

SYNTHESE, CARACTERISATION ET EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE D'UNE SERIE D'ISOXAZOLIDINES

Reçu le 12/04/2009 – Accepté le 13/03/2011

Résumé

Les approches relatives à la synthèse organique, fondées sur des réactions de cycloaddition ont pris ces dernières années une importance considérable. En effet la synthèse des composés hétérocycliques à cinq chaînons tels que les isoxazolidines fait souvent appel à ce type de réactions à partir de dérivés de type nitro ou diazo. Afin d'apporter une contribution à la synthèse de nouvelles biomolécules, une série d'isoxazolidines est synthétisée dans ce travail, à partir de la réaction de cycloaddition dipolaire de la nitro avec l'alcène substitué l'acrylonitrile. Le temps de réaction est estimé par CCM. Les isoxazolidines obtenues sont caractérisées par différentes méthodes physiques et spectroscopiques). L'évaluation de l'activité biologique de trois isoxazolidines vis avis de 15 germes-test est réalisée par utilisation de 3 concentrations différentes du produit, dans la méthode de diffusion dans l'agar. Le test est positif envers plusieurs germes-test (bactéries levures et champignons), et à une concentration de 20 µg par millilitre de milieu de culture pour certains.

Mots clés : isoxazolidine ,cycloaddition 1.3 dipolaire, activité biologique

Abstract

The approaches to organic synthesis based on cycloaddition reactions have taken in recent years considerable importance, indeed, the synthesis of heterocyclic compounds with five members such as isoxazolidines often uses this type of reaction from derivatives of nitro and diazo. To contribute to the synthesis of new biomolecules, a series of isoxazolidines are synthesised in this work, from dipolar cycloaddition of the nitro with the substituted alkene, the acrylonitrile. The reaction time is estimated by TLC, the isoxazolidines obtained are characterized by different physical and spectroscopic methods. The evaluation of the biological activity by the agar diffusion, with 15 germ-test (Gram+ and Gram- bacteria and yeast and fungi) is performed by using three different concentrations of the product. The results are to several germ-test and with a concentration of 20 µg/mL of culture medium for someones.

Keywords : isoxazolidines, 1.3 dipolar cycloaddition, biological activity

F. BOUTALEB AIT MEHDI¹
A. ZEGHDAOUI²
A. ZITOUNI¹
H. BOUZIANE²

¹ Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse. Ecole Normale Supérieure, BP 92, Vieux Kouba, Alger, Algérie.

² Laboratoire N-Corps et structure de la matière ENS Kouba. Alger. Algérie.

ملخص

أخذ الاصطناع العضوي الذي يشمل تفاعلات الضم الحلقي 1.3 ثنائي القطبية اهتماما كبيرا في السنوات الأخيرة. حقيقة، يستعمل اصطناع المركبات الحلقية غير المتجانسة ذات خمسة أطراف مثل الايزوكسازوليدينات ، هذا النوع من التفاعل انطلاقا من مستبدلات النيترون و المركبات ديازو. لغرض توسيع مكتبة المركبات ذات فعالية بيولوجية، قمنا في عملنا هذا باصطناع و تنقية ، ثم تمييز سلسلة من الايزوكسازوليدينات باستعمال مختلف الطرائق الفيزيائية و الطيفية. بعد ذلك، قمنا بتقويم الفعالية البيولوجية لثلاثة ايزوكسازوليدينات تجاه خمسة عشر نوع من الجراثيم وفق طريقة التبعثر في وسط يحتوي على الأغار باستعمال تراكيز مختلفة للمادة المحضرة. بينت هذه الدراسة أن للايزوكسازوليدينات المحضرة فعل بيولوجي مهاجم لمختلف الجراثيم و عند تركيز يساوي 20 ميكروغرام في المليلتر من الوسط الجرثومي .

الكلمات المفتاحية : ايزوكسازوليدين ، تفاعلات الضم الحلقي 1.3 ثنائي القطبية ، الفعالية البيولوجية

L'addition des alcènes aux nitrones, appelée aussi réaction de cycloaddition 1, 3 dipolaire donne des isoxazolidines (1) (2)

Ces derniers sont fréquemment utilisées dans la synthèse des alcaloïdes et des produits naturels, aussi, on les retrouve dans les composés hétérocycliques biologiquement actifs, tels que les drogues stéroïdiennes anti-inflammatoires⁽³⁾, les antibiotiques β lactames⁽⁴⁾, et d'autres (5).

La majorité de ces composés hétérocycliques biologiquement actifs comportent dans