

## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 52102 B2** (51) Cl. internationale : **C12Q 1/18; G01N 1/28; C12Q 1/18; G01N 1/28**
- (43) Date de publication : **30.11.2022**

- 
- (21) N° Dépôt : **52102**
- (22) Date de Dépôt : **08.01.2021**
- (71) Demandeur(s) : **OULED TAARABT KAMAL, BP : 8090 - 40160, MARRAKECH MARRAKECH (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **OULED TAARABT KAMAL**
- (74) Mandataire : **OULED TAARABT KAMAL**

- 
- (54) Titre : **Méthode pour la préparation des disques de l'aromatogramme.**
- (57) Abrégé : La présente invention décrit un mode opératoire novateur pour la préparation des disques de l'aromatogramme. Les disques obtenus ont une charge précise et leur utilisation lors d'un aromatoigramme conduit à des zones d'inhibition circulaires. Un disque de concentration précise et une zone d'inhibition mesurable reflète un aromatoigramme de qualité, crédible et reproductible.

*Abrégé*

La présente invention décrit un mode opératoire novateur pour la préparation des disques de l'aromatogramme. Les disques obtenus ont une charge précise et leur utilisation lors d'un aromatoigramme conduit à des zones d'inhibition circulaires. Un disque de concentration précise et une zone d'inhibition mesurable reflète un aromatoigramme de qualité, crédible et reproductible.

## **Un mode opératoire novateur pour la préparation des disques de l'aromatogramme**

### ***Domaine technique***

La présente invention se rapporte à un mode opératoire novateur pour la préparation des disques de l'aromatogramme, une étape délicate et très critique lors de la réalisation d'un aromatoigramme.

La présente invention se rapporte au perfectionnement d'un mode opératoire d'une étape d'une technique essentielle de détermination rapide de la sensibilité d'un microorganisme à un antimicrobien naturel (huile essentielle, essence ou extrait).

La présente invention trouve une application notamment dans les domaines analytiques, de la recherche biologique, microbiologique, dans le domaine biotechnologique, pharmaceutique, cosmétiques, compléments alimentaires, biocides, dispositifs médicaux, dans le domaine aroma-thérapeutique et/ou dans le domaine biomédical.

### ***Etat de la technique***

Les aromatoigrammes sont des tests permettant de déterminer la sensibilité d'un microorganisme à une huile essentielle. Cette détermination est en général réalisée pour des microorganismes pathogènes.

Conventionnellement, lors de l'étude de l'activité antimicrobienne d'un extrait naturel, nous faisons appel en premier lieu à la technique de l'aromatogramme. C'est donc l'une des méthodes les plus utilisées en routine pour la détermination de la sensibilité des microbes aux extraits naturels.

Inspirée d'une technique utilisée en microbiologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques, l'aromatogramme utilise les huiles essentielles à la place des antibiotiques lors d'imprégnation des disques. Ce fut, les disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée de l'huile essentielle testée sont déposés à la surface d'un milieu adéquat préalablement ensemencé avec un inoculum calibré d'une culture pure du germe à étudier. Après incubation, les boîtes de pétri sont examinées et les zones d'inhibition entourant les disques sont mesurées et interprétées.

En général, un aromatoigramme suit l'ordre des étapes suivantes : préparation du milieu gélosé, préparation de l'inoculum microbien, inoculation des géloses, préparation et dépôt des disques, incubation des boîtes de pétri et finalement mesure des zones d'inhibition après incubation et lecture de résultats.

La présente invention a pour objet la mise au point d'un nouveau mode opératoire pour améliorer la préparation des disques de l'aromatogramme. Il existe dans l'art antérieur deux modes opératoires classiques. Le premier consiste à verser un volume précis d'huile essentielle testée sur le disque avant de l'insérer à l'aide d'une pince dans la boîte de pétri. Le problème qui existait était lorsque nous voulons imprégner les disques, il y a constamment un excédent d'huile essentielle qui déborde en surface et/ou qui reste collé à la pince à cause du volume de départ utilisé (généralement 2 à 15  $\mu\text{L}$ ) qui dépasse largement la capacité d'imprégnation du disque, ce qui rend la charge de ce dernier imprécise.

