



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 36079 B1** (51) Cl. internationale : **C07C 215/00**
(43) Date de publication : **29.01.2016**

-
- (21) N° Dépôt : **36079**
(22) Date de Dépôt : **02.07.2013**
(71) Demandeur(s) : **UNIVERSITE CHOUAIB DOUKKALI, AVENUE JABRANE KHALIL JABRANE BP 299 24000 ELJADIDA (MA)**
(72) Inventeur(s) : **EL AMRAOUI Belkassem ; FASSOUANE AZIZ ; BIARD JEAN FRANCOIS**
(74) Mandataire : **EL AMRAOUI Belkassem**

-
- (54) Titre : **(Z)-2-Amino-docos-9-ene-1,3,13,14-tetraol: Puissant antimicrobien, dérivé de la sphingosine isolé à partir de l'éponge Haliclona viscosa récoltée du littoral Atlantique d'El Jadida**
(57) Abrégé : Dans le but de rechercher de nouveaux produits antifongiques d'origine marine, nous avons isolé de manière bio-guidée, un dérivé de la sphingosine, (9Z)-2-amino-docos-9-ène1,3,13,14- tétraol à partir de l'éponge Haliclona viscosa récoltée du littoral Atlantique d'EL Jadida. La structure moléculaire de ce composé a été élucidée par des techniques de spectrométrie IR, UV, MS et RMN. Le métabolite isolé a montré in vitro une activité antifongique significative contre des levures impliquées en mycologie humaine et contre des champignons et des bactéries phytopathogènes. Le test d'activité in vivo contre la fusariose vasculaire du melon et contre la pourriture poste-récolte des agrumes a montré que l'haliscosamine est très efficace pour la lutte contre Fusarium oxysporum f.sp. melonis et contre Penicillium digitatum . Le test de toxicité chez les larves d'Artemia salina s'est montré négatif.

Abrégé :

Dans le but de rechercher de nouveaux produits antifongiques d'origine marine, nous avons isolé de manière bio-guidée, un dérivé de la sphingosine, (9Z)-2-amino-docos-9-ène-1,3,13,14-tétraol à partir de l'éponge *Haliclona viscosa* récoltée du littoral Atlantique d'EL Jadida. La structure moléculaire de ce composé a été élucidée par des techniques de spectrométrie IR, UV, MS et RMN. Le métabolite isolé a montré *in vitro* une activité antifongique significative contre des levures impliquées en mycologie humaine et contre des champignons et des bactéries phytopathogènes. Le test d'activité *in vivo* contre la fusariose vasculaire du melon et contre la pourriture poste-récolte des agrumes a montré que l'haliscosamine est très efficace pour la lutte contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* et contre *Penicillium digitatum*. Le test de toxicité chez les larves d'*Artemia salina* s'est montré négatif.

27 FEV 2015
2015.038

29 JAN 2016

Titre :

(Z)-2-Amino-docos-9-ene-1,3,13,14-tetraol: Puissant antimicrobien, dérivé de la sphingosine isolé à partir de l'éponge *Haliclona viscosa* récoltée du littoral Atlantique d'El Jadida.

Introduction :

(Z)-2-Amino-docos-9-ene-1,3,13,14-tetraol est un dérivé de la sphingosine (C₂₂H₄₅NO₄, M=387) de structure moléculaire original isolé à partir de l'éponge *Haliclona viscosa* récoltée du port d'El Jadida. Nous avons choisi **Haliscosamine** comme nom original à cette molécule originale. L'Haliscosamine a une activité antibiotique et antifongique *in vitro* contre des microorganismes impliqués en pathologie humaine (Candidoses, Cryptococcoses, Bactéries Gram⁺ et Gram⁻) et contre des bactéries et des champignons phytopathogènes (La fusariose vasculaire du melon (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*), la fusariose de la tomate (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*), la fusariose du Pois-chiche (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*), la pourriture grise de la vigne (*Botrytis cinerea*), la pourriture des agrumes (*Penicillium digitatum*), la galle du collet (Crown-gall) (*Agrobacterium tumefaciens*) et *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. Haliscosamine est aussi active *in vivo* contre la fusariose vasculaire du melon et contre la pourriture poste-récolte des agrumes.

