, des champignons filamenteux responsables des teignes (*Trichophyton* spp. et *Microsporum* spp.) aussi bien dans les régions tempérées qu'en milieu tropical (Hay, 2006; Warnock, 2007), et l'espèce *Aspergillus niger*.

2-3 Analyse des alcaloïdes par chromatographie liquide haute performance HPLC

Les analyses ont été faites sur un système de chromatographie liquide ultra performance couplé à un spectromètre de masse à triple quadripôles (UPLC-TQD, Waters). Le système est piloté par le Logiciel MassLynx 4.1.

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- Colonne : ACQUITY UPLC® HSS C18 1.8 µm 2.1 x 150 mm.
- Température colonne : 45 °C
- Volume injection : 10 µL
- Débit : 450 µL/min
- Phase mobile A : H₂O avec 1% d'acide formique (v/v)
- Phase mobile B : ACN avec 1% d'acide formique (v/v)
- Gradient :

100 de A jusqu'à 8 min

100 de B jusqu'à 12 min

100 de A jusqu'à 12.5 min

100 de A jusqu'à 15 min

Les réglages du spectromètre de masse :

- Système: UPLC-MS-MS (TQD ; Waters)
- Mode d'ionisation : ESI+ et ESI – à deux tensions de cône 30 et 50 V.
- Tension de capillaire : 3.0 kV
- Température de la source : 150 °C
- Température de désolvatation : 400°C
- Débit de gaz de désolvatation : 800 L/h
- Méthode : Full Scan de 50 à 850 m/z.

2.4 Analyse des huiles essentielles des graines de DS par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG-MS est réalisée sur un Polaris Q couplé à un piège TRACE GC Ultra/ MS. Une colonne VB-5 (95% di methyl polysiloxane, 5% diphenyl) (épaisseur de film de 30 m X 0,25 mm X de 0,25 µm) a été utilisée comme phase stationnaire. L'hélium est le gaz porteur à débit 1,4 ml / min. La température a été programmé à partir de 40 ° à 300 ° C à 5 ° C / taux de rampe de min. L'injecteur et la température de l'interface GC-MS ont été maintenus à 220 ° et 300 ° C, respectivement. Les spectres de masse ont été enregistrés sur 40-400 gamme de amu à une travée / s avec 70 eV l'énergie d'ionisation mode EI. La source d'ions et de la température du détecteur est maintenue à 200 ° C et 300 ° C, respectivement. Les échantillons ont été injectés avec un rapport 01:50 de fractionnement. Les composés ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention et les spectres de masse avec ceux obtenus à partir des échantillons authentiques.

Résultats

1. Activité antifongique de l'extrait éthanolique, alcaloïdique, aqueux et HE

Les résultats de la méthode de dilution en gélose sont présentés dans le (Tableau 2) montrent que presque tous les extraits possèdent une activité inhibitrice sur les dermatophytes et sont sans effet sur *Candida albicans* et *Aspergillus niger* sauf pour l'huile essentielle. Dans le cas des champignons, nous remarquons que l'extrait éthanolique est plus actif ; (CMI sont de l'ordre de 0.12 µg /mL à 0.24 µg /mL), l'extrait alcaloïdique (CMI sont de 0.12 µg /mL à 0.97µg /mL et l'extrait aqueux (CMI vont de 0.48µg /mL à 1.95µg /mL). L'extrait éthanolique est le plus efficace contre les dermatophytes (Tableau 22) en comparant l'action des extraits éthanolique, alcaloïdique et aqueux avec la griséofulvine. Le résultat obtenu sur les dermatophytes (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*) est intéressant, car très proche de celui pour la griséofulvine antifongique de référence (0.48 µg/mL); De même, il a été démontré que les valeurs de CMI obtenues à partir d'inocula réalisés à partir de conidies pour les moisissures et de cellule pour les levures sont supérieures à 1000 µg/mL ce qui indique une résistance des espèces *Candida albicans* et *Aspergillus niger* pour les extraits de DS, pour l'huile essentielle nous retenons que les CMI pour *M.canis*, *T. mentagrophytes* et *T. rubrum* sont plus élevées par rapport à la griséofulvine, l'huile essentielle testée nécessite des concentrations plus élevées pour obtenir le même effet sur *M.canis*, *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* avec la griséofulvine. Selon leur susceptibilité vis-à-vis de la griséofulvine, les CMI sur les dermatophytes étudiées se présentent comme suit 1.95 µg /mL pour *T.mentagrophytes* ; 0.97 µg /mL pour *T.rubrum* ; 0.48 µg /mL pour *M.canis* ; 1.95 µg /mL pour *Candida albicans* ; 3.9 µg /mL pour *Aspergillus niger*.

