

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 27687 A1** (51) Cl. internationale : **A61K 9/00**
(43) Date de publication : **02.01.2006**

-
- (21) N° Dépôt : **27732**
(22) Date de Dépôt : **10.06.2004**
(71) Demandeur(s) : **ETAHIRI SAMIRA, 421, RUE IBN KHATTIB LOT QODS EL JADIDA (MA)**
(72) Inventeur(s) : **ETAHIRI SAMIRA ; BULTEL-PONCE VALERIE ; ASSOBEI OMAR**

-
- (54) Titre : **UNE NOUVELLE MOLECULE A ACTIVITE ANTIBIOTIQUE A PARTIR DE L'ALGUE PTEROSIPHONIA COMPLANATA**
(57) Abrégé : Une nouvelle molécule à activité antibiotique à partir de l'algue rouge Pterosiphonia complanata La présente invention a pour objectif de décrire un composé doué d'une importante activité antibiotique purifié à partir de l'algue rouge Pterosiphonia complanata (récoltée sur la côte Atlantique d'El Jadida au Maroc). L'activité antibiotique de ce produit s'exerce à l'encontre de plusieurs microorganismes rencontrés en pathologie humaine. L'analyse structurale montre qu'il s'agit d'un composé de type phénolique nommé le 3,5,6-tribromo-methyl-4-methoxymethyl-benzene-1,2 diol.

Titre de l'invention :

**Une nouvelle molécule à activité antibiotique à partir de l'algue
rouge *Pterosiphonia complanata***

Résumé

La présente invention a pour objectif de décrire un composé doué d'une importante activité antibiotique purifié à partir de l'algue rouge *Pterosiphonia complanata* (récoltée sur la côte Atlantique d'El Jadida au Maroc). L'activité antibiotique de ce produit s'exerce à l'encontre de plusieurs microorganismes rencontrés en pathologie humaine. L'analyse structurale montre qu'il s'agit d'un composé de type phénolique nommé le 3,5,6-tribromo-méthyl-4-méthoxyméthyl-benzène-1,2 diol.

Cadre de l'invention

Durant les trente dernières années, de nombreuses molécules biologiquement actives et de grande originalité structurale ont été extraites d'éponges et d'algues marines (Etahiri *et al*, 2001 ; Bultel *et al.*,2002). Jusqu'à maintenant 4 000 à 5 000 nouvelles substances ont été décrites et le nombre de structures possédant des activités biologiques peut être estimé à 500 molécules, parmi les quelles uniquement quatre médicaments sont commercialisés à l'heure actuelle :

* *La Céphalosporine C* isolée à partir d'un champignon marin : *Céphaosporium acremonium*. Cette molécule est utilisée comme antibiotique et dont ses dérivés sont utilisés là où les germes traités autrefois par la pénicilline sont devenus résistants à cet antibiotique.

* *Le Ziconotide* : isolée à partir d'un cône marin : *Conus magus* est utilisée pour le traitement de la dégénérescence neurale liée à l'accumulation excessive de calcium (ischémie). C'est un médicament utilisé pour le traitement des douleurs chroniques résistantes aux antalgiques.

* *La Cytarabine ou l'Ara-C* est une substance anticancéreuse. Ces analogues de base nucléotidique, isolés à partir de l'éponge *Cryptotethya crypta* s'incorporent dans l'ADN et bloquent sa synthèse, ce qui leur confère des propriétés anti-tumorales intéressantes. L'Ara-C est utilisée dans le cas de leucémies lymphoïdes chroniques et de leucémies myéloïdes aiguës.

* *La Vidarabine ou l'Ara-A* appartient à la même catégorie que l'Ara-A, c'est un agent anti-herpétique et antiviral employé dans le traitement de l'herpès et du zona.