Le test *in vivo* de l'haliscosamine contre la fusariose du melon et contre la pourriture des agrumes a montré des résultats importants et le test de sa toxicité chez les nauplius d'*Artémia salina* s'est révélé négatif ce qui rend possible son utilisation comme produit phytosanitaire sans nuisance aux écosystèmes.

En conclusion, **(Z)-2-Amino-docos-9Z-ene-1,3,13,14-tetraol** nommé Haliscosamine est une nouvelle biomolécule qui pourra être utilisée en pathologie humaine et/ou en phytopathologie.

Description :

L'éponge marine *Haliclona viscosa* (Réf. EM14) a été récoltée du port d'El Jadida à une profondeur allant de 3 à 5 m à marée basse. Cette éponge a été identifiée par Maria-Jesús Uriz, professeur chercheur au centre des études avancées de Blanes CEAB, Espagne. Il s'agit d'un animal, invertébré de l'embranchement des spongiaires,

Classe : Demospongiae

Groupe : Haplosclerida

Famille : Chalinidae (ex Renieridae).

Genre : *Haliclona*

Espèce : *Haliclona viscosa*

Cette éponge a été lyophilisée puis extraite avec l'éthanol. L'extrait a été fractionné par partage liquide/liquide puis la fraction active a été fractionnée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La fraction active et pure a été analysée par les techniques de spectrométrie SM, IR, UV et RMN.

Analyse des spectres de masse :

Les seuls éléments présents sont C, H, N et O et la molécule comporte un nombre impair d'azote, la formule brute $C_{22}H_{45}NO_4$ ($M = 387$) est celle qui donne l'écart le plus faible (1 ppm) entre la valeur mesurée (388,3431) et la valeur théorique calculée pour cette formule (388,34268) pour l'ion $[M+H]^+$ m/z 388 et un écart de 2 ppm pour l'ion $[M+Na]^+$ m/z 410 (valeur mesurée 410,3255 / théorique 410,32463).

Le calcul du degré d'insaturation du produit, selon la formule $(C+1) - (X \text{ ou } H / 2) + (N \text{ ou } P / 2)$, conduit à une valeur de 1, donc à la présence d'une double liaison ou d'un cycle.

Une étude MS/MS a été réalisée sur l'ion $[M+H]^+$ m/z 388. Les principaux ions fragments observés sont m/z 370 $[M-H_2O+H]^+$, 352 $[M-2H_2O+H]^+$, 334 $[M-3H_2O+H]^+$ et 322, ce qui indique la présence d'au moins 3 fonctions -OH.

Analyse des spectres de résonance magnétique nucléaire

L'analyse des spectres RMN ^{13}C , 1H et HSQC (CD3OD) montre la présence de 22 carbones, avec 39 protons, incluant un méthyle (CH_3), quinze méthylènes (CH_2) et six méthines (CH). Quatre carbones portant un oxygène sont visibles à 59,11 (C-1), 67,72 (C-3), 73,36 (C-13), 73,81 (C-14), et un carbone portant un atome d'azote est probable à 57,72 (C-2), ce qui correspond aux 6 protons non portés par des carbones. Les deux carbones 129,08 (C-9) et 129,82 (C-10) montrent la présence d'une double liaison, ce qui exclut donc la présence d'un cycle. L'aspect général des spectres RMN suggère qu'il s'agit d'un dérivé de sphingosine. Le total des protons portés par les carbones est donc de 39, auxquels s'ajoutent les protons des 4 OH et du NH_2 , soit $39 + 6 = 45$, ce qui correspond bien à la formule $C_{22}H_{45}NO_4$. Les déplacements chimiques du proton et du carbone 13 ont été rapportés dans le **tableau I**.