La valeur de la CMI dépend de nombreux facteurs: virulence de la souche, quantité d'inoculum, composition et pH du milieu, température, durée d'incubation, et du solvant dans lequel le produit est dilué. Les résultats sont lus au deuxième jour d'incubation pour les levures et au cinquième jour d'incubation pour les champignons filamenteux pour garantir la reproductibilité des résultats. Certains auteurs soulignent pour certaines souches, que les résultats dépendent de la date de lecture (White et al. 1998). Concernant l'interaction souches extrait, nous remarquons que vis-à-vis des dermatophytes, l'extrait éthanolique est plus actif, que l'extrait aqueux et alcaloïdique. Les phénomènes de résistance in vitro de certaines souches peuvent être soit d'origine intrinsèque, la résistance étant inhérente à l'espèce et se développe au cours de l'évolution de la souche, soit d'origine acquise, lorsque la résistance émerge d'une population autrefois sensible au traitement

(White et al. 1998). Le cas d'*Aspergillus niger* et *Candida albicans* qui sont résistants pour les extraits alcaloïdiques, éthanoliques et aqueux.

La résistance peut se définir soit comme un phénomène in vitro lié à l'augmentation de la CMI soit comme un phénomène de persistance ou la progression d'une infection en dépit d'une thérapie antimicrobienne appropriée. Entre ces deux phénomènes interviennent en particulier l'état immunitaire

de l'hôte et la biodisponibilité du traitement (White et al. 1998). Les phénomènes de résistance in vitro de certaines souches peuvent être soit d'origine intrinsèque, la résistance étant inhérente à l'espèce et se développe au cours de l'évolution de la souche, soit d'origine acquise, lorsque la résistance émerge d'une population autrefois sensible au traitement

(White et al. 1998). Le cas d'*Aspergillus niger* et *Candida albicans* qui sont résistants pour les extraits alcaloïdiques, éthanoliques et aqueux

Les résultats sont lus au deuxième jour d'incubation pour les levures et au cinquième jour d'incubation pour les champignons filamenteux pour garantir la reproductibilité des résultats. Certains auteurs soulignent pour certaines souches, que les résultats dépendent de la date de lecture (White et al. 1998). Concernant l'interaction souches extrait, nous remarquons que vis-à-vis des dermatophytes, l'extrait éthanolique est plus actif, que l'extrait aqueux et alcaloïdique.

La griséofulvine est un traitement de choix dans le cas des infections à *Trichophyton* (*tinea capitis*) ou des mycoses des pieds dues à *T. mentagrophytes* ou *T. rubrum*. Elle agit en inhibant la synthèse des acides nucléiques, bloquant la mitose et empêchant la synthèse des parois cellulaires (Elewski, 1998). Son efficacité pour le traitement des infections dues à des dermatophytes vient du fait qu'elle s'accumule dans la kératine. Le fait que l'huile essentielle, est plus actif sur les *Aspergillus niger* et *Candida albicans*, champignons dermatophytes, plaide en faveur de l'existence de phénomènes de synergie expliquant les propriétés biologiques observées pour l'huile essentielle des graines de DS pour ces deux souches.

2. Analyse phytochimique des extraits des graines de *Delphinium staphysagria*

2.1. Composition en alcaloïdes

L'analyse chromatographique par HPLC-MS nous a permis d'identifier quelques alcaloïdes caractérisant les graines de DS, à voir le Staphidine, Staphimine, Delphinine Delphidine, Izoazitine et Oxodihydroazetine. Ces composés possédant plusieurs activités : Antioxydant, antiviraux et anticancéreux.