Le deuxième mode opératoire consiste à insérer le disque vierge dans la boîte de pétri en premier et verser par la suite l'huile essentielle testée sur ce disque pour s'assurer que la

totalité du volume est dans la boîte de pétri. Le problème c'est que le disque vierge en papier a une grande affinité pour l'eau, une fois inséré sur la gélose, il va absorber immédiatement l'humidité du milieu de culture, ses fibres cellululosiques vont se gonfler et ses pores vont se fermer et l'huile essentielle versée ne va plus trouver de place sur le disque, elle va diffuser et/ou stagner selon les pentes du milieu conduisant après incubation à des zones d'inhibition irrégulières difficile à mesurer.

Ces deux modes opératoires de préparation des disques de l'aromatogramme sont mal conçus, ce qui constitue alors une source de résultats incohérents, voire erronés, malgré les prudences et les précautions prises.

Il existe donc un réel besoin de disposer d'un mode opératoire de préparation des disques de l'aromatogramme simple à mettre en œuvre, rapide, permettant une charge précise des disques en huile essentielle, et permettant de donner des zones d'inhibition circulaires faciles à mesurer palliant les problèmes précités de l'art antérieur.

### *Description de la nouveauté*

La présente invention permet de résoudre ces problèmes et inconvénients de l'état de la technique.

En particulier, la présente invention a précisément pour but de répondre aux défauts et inconvénients précités en fournissant un mode opératoire novateur facile à réaliser et ne requiert aucun matériel particulier. Il va nous permettre d'avoir des disques à petites charges précises (à l'ordre de  $\mu\text{g}$ ) avec des zones d'inhibitions circulaires. Les résultats de lecture de l'aromatogramme seront donc faciles à lire, corrects, cohérents et reproductibles.

En particulier, la présente invention a précisément pour but de répondre aux besoins et obstacles précités en fournissant un mode opératoire novateur et pratique de préparation des disques de l'aromatogramme caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

1	Choisir un papier absorbant de qualité supérieure, ultra-pure, sans additifs et neutre vis-à-vis l'huile essentielle et le germe testés ainsi que le milieu de culture.
2	Stériliser le papier à l'autoclave (ou autre), sécher (étuve ou micro-onde) jusqu'au poids constant.
3	Maintenir le papier sur un plan horizontal (ex. couvercle de boîte de pétri).
4	Déposer sans trembler (les vibrations donnent des zones de diffusion non circulaires) un volume précis $v$ (environ 2 $\mu\text{L}$ pour minimiser le temps de diffusion) d'huile essentielle à densité absolue connue $d$ sur le papier à l'aide d'une micropipette et laisser diffuser.
5	Répéter l'opération sur d'autres endroits du papier en fonction du nombre des disques requis. Les dépôts doivent être espacés pour éviter le chevauchement des zones de diffusion de l'huile essentielle.
6	Mesurer, à l'arrêt du processus de diffusion, le diamètre moyen $R$ des zones de diffusion à l'aide d'un pied à coulisse.
7	Découper les disques au centre de chaque zone de diffusion (un disque par zone de

	diffusion) à l'aide d'une perforeuse préalablement désinfectée à l'alcool éthylique. $r$ étant le diamètre du disque découpé à la perforeuse (généralement 6 mm).
8	Les disques découpés sont prêts à l'emploi immédiatement. Ils peuvent être conservés à l'abri de la lumière et de la chaleur à une température entre + 2 et + 8 °C au sec pendant 08 h au maximum. Dans ce cas, il faut ramener les disques à température ambiante (18-25°C) avant de les utiliser. Les disques mal conservés peuvent se décharger facilement conduisant à des zones d'inhibition réduites.
9	Calculer, $C_{HE}$ , la charge des disques en huile essentielle (en µg), à l'aide de la formule : $C_{HE} = (r/R)^2 \times v \times d \times 10^6$ <p>Où</p> <p><math>r</math> est le diamètre du disque découpé à la perforeuse (généralement 6 mm).</p> <p><math>R</math> est le diamètre moyen du cercle de diffusion de l'huile essentielle à l'arrêt du processus de diffusion.</p> <p><math>d</math> est la densité absolue de l'huile essentielle en g/mL.</p> <p><math>v</math> est le volume d'huile essentielle déposé initialement sur le papier absorbant.</p>