Cependant, si les invertébrés marins ont été assez largement étudiés, les travaux concernant les algues marines restent moins abondant bien que le nombre d'espèces présentes dans le milieu marin est également très important. Sur le plan pharmacologique, la présence de différentes activités biologiques a été mise en évidence chez plusieurs espèces d'algues marines. L'activité antibactérienne, antivirale, anti-tumorale et d'autres propriétés comme celle qui entre dans la régulation du taux du cholestérol sanguin ou dans la régulation du système immunitaire ont été étudiées. Le premier produit d'origine algal qui a montré une activité pharmacologique est l'acide kaïnique isolé à partir de l'algue rouge *Digenea simplex* et qui est utilisé comme un antiparasitaire. Un autre produit (l'Halomon) est également isolé à partir d'une algue rouge *Portiera hornemannii*, c'est un agent anti-tumoral puissant. Les travaux réalisés sur les algues et les résultats obtenus montrent l'importance que présentent ces végétaux en tant que source potentielle de molécules d'intérêt biomédicale certain dans le traitement des pathologies d'origines diverses. La grande diversité et l'abondance des algues sur les côtes marocaines justifient notre démarche qui consiste à rechercher dans les algues des substances présentant des activités biologiques intéressantes afin de mettre en évidence de nouvelles molécules qui pourraient avoir dans le futur une application médicale et contribuer ainsi à l'enrichissement de l'arsenal thérapeutique de notre pays.

La présente invention concerne un composé de type phénolique : le 3,5,6-tribromo-méthyl-4-méthoxyméthyl-benzène-1,2 diol doué d'une importante activité antibiotique à l'encontre de plusieurs microorganismes rencontrés en pathologie humaine. La CMI des bactéries testées est comme suit : *Staphylococcus aureus* (7 nM) ; *Bacillus thurengensis* (7,75 nM) ; *Enterococcus faecium* (31,25 nM) ; *Enterococcus hirae* (15,62 nM) ; *Pediococcus pentosaceus* (7,75 nM) ; *Clostridium sporogenes* (31,25 nM) ; *Pseudomonas aeruginosa* (31,25 nM) ; *Escherichia coli*

(15,62 nM) et *Vibrio anguillarum* (15,62 nM). Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un large programme de recherche de substances naturelles d'origine marine pharmacologiquement actives.

Partie expérimentale

Dans le cadre de la recherche des molécules à activité biologiques dans les algues marines de la côte Atlantique Marocaine, beaucoup d'espèces ont été testées pour leur activité antibactérienne (Etahiri *et al.*, 2001 ; 2002 ; El Kouri *et al.*, 2004). Un large criblage a été réalisé sur environ 39 espèces.

1- Récolte et préparation de la poudre d'algue

L'algue rouge *Pterosiphonia complanata* est récoltée sur la côte Atlantique de la ville d'El Jadida (Maroc). Après séchage, une poudre est obtenue, elle servira pour l'extraction et la purification des molécules actives.

2- Extraction

La poudre de l'algue est extraite par un mélange de dichlorométhane/méthanol. Après filtration, le solvant est évaporé. L'extrait total ainsi obtenu est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

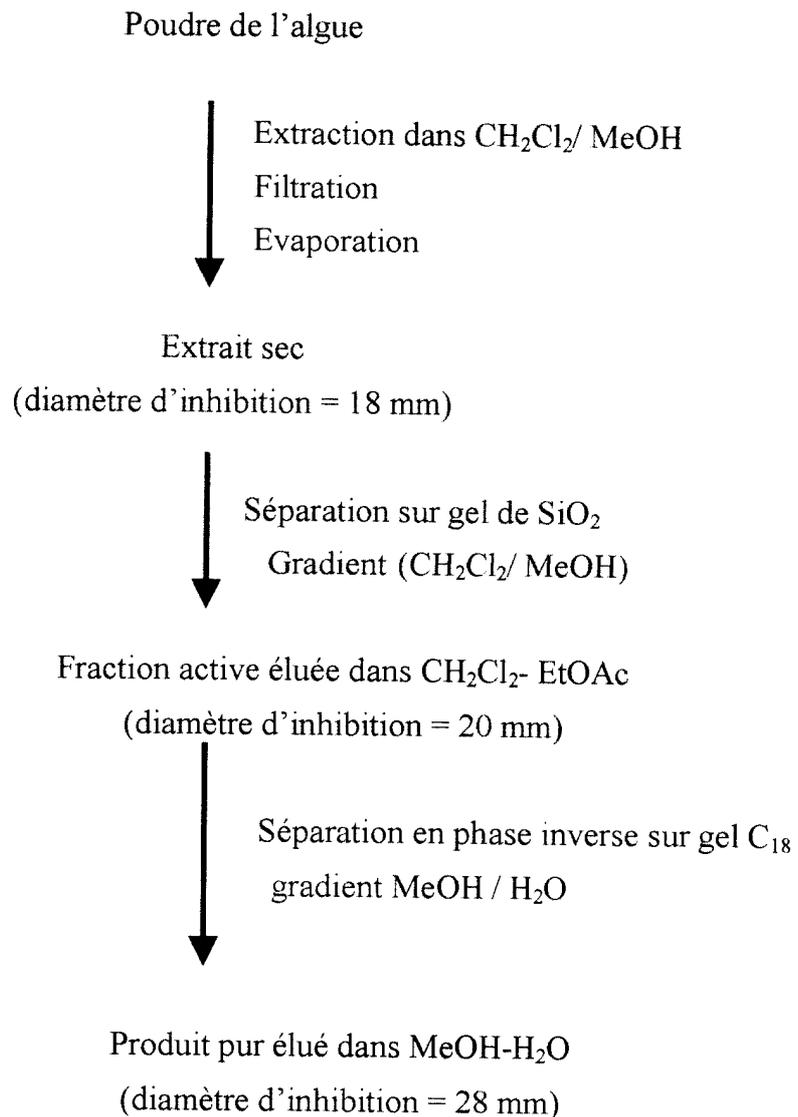
3- Evaluation de l'activité antibiotique