Ces résultats concordent avec ceux trouvés par (Diaz 2000). Les études phytochimiques réalisées par Jacobs basées sur l'application de la résonance magnétique nucléaire du ^{13}C et ^1H , montrent que la staphisine est un diterpène alcaloïde de DS de formule moléculaire $\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}$.

Les essais de séparation de la staphisine par cristallisation dans le nitrate, hydrochloride et les sels hydrobromides ont prouvé que la staphisine de Jacobs et Craig est un mélange de staphisine avec un autre élément non méthoxyl, portant un alcaloïde nommé staphidine ($\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}$). En plus, Jacobs et

Craig ont isolé deux nouvelles amines contenant le bis diterpène alcaloïde nommé staphinine ($C_{42}H_{56}N_2O_2$) et staphimine ($C_{41}H_{54}N_2O$). Ils ont considéré que la staphinine et la staphimine sont des précurseurs biogénétiques de staphisine et staphydine respectivement (Pelletier, 1976)

Au cours de l'isolement de la dephinine à partir des graines de DS, Jacobs et Craig ont trouvé une fraction d'alcaloïdes relativement large (Pelletier S. W.1977). Ils ont établi la structure du diterpène alcaloïde qui est la delphisine et un autre nouvel alcaloïde diterpénoid appelé delphidine C_{19} -diterpénoid alcaloïde ($C_{26}H_{41}NO_7$). En se basant sur les spectres (IR et 1H RMN), ce nouvel alcaloïde est similaire à delphisine. De nouveaux alcaloïdes ont été isolés de l'espèce DS Marocaine par (Diaz et al, 2000)

2.2 La composition de l'huile essentielle des graines de *Delphinium staphysagria*

Les HE sont des mélanges complexes et variés, constitués de composés organiques de structures et de fonctions chimiques très diverses.

L'huile essentielle de DS de couleur jaunâtre, a été obtenue par hydrodistillation avec un rendement d'extraction de 0.41%. La couleur est fortement influencée par la nature du mélange complexe des constituants de l'huile. Les résultats regroupés dans (le tableau 17), montrent que l'huile essentielle de DS est marquée par la présence de l'eugénol 25.94%. Des résultats comparables aux nôtres ont été obtenus par d'autres auteurs (Ladislav Kokoska et al. 2012). L'eugénol et le cinnamalehyde, extraits à partir d'HE du *Cinnamum*, comptent parmi les principaux agents de conservation alimentaire, d'origine végétale. Ils sont employés comme additifs pour la préservation des olives de table contre la flore cryptogamique.

Plusieurs travaux ont montré que les HE de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxinogénèse de plusieurs bactéries et champignons, ce qui nous emmène à tester HE des graines de DS sur la croissance des champignons.

L'eugénol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phénol), produit dérivé du clou de girofle (*Eugenia aromatica*), fut tout d'abord utilisé en application topique à des fins d'analgésie dentaire. Il produit également une anesthésie chirurgicale lorsque administré en immersion chez les poissons. L'eugénol agit sur les récepteurs vanilloïdes, sensibles à la chaleur, aux protons et à certaines molécules lipidiques. Ces récepteurs jouent un rôle important dans le mécanisme de l'inflammation et de l'hyperalgésie. L'eugénol pourrait également produire ses effets par

Figure et Tableau

Tableau 1: Rendement des extraits des graines de DS

Tableau 2 : Activité antifongique des extraits des graines de *Delphinium Staphysagria*

Tableau 3 : Composition chimique des huiles essentielles des graines de DS

Revendications :

1. Les extraits des graines de *Delphinium staphysagria* (Renonculaceae) à activité antifongique sur les dermatophytes caractérisé en ce que

- L'extrait éthanolique est actif à 0.12 µg /mL à 0.24 µg /mL,
- L'extrait alcaloïdique est actif à 0.12 µg /mL à 0.97µg /mL et
- L'extrait aqueux est actif à 0.48µg /mL à 1.95µg /mL.