Dans les dessins qui illustrent l'invention,

La FIGURE 1 représente le matériel de départ, l'huile essentielle testée (1) définie par sa densité absolue ( $d$ ) et le papier absorbant (2) support de nos futurs disques (5),

La FIGURE 2 illustre le dépôt d'un volume précis ( $v$ ) de l'huile essentielle (1) sur le papier absorbant (2) à l'aide d'une micropipette (3),

La FIGURE 3 indique le découpage des disques (5) à l'aide d'une perforeuse (4) au centre relativement au diamètre de la zone de diffusion  $\otimes$  de l'huile essentielle (1),

La FIGURE 4 démontre la possibilité de conserver les disques (5) dans un tube fermé au sec (6) dans un réfrigérateur (7),

Et la FIGURE 5 est une vue d'ensemble de l'aromatogramme au phase finale après incubation montrant une zone d'inhibition circulaire (11) tout autour du disque (5) contre la nappe microbienne (10) développée sur le milieu de culture (8) au niveau de la boîte de pétri (9).

Le mode opératoire objet de la présente invention ne nécessite aucun appareillage particulier et il peut être mis en œuvre industriellement avec quelques différences qui touchent essentiellement le matériel de production. L'inventeur prévoit que ce mode opératoire novateur peut être exploité pour réussir la fabrication d'une large gamme de disques performants de l'aromatogramme (multiples choix des huiles essentielles) avec une charge précise et une stabilité durable.

Il va de soi que la présente invention n'a été décrite qu'à titre purement explicatif et nullement limitatif et que toute modification, notamment au niveau des équivalences techniques, pourra y être apportée sans sortir de son cadre.

*Revendications*

1. Méthode de préparation des disques de l'aromatogramme caractérisée en ce qu'il se déroule par dépôt d'un volume précis ( $v$ ) d'huile essentielle par micropipette (3) ou autre sur le papier absorbant (1) stérilisé au préalable et est laissée diffuser pendant un petit temps jusqu'à stabilisation de la zone de diffusion (2) de l'huile essentielle. Le volume d'huile essentielle utilisé doit être suffisant pour donner une zone de diffusion de diamètre ( $R$ ) supérieur à celui de la perforeuse (4).
2. Méthode selon la revendication 1 caractérisée en ce que le découpage des disques se fait par perforeuse (4) ou autre au centre de la zone de diffusion de l'huile essentielle (un disque (5) par zone).
3. Méthode selon la revendication 2 caractérisée en ce que les disques obtenus peuvent être conservés - s'ils ne sont pas utilisés immédiatement - dans un tube fermé au sec (6) ou autre à une température entre + 2 et + 8 °C dans un réfrigérateur pendant 08 h au maximum. La durée de conservation peut être prolongée lorsque la température de conservation démunie (entre - 20 et - 70 °C).
4. Méthode selon les revendications de 1 à 3 caractérisée en ce que les disques (5) assurent une charge infinitésimale en huile essentielle ( $C_{HE}$ ) calculable selon la formule suivante :

$$C_{HE} = (r/R)^2 \times v \times d \times 10^3 \text{ (}\mu\text{g)}$$

et en ce que lors de la réalisation de l'aromatogramme, les zones d'inhibition (11) des disques (5) sont nettement circulaires, mesurables et interprétables.