La technique utilisée pour l'évaluation de l'activité antibiotique est celle des disques de cellulose. L'extrait est dissout dans un volume minimal de solvant puis déposé sur un disque. Après évaporation du solvant, le disque est placé à la surface d'une boîte de pétri préalablementensemencée par inondation par la souche bactérienne test. Les boîtes de pétrie sont incubées à 37°C pendant 16 heures. L'inhibition se traduit par l'apparition, autour de la pastille, d'une zone transparente due à la diffusion de l'antibiotique dans la gélose. Le diamètre d'inhibition est mesuré en mm. Des pastilles contenant des antibiotiques standards (la tétracycline et le chloramphénicol) et le solvant seul ont été réalisées dans les mêmes conditions et ont servis comme témoins. Les germes qui ont fait l'objet de tests antibiotiques font partie des microorganismes rencontrés en pathologie humaine. Ces souches bactériennes et fongiques sont répertoriées dans des centres de collection de cultures. Ainsi, une partie de ces souches provient de la collection de l'Institut Pasteur de Strasbourg en France (CIP) ou de la collection de Culture de l'Institut Pasteur de Paris (IP) ou de la collection ATCC (American Type Culture Collection). Les espèces utilisées pour ce test sont : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus thuriengensis* ATCC 10792, *Enterococcus faecium* CIP 5432, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25744, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Clostridium sporogenes* CIP 7939 et *Vibrio anguillarum* ATCC 19265.

4- Purification de la molécule responsable de l'activité antibactérienne

Dans le but de purifier les molécules responsables de l'activité antibactérienne chez l'algue étudiée, différentes techniques chromatographiques ont été utilisées : chromatographie sur couche mince, chromatographie sur colonne de silice et la chromatographie en phase inverse sur gel. La purification a été réalisée selon le protocole décrit dans la page N° 4. L'activité antibactérienne a été suivie tout au long de l'opération vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Le choix de cette bactérie est lié à la forte sensibilité qu'elle a montrée au cours du criblage réalisé sur les différentes bactéries test.

**Protocole de purification du produit responsable de l'activité antibactérienne
chez l'algue *Pterosiphonia complanata***



5- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

L'activité antibactérienne du tribromophenol isolé à partir de l'algue a été déterminée en terme de CMI vis-à-vis de nombreuses bactéries à Gram (+) et à Gram (-) potentiellement pathogènes. En effet, le produit purifié a été testé à différentes concentrations sur *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus thuriengensis* ATCC 10792, *Enterococcus faecium* CIP 5432, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25744 et *Clostridium sporogenes* CIP 7939 comme bactéries Gram (+), et vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 10536 et *Vibrio anguillarum* ATCC 19265 comme bactéries à gram (-)

Les résultats représentés dans le tableau 1 montrent que parmi les bactéries Gram (+) testées, *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible à ce produit avec une CMI de l'ordre de 7 nM soit 2,8 µg/ml. Cette valeur est de 7,75 nM pour *Bacillus thuriengensis* et *Pediococcus pentosaceus*, alors que les bactéries *Enterococcus faecium* et *Clostridium sporogenes* ont montré la CMI la plus élevée, elle est de 31,25 nM. En ce qui concerne les bactéries Gram (-), *Escherichia coli* s'est révélée la souche la plus sensible à ce produit comparées aux autres bactéries testées de ce groupe, sa CMI est de 15,62 nM alors qu'elle est de 31,25 nM pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Vibrio anguillarum*.

En comparaison avec d'autres molécules déjà utilisées dans le domaine thérapeutique telles que l'ampicilline, la tétracycline, le chloramphénicol et la streptomycine, le produit antibactérien purifié à partir de l'algue étudiée a présenté la plus faible CMI vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Elle est de l'ordre 2,8 µg/ml, tandis qu'elle est de 3,1 µg/ml pour la streptomycine, de 6,25 µg/ml pour la tétracycline, de 12,5 µg/ml pour l'ampicilline et de 6,25 µg/ml pour le chloramphénicol. Les résultats obtenus sur *Escherichia coli* montrent que la plus faible valeur de CMI est également celle du composé purifié, elle est de l'ordre de 3,1 µg/ml, alors que les CMI de l'ampicilline, la streptomycine, la tétracycline et le chloramphénicol sont respectivement de 25µg/ml ; 6,5 µg/ml ; 12,5 µg/ml et 12,5 µg/ml. L'activité antibactérienne de ce produit est également beaucoup plus importante par rapport à celle du bromophénol isolé à partir de l'algue rouge *Rhodomela confervoides* (Xu *et al.*, 2003). Ainsi, cette molécule naturelle par sa forte activité constitue une bonne candidate pour un usage médical dans le future si les études pharmacologiques s'avèrent concluantes.

Bactéries testées	CMI (nM)
<i>Staphylococcus aureus</i>	7
<i>Bacillus thurengensis</i>	7,75
<i>Enterococcus faecium</i>	31,25
<i>Enterococcus hirae</i>	15,62
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	7,75
<i>Clostridium sporogenes</i>	31,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31,25
<i>Escherichia coli</i>	15,62
<i>Vibrio anguillarum</i>	15,62

Tableau 1 : concentration minimale inhibitrice (CMI) du composé purifié à l'encontre des différents microorganismes testés.

6- Détermination de la structure du composé antibactérien :

Ce composé représente 0,65 % du poids sec de l'algue, il se présente sous forme de poudre jaune, son spectre de masse réalisé par ionisation désorption à l'ammoniaque a montré :

- Un ion moléculaire $[M+NH_4]^+$ situé à $m/z = 411.8230$ qui correspond à la formule $C_8H_{11}O_3Br_3N$ (sa masse calculée est à $m/z 411.8225$). L'ion moléculaire tribromé présente des pics caractéristiques $m/z = 406, 408, 410, 412$ avec des abondances isotopiques relatives égales à 1. 3. 3. 1.

Le spectre infra-rouge de ce composé a montré la présence de :

- Deux bandes d'absorption avec des rapport d'intensité 3472 et 3422 cm^{-1} attribuées aux hydroxyles en position 1 et 2.
- Des bandes caractéristiques de la structure aromatique à 1605, 1574, 1495, 1462 cm^{-1} .

Le spectre de RMN de proton réalisé dans le Dimethylsulfoxyde (DMSO) deutéré a montré la présence de :

- Un singulet à $\delta 4.85$ ppm attribué aux groupement méthylène en position 7.
- Un singulet à $\delta 3.41$ ppm attribué au groupement méthyle en position 8.
- Deux singulets à $\delta 9.72$ ppm et à $\delta 10.18$ ppm attribués aux deux protons des hydroxyles en position 1 et 2.

Le spectre de RMN du carbone 13 (Jmod, 100 MHz) a montré la présence de :

- Six pics à 164,2 ; 144,3 ; 114,6 ; 129,4 ; 119,2 ; 114,1 ppm attribués au groupement benzène correspondants respectivement aux carbones en position 1, 2, 3, 5, 6.
- Un signal à 58,4 ppm attribué au groupement méthylène en position 7.
- Un signal à 75,8 ppm attribué au groupement méthyle en position 8.

Le Spectre HMBC de ce composé montre :

- Des corrélations entre les protons du groupement méthylène à 4,85 ppm en position 7 et les Carbones à 114,6 ; 129,4 ; 119,2 ; 75,8 ppm respectivement en position 3, 4, 5, 8.
- Des couplages entre les protons du groupement méthyl à 75,8 ppm en position 8 avec le carbone à 75,8 ppm en position 7.
- Des couplages entre le proton de l'hydroxyle à 9,72 ppm en position 1 et les carbones à 146,2 et 114,1 ppm en position 1 et 6.
- Des couplage entre le proton de l'hydroxyle à 10,18 ppm en position 2 et les carbones à 144,3 et 114,6 ppm en position 2 et 3.

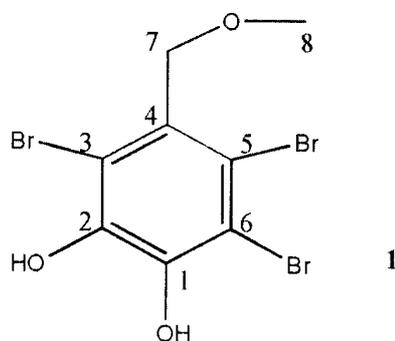
Le tableau (2) résume les données spectrales de protons et du carbone 13 et les corrélations existantes.

Position	H δ ppm (m,Hz)	¹³ C δ ppm	HMBC
1	-	146,2	-
2	-	144,3	-
3	-	114,6	-
4	-	129,4	-
5	-	119,2	-
6	-	114,1	-
7	4,85 (s. 2H)	58,4	3. 4. 5. 8
8	3,41 (s. 3H)	75,8	7
OH-1	9,72 (s. 1H)	-	1. 6
OH-2	10,8 (s. 1H)	-	2. 3

Tableau 2 : données spectrales par RMN de protons et de carbone 13 et l'HMBC.

RMN de protons à 400 MHz, et du carbone 13 à 100 MHz.

L'ensemble de ces données a permis d'identifier ce composé comme étant le 3,5,6-tribromo-4-méthoxyméthyl-benzène-1,2 diol



Structure chimique du composé antibactérien purifié

Ce résultat confirme ceux déjà obtenus par de nombreux auteurs, dans ces travaux il a été rapporté que les algues marines constituent une source importante de molécules bioactives dont la majorité présente une activité antibactérienne importante. Le produit que nous avons isolé est un nouveau composé bromé. Ce type de molécule est présente naturellement dans un large nombre d'organismes incluant les algues marines.

Références bibliographiques

Bultel-Poncé, V., Etahiri, S. and Guyot, M. 2002. New Ketosteroids from the red alga *Hypnea musciformis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* # 12 : 1715-1718.

Etahiri, S., Bultel-Ponce, V., Caux, C., Guyot, M., 2001. New Bromoditerpenes From The Red Alga *Sphaerococcus Coronopifolius*. *J. Nat. Prod.* 64 : 1024-1027.

Etahiri, S., Bultel-Poncé, V., Elkouri, A., Assobhei, O., Zaoui, D. and Guyot, M. (2002). Antibacterial Activities of Marine algae from the Atlantic Coast of Morocco *Mar. life.* # 13 : (1-2) (apparaître).

El Kouri A., Bultél-Poncé V., Assobhei O., Etahiri S. 2004. Etude de la variation saisonnière de l'activité antimicrobienne et anti-inflammatoire chez quelques espèces d'algues marines de la côte Atlantique Marocaine. *Rev. Biol. Biotech.* 3 (1) : 29-36.

REVENDICATIONS

1- Le composé purifié à partir de l'algue rouge *Ptérosiphonia complanata* nommé le 3,5,6-tribromo-méthyl-4-méthoxyméthyl-benzène-1,2 diol et caractérisé par une importante activité antibiotique à l'encontre de plusieurs microorganismes rencontrés en pathologie humaine (revendication 1).

2- Toutes les molécules issues du tribromophénol caractérisé dans la revendication N°1 par substitution d'un ou plusieurs radicaux quelconques ou par une quelconque modification de sa structure chimique (revendication 2).

3- Les tribromophénols obtenus selon la revendication N°2 caractérisés par une activité antibiotique et/ou antifongique (revendication 3).

4- Le protocole de purification du tribromophénol caractérisé dans la revendication N°1 (revendication 4).

5- L'utilisation industrielle de la molécule nommée le 3,5,6-tribromo-méthyl-4-méthoxyméthyl-benzène-1,2 diol (revendication 5).