2. Les extraits selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'ils possèdent une activité inhibitrice sur les dermatophytes : *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton Mentagrophytes*, *Microsporum canis* ;

ANNEXES

Espèce	Extraits	(%) rendement
<i>Delphinium staphysagria</i> (DS)	Extrait éthanolique	5,58
	Extrait alcaloïdique	2,14
	Extrait aqueux	15.22
	Huile essentielle	0.41

Tableau 2 : Activité antifongique des extraits des graines de *Delphinium Staphysagria*

	Levures		Moisissures		Dermatophytes	
	<i>C.albicans</i>	<i>Aspergillus.niger</i>	<i>M.canis</i>	<i>T.rubrum</i>	<i>T.menta</i>	
EA	NE	NE	0.48	0.48	0.97	
EE	NE	NE	0.12	0.12	0.24	
EAq	NE	NE	0.48	1.25	1.25	
HE	1.95	3.9	0.48	0.97	1.95	
Fluconazol	0.97	1.25	NT	NT	NT	
Griseo	NT	NT	0.48	0.97	1.25	

Tableau 3 : Composition chimique des huiles essentielles des graines de DS

Composés	Temps de rétention	Pourcentage
Di (2-phtylenyl)phtalate	49.86	54.56
Acide palmitique	42.06	14.57
Docosane	43.04	4.53
Eugenol	25.13	25.94
Phenyl2, 4-bis1, 1dimethylethyl	30.07	18.26
Tricosane	47.56	9.23
Acide oleique	49.69	9.21
Hexadecane	15.23	5.91
Eicosane	30.90	4.5