Dessin 1

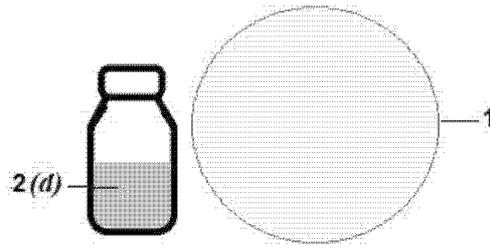


Fig. 1

Dessin 2

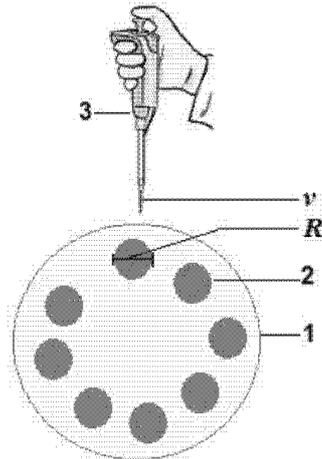


Fig. 2

Dessin 3

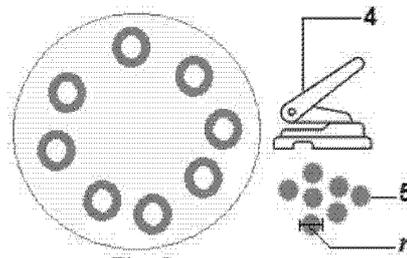


Fig. 3

Dessin 4

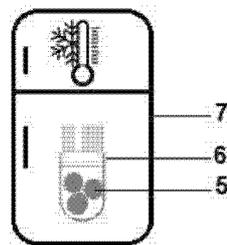


Fig. 4

Dessin 5

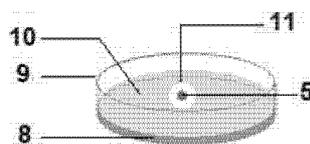


Fig. 5

## RAPPORT DE RECHERCHE DEFINITIF AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE

Établi conformément à l'article 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

<b>Renseignements relatifs à la demande</b>	
N° de la demande : 52102	Date de dépôt : 08/01/2021
Déposant : OULED TAARABT KAMAL	
Intitulé de l'invention : Méthode pour la préparation des disques de l'aromatogramme.	
<b>Classement de l'objet de la demande :</b>	
CIB : G01N1/28, C12Q1/18 CPC : G01N1/28, C12Q1/18	
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	
Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Remarques de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 4 : Observations à propos de revendications modifiées qui s'étendent au-delà du contenu de la demande telle qu'initialement déposée <input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur: BRINI Abdelaziz	Date d'établissement du rapport : 15/11/2022
Téléphone: (+212) 5 22 58 64 14	

**Partie 1 : Considérations générales****Cadre 1 : base du présent rapport**

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

- Demande telle qu'initialement déposée
- Demande modifiée suite à la notification du rapport de recherche préliminaire :
- Observations à l'appui des revendications maintenues
- Observations des tiers suite à la publication de la demande
- Réponses du déposant aux observations des tiers
- Nouveaux documents constituant des antériorités :
- Suite à la recherche complémentaire (Couvrant les documents de l'état de la technique qui n'étaient pas disponibles à la date de la recherche préliminaire)
- D\*\* : Référence document ; Déposant ; Date
- Suite à la recherche additionnelle (couvrant les éléments n'ayant pas fait l'objet de la recherche préliminaire)
- D\*\* : Référence document ; Déposant ; Date
- Observations à l'encontre de la décision de rejet
- Revendications  
4

**Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité****Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté	Revendications 1-4	Oui
	Revendications aucune	Non
Activité inventive	Revendications 1-4	Oui
	Revendications aucune	Non
Application Industrielle	Revendications 1-4	Oui
	Revendications aucune	Non

Il est fait référence aux documents suivants:

D1 : WO2017068576A1

D2 : GB2147415A

### **1. Nouveauté**

Aucun des documents susmentionnés ne divulgue les mêmes caractéristiques techniques telles que décrites dans les revendications 1-4, d'où celles-ci sont nouvelles conformément à 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 étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 décrit une méthode d'identification de la sensibilité, de la tolérance ou de la résistance d'un micro-organisme à un ou plusieurs agents antimicrobiens, comprenant les étapes suivantes :

1. Inoculation d'un micro-organisme sur une plaque de croissance
2. Exposer la surface de la plaque à un ou plusieurs agents antimicrobiens
3. Incubation de la plaque pendant une première période de temps
4. exposer la surface de la plaque à au moins un agent favorisant la croissance
5. incuber la plaque pendant une seconde période de temps;
6. observer le modèle de croissance dudit microorganisme sur ladite plaque.

Tenant compte des observations formulées par le déposant à l'encontre de la décision de rejet, en effet :

L'objet de la présente demande diffère de D1 en ce que les disques de l'aromatogramme peuvent être conservés dans un tube fermé au sec (6) ou autre à une température entre +2 et + 8°C dans un réfrigérateur pendant 8h au maximum.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme étant la fourniture d'une méthode alternative de préparation des disques de l'aromatogramme.

La solution proposée n'est pas évidente pour la raison suivante :

Aucun document de l'art antérieur ne divulgue ni ne suggère un mode opératoire pour la préparation des disques de l'aromatogramme tel que décrit dans la présente demande.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-4 implique une activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

### **3. Application industrielle**

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.