L'analyse des spectres HMBC, COSY et TOCSY ont permis de déterminer trois sous-structures dans la molécule : C-1 à C-5, C-8 à C-16 et C-20 à C-22. Toutefois, les positions respectives des carbones 9/10, 8/11 et 13/14 ne sont pas claires à cause du fort chevauchement de leurs signaux sur le spectre RMN ^1H . L'expérimentation avec d'autres solvants a été limitée par la faible solubilité du produit dans l'ACN, le CH_2Cl_2 et le CHCl_3 . Finalement, les affectations des signaux RMN ^1H ont été déterminées par la réalisation d'une nouvelle série d'expériences RMN 2D avec une résolution accrue pour les zones correspondantes, et par des expériences systématiques de découplage par irradiation en RMN ^1H . Par ces procédés, des relations claires entre tous les atomes de carbone ont été établis pour ces trois structures partielles. L'assemblage des trois sous unités de la structure a été effectué par des expériences complémentaires de découplage RMN ^1H (Annexe 3), qui ont permis de relier C-22 à C-21 et C-20, puis à C-16 *via* les trois CH_2 à 29.17, 29.18 et 29.20 (10, 9, 8, respectivement), et de conclure au fait que les deux derniers $-\text{CH}_2$ (C-6 et C-7) devaient être positionnés entre C-5 et C-8 pour compléter l'élucidation de la structure du produit.

La configuration de la double liaison a été déterminée comme étant Z (*cis*) sur la base des expériences RMN ^1H : des irradiations à δ 2,09 (H de C-8) et 2,20 (H de C-11) ont entraîné un changement d'aspect des protons du groupe oléfinique et ont permis la mesure d'une constante de couplage de 10Hz pour ces protons. L'enregistrement d'un autre spectre ^1H -RMN dans CD_3OD avec quelques gouttes de C_6D_6 a augmenté la résolution et a permis de confirmer cette valeur de couplage de 10Hz .

La structure de ce métabolite isolé à partir de *H. viscosa* est un dérivé de la sphingosine. Il s'agit d'une molécule originale. Cette molécule a été nommée : Haliscosamine ; nom composé de *Haliclona viscosa* et amine (figure 1).

La rotation optique de l'haliscosamine a été mesurée sur un polarimètre type « Schmidt + Haensch Polartronic NH8 » et elle est de valeur $[\alpha]_{20\text{D}} = 22,3$ ($c = 0,76$, MeOH).

Activité antimicrobienne *in vitro* de l'haliscosamine

Le spectre antimicrobien de l'haliscosamine a été étudié chez des microorganismes de référence impliqués en pathologie humaine ou en phytopathologie par la méthode des disques de cellulose. Des bactéries Gram négatif, des bactéries Gram positif et des levures de référence provenant de la Collection de l'Institut Pasteur de Paris (CIP), de l'American Type Culture Collection (ATCC) et de la Coleccion Espanola de Cultivos Tipo (CECT) ont été utilisées comme souches cible.

L'haliscosamine présente un large spectre antimicrobien sur des bactéries et sur des champignons phytopathogènes et peut donc être utilisé comme biopesticide pour désinfecter les sols et pourra être pulvérisé sur les cultures pour lutter contre les microorganismes qui attaquent les parties aériennes de la plante ou sur les fruits lors du stockage contre les agents de la pourriture des fruits tel que *P. digitatum*. Aussi cette molécule montre une activité très forte sur des microorganismes impliqués dans les pathologies humaine.

Les diamètres des zones d'inhibition ont été rapportés sur le **tableau II**.

Activité *in vivo* de l'haliscosamine contre la fusariose vasculaire du melon et contre la pourriture poste-récolte des agrumes :

L'haliscosamine a été testée d'une part chez des plantules de melon infectées par une suspension de conidies et mycéliums de *Fusarium oxysporum f.sp. melonis* et d'autre part chez des oranges infectées par *Penicillium digitatum*. Les tests ont été refait trois fois et les résultats ont été prometteurs avec une inhibition de 94% de la fusariose vasculaire du melon et d'environ 100% de la pourriture des agrumes.

Toxicité *in vivo* de l'haliscosamine sur des larves d'*Artémia salina*

Le test de toxicité de l'haliscosamine a été étudié chez les larves d'*Artemia salina*. Le pourcentage de décès des larves d'*A. salina* pour plusieurs concentrations a été calculé et la CL50 a été estimée.

En résultat, même à de fortes concentrations de l'haliscosamine, le pourcentage de mortalité est très faible.

Conclusion :

Le dérivé de la sphingosine, ((Z)-2-Amino-docos-9-ene-1,3,13,14-tetraol) isolé de l'éponge *Haliclona viscosa* récoltée du port d'El Jadida (Maroc) présente une structure moléculaire originale qui se trouve à l'état libre. Cette molécule a été nommée Haliscosamine et elle présente une activité antifongique et antibactérienne contre tous les germes pathogènes étudiés. L'haliscosamine n'est pas toxique chez les larves d'*Artemia salina* donc non nuisible à l'environnement s'elle est utilisée comme Biopesticide. Aussi sous réserve d'étudier la toxicité et les effets indésirables chez l'homme, l'haliscosamine pour être utilisée dans la thérapie humaine.

Revendications :

1. Nouvelle molécule, dérivé de la sphingosine, caractérisée en ce que sont nom chimique **(Z)-2-Amino-docos-9-ene-1,3,13,14-tetraol** ;
2. Nouvelle molécule selon la revendication (1) caractérisée en ce que c'est une molécule biologique ou synthétique ;
3. Utilisation de la molécule (**(Z)-2-Amino-docos-9-ene-1,3,13,14-tetraol**) naturelle ou synthétique comme antibiotique et/ou antifongique en médecine humaine ou vétérinaire ;
4. Utilisation de molécule (**(Z)-2-Amino-docos-9-ene-1,3,13,14-tetraol**) naturelle ou synthétique comme pesticide en agriculture ou en horticulture ;

Tableau I : Déplacements chimiques (^1H et ^{13}C), solvant méthanol deutérié

Carbone	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	$\delta^1\text{H}$ ppm $J(\text{Hz})$	HMBC	COSY	TOCSY
1a	59.12, CH ₂	3.67dd ($J = 11.7, 4.0$)	2, 3	1b, 2, 3	2, 3
1b		3.79dd ($J = 11.7, 4.0$)	2, 3	1a, 2, 3	2, 3
2	57.72, CH	3.07 m ($J = 6.8, 4.0$)	1, 3, 4	1	1, 3
3	67.72, CH	3.69 m ($J = 6.8, 4.0$)	1, 2, 4, 5	1, 4	1, 2, 4, 6
4a	33.51, CH ₂	1.47 m	2, 3, 5		
4b		1.57 m	2, 3, 5		
5a	24.92, CH ₂	1.40 m	3		
5b		1.57 m	3		
6	28.94, CH ₂	1.37 m			
7	29.45, CH ₂	1.37 m	8	8	9
8	26.77, CH ₂	2.09 m	7, 9	7, 9, 10	
9	129.08, CH	5.39 m	8	8, 10	8, 7
10	129.82, CH	5.40 m	11	8, 9, 11	11, 13
11a	23.32, CH ₂	2.13 m	10, 12, 13	10, 12	10, 13
11b		2.24 m	10, 12, 13	10, 12	10, 13
12a	32.59, CH ₂	1.54 m	11, 13		13
12b		1.59 m	11, 13		13
13	73.37, CH	3.42	11, 12, 14, 15		10, 11, 12, 15
14	73.81, CH	3.40	13, 15, 16	15	
15a	32.67, CH ₂	1.44 m	13, 14, 16	14	13
15b		1.54 m	13, 14, 16	14	13
16a	25.64, CH ₂	1.37 m	14, 15		
16b 17	29.17, CH ₂	1.52 m 1.37 m	14, 15		
18	29.18, CH ₂	1.37 m			
19	29.20, CH ₂	1.37 m			
20	31.66, CH ₂	1.33 m			
21	22.32, CH ₂	1.36 t ($J = 6.5$)			
22	13.06, CH ₃	0.92			

Tableau II : Activité antimicrobienne *in vitro* de l'haliscosamine

Souches cibles	Diamètres des zones d'inhibition (mm)
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i> FOM 20474 CECT	17
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>	14
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i>	17
<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tabaci</i>	12
<i>Botrytis cinerea</i> (BC630)	20
<i>Penicillium digitatum</i>	18
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A281	17
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	15
<i>Candida tropicalis</i> R2 CIP1275.81	25
<i>Candida albicans</i> CIP884.65	25
<i>Cryptococcus neoformans</i> CIP960	28
<i>Escherichia coli</i> CIP54127	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC10145	28
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CAN 228-1	27
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC66331	25
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 209 (ATCC 25923)	26

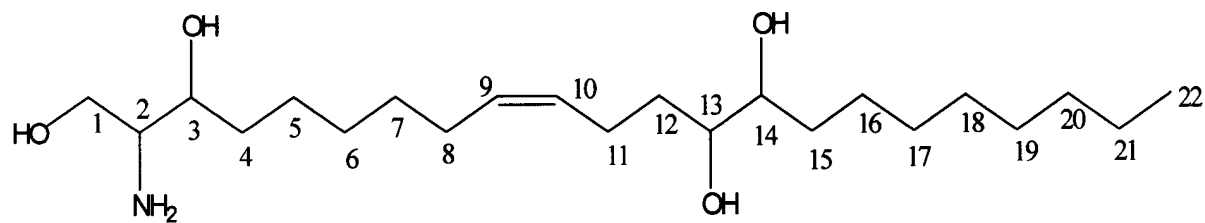


Figure 1 : Structure moléculaire de l'haliscosamine : (Z)-2-Amino-docos-9-ene-1,3,13,14-tetraol.



**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*

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 36079 Date de dépôt : 02/07/2013	
Déposant : UNIVERSITE CHOUAIB DOUKKALI	
Intitulé de l'invention : (Z)-2-Amino-docos-9-ene-1,3,13,14-tetraol: Puissant antimicrobien, dérivé de la sphingosine isolé à partir de l'éponge Haliclona viscosa récoltée du littoral Atlantique d'El Jadida	
Classement de l'objet de la demande : CIB : C07C215/00, C07C215/12	
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 : Observations à propos de revendications modifiées qui s'étendent au-delà du contenu de la demande telle qu'initialement déposée <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 4 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle <input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: S.BENCHEKROUN	Date d'établissement du rapport : 29/01/2016
Téléphone: (+212) 5 22 58 64 14	
Email : benchekroun@ompic.ma	

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 (Couvrent les documents de l'état de la technique qui n'étaient pas disponibles à la date de la recherche préliminaire)
 - Suite à la recherche additionnelle (couvrant les éléments n'ayant pas fait l'objet de la recherche préliminaire)

Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité**Cadre 4 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté (N)	Revendications 1-4 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1-4 Revendications aucune	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-4 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 :WO2007003904

1. Nouveauté (N) :

Aucun des documents ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques des revendications 1-4, 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'utilisation des composés dérivés de la sphingosine, comme D-érythro-sphingosine 1 - phosphate (SIP) et de composés apparentés (qu'ils soient naturels ou synthétiques) pour le traitement des maladies infectieuses et la prévention des maladies auto-immune.

Par conséquent l'objet de la revendication 1 diffère de D1 en ce qu'il n'est pas la même molécule.

Le problème que la présente invention propose de résoudre est de synthétiser une molécule d'origine marine dérivée de la sphingosine (Z)-2-Amino-docos-9-ene-1, 3, 13,14-tétraol.

La solution à ce problème proposée dans la revendication 1 de la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive pour la raison suivante : les dérivés de la sphingosine, (Z)-2-Amino-docos-9-ene-1, 3, 13,14-tétraol, isolé à partir de l'éponge *Haliclona viscosa* présente une activité antibiotique et antifongique.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-4 n'implique pas 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 demande 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.