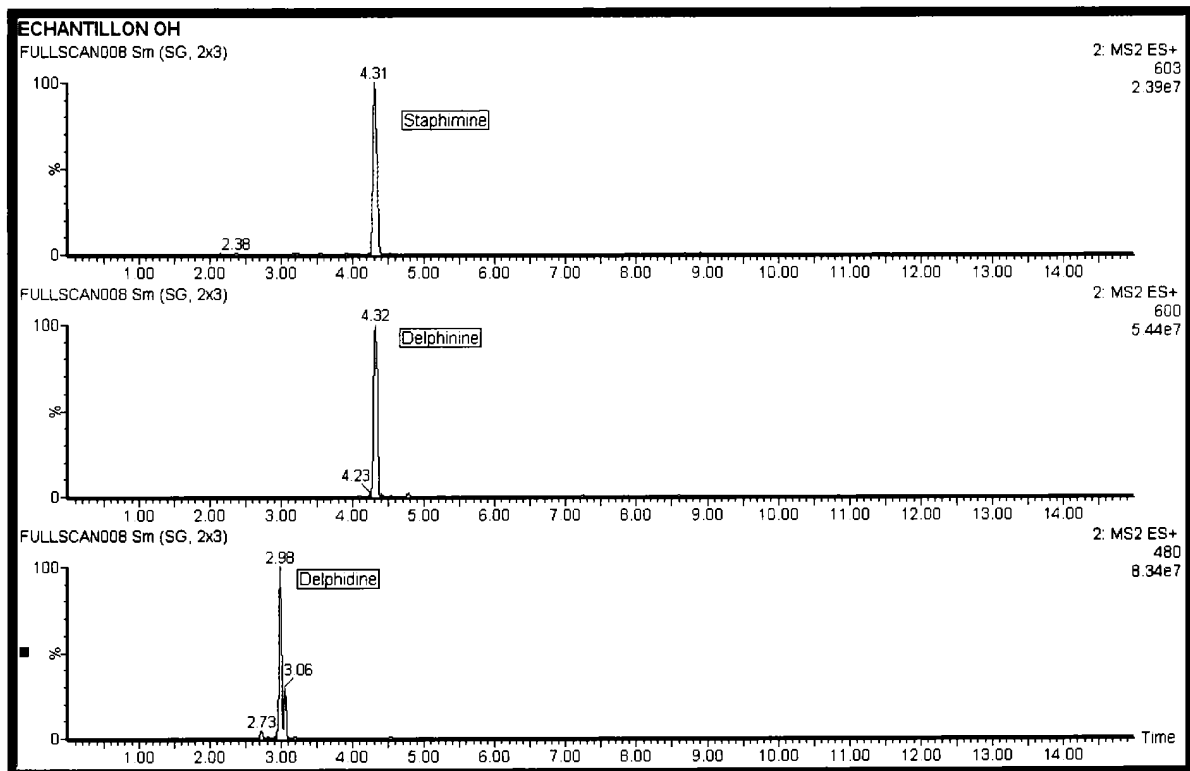
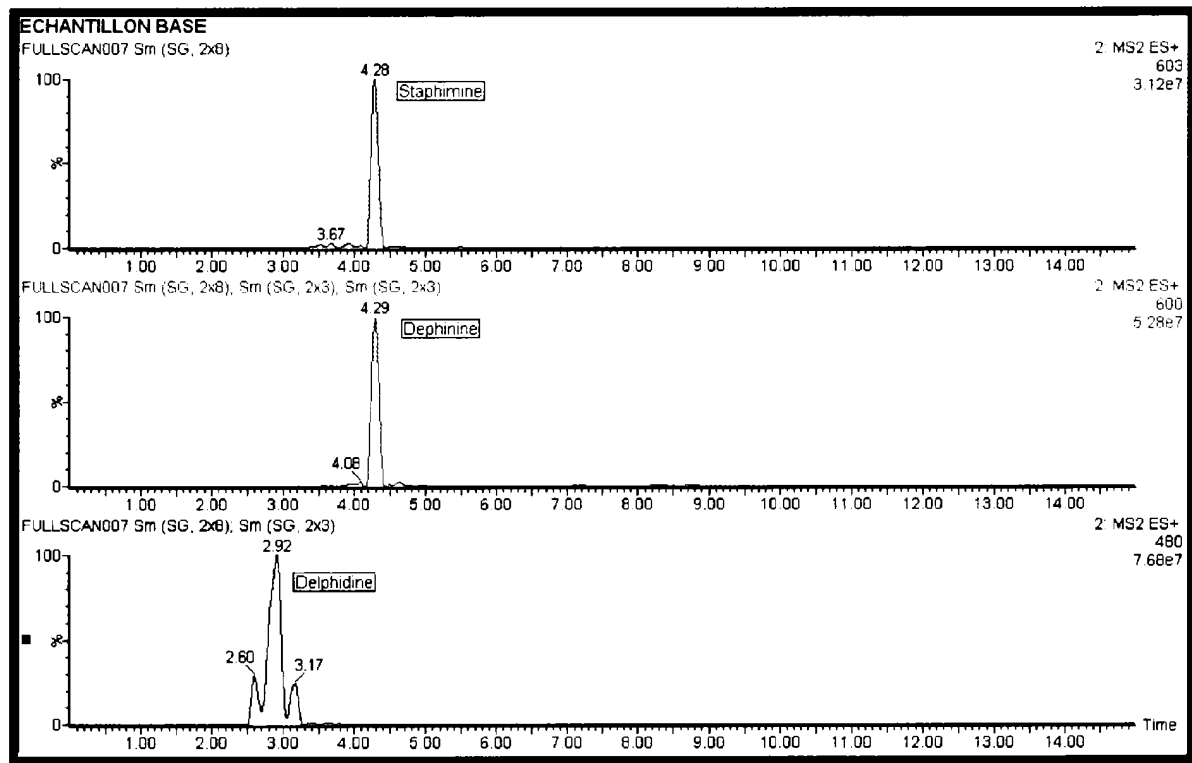
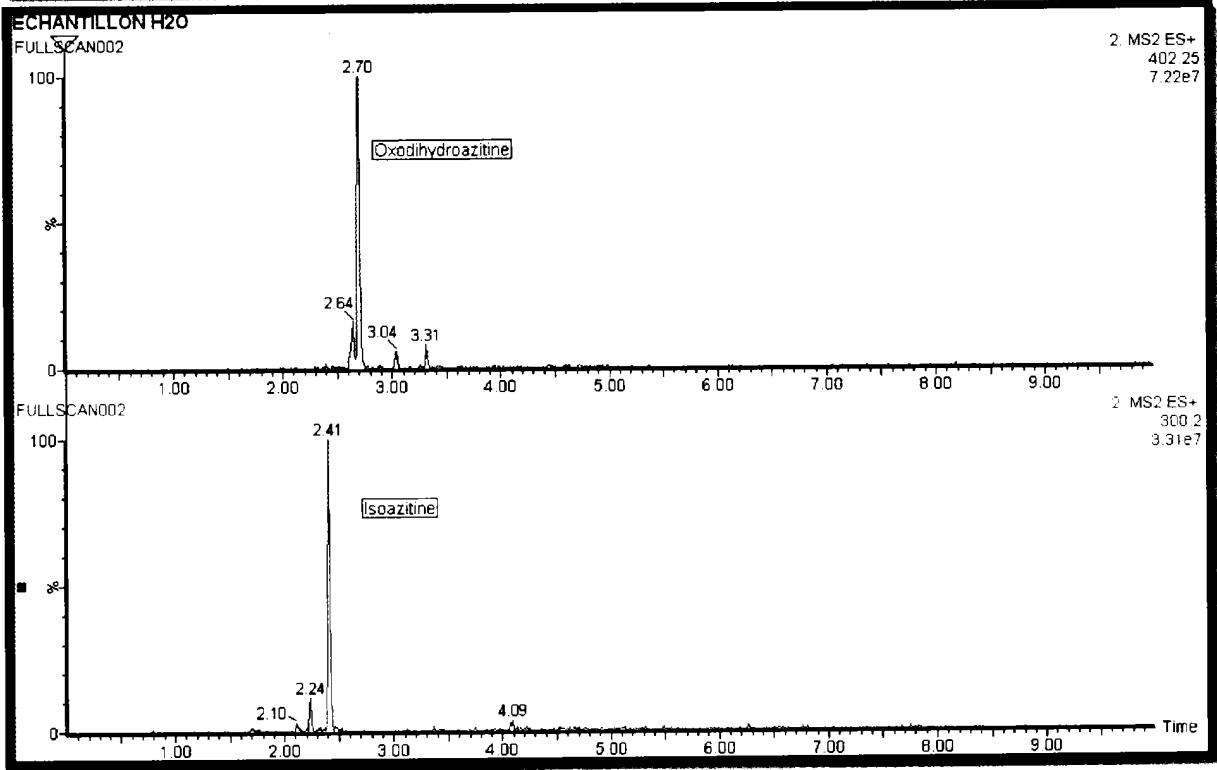
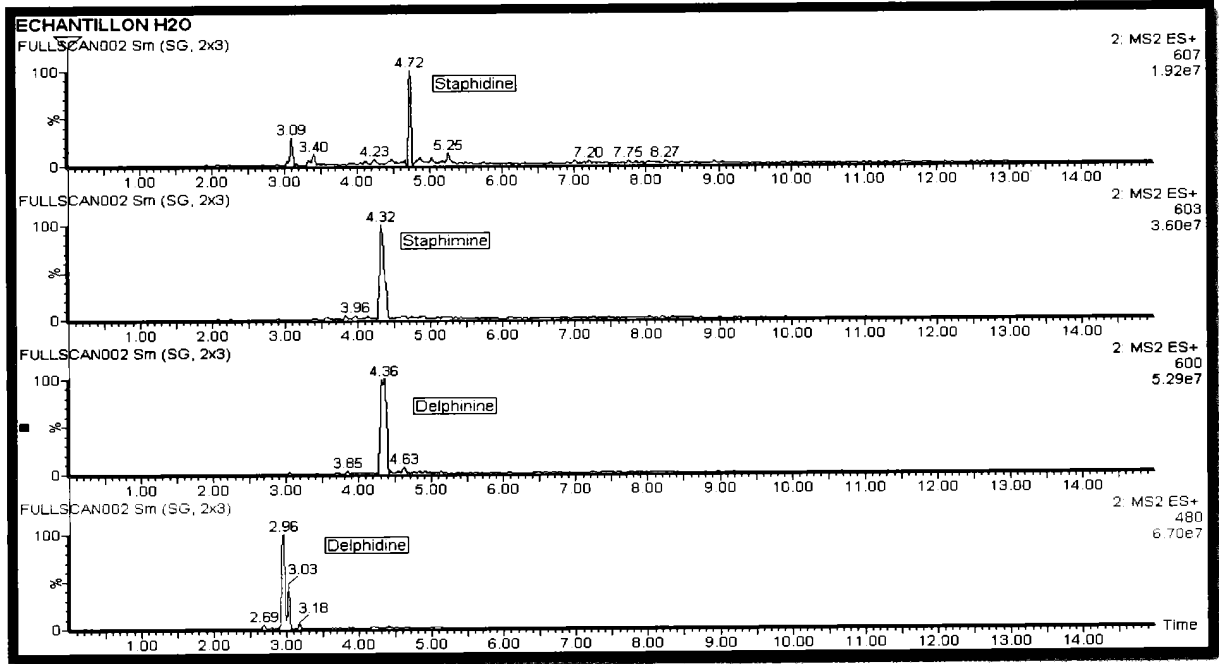


Figure 27 (suite) : Analyse chromatographique par HPLC/MS des extraits de graines de *Delphinium staphysagria* pour chaque extrait est notée: Le mode d'ion electrospray positif, Ion MH de la molécule extraite, L'intensité du signal.





**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 : 38023	Date d'entrée en phase nationale : 21/04/2015
Déposant : UNIVERSITÉ MOHAMMED V DE RABAT	
Intitulé de l'invention : LES EXTRAITS DES GRAINES DE DELPHINIUM STAPHYSAGRIA (RENONCULACEAE) A ACTIVITE ANTIFONGIQUE SUR LES DERMATOPHYTES	
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 brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site http://worldwide.espacenet.com , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
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 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: S.BENCHEKROUN	Date d'établissement du rapport : 13/05/2015
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	

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 :		
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Description</u> 8 Pages • <u>Revendications</u> 2 • <u>Planches de dessin</u> 2 		
Partie 2 : Rapport de recherche		
Classement de l'objet de la demande :		
CIB : A61K36/00, A61K36/71, A61P31/00, A61P31/10		
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	Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de divers extraits de <i>Nigella sativa</i> et de son composant principal, le thym quinone, contre des dermatophytes pathogène 20/09/2013, H. Mahmoudvand, A. Sepahvand S. Jahanbakhsh, B. Ezatpour, S.A. Ayatollahi Mousavi	1-2
A	CN102228523 ; NANJING ZELANG AGRI DEV; 02/11/2011	1-2
*Catégories spéciales de documents cités :		
<p>-« 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</p> <p>-« 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</p> <p>-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>-« 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</p> <p>-« 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</p>		

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité*Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle*

Nouveauté (N)	Revendications 1-2 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1-2 Revendications aucune	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-2 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 : Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de divers extraits de *Nigella sativa* et de son composant principal, le thym quinone, contre des dermatophytes pathogène

1. Nouveauté (N) :

Aucun des documents ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques des revendications 1-2, d'où l'objet desdites revendications est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive (AI) :

Le document D1 qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 décrit l'activité antifongique de l'huile essentielle de divers extraits de *Nigella Sativa* (appartenant à la famille Renonculacée) et de son principe actif le thymoquinone. Après extraction de l'huile essentielle et l'analyse par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse en phase gazeuse (GC/MS), les divers extraits de *N. Sativa* surtout thymoquinone ont montrés des effets antifongiques sur *T. mentagrophytes*, *M. canis* et *M. gypseum*, souches de dermatophytes pathogènes.

Par conséquent l'objet de la revendication 1 diffère de D1 par la plante utilisée qui est *delphinium staphysagia*.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme la fourniture d'extrait des graines de *Delphinium staphysagia* a activité antifongique sur les dermatophytes.

La solution proposée par le déposant est considérée inventive puisqu'il n'y a aucune incitation dans l'art antérieur, et qu'il n'est pas évident pour l'homme du métier, que l'utilisation de l'extrait de plante en particulier des huiles essentielles des graines de *delphinium staphysagia* montre une activité inhibitrice sur les dermatophytes.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-2 implique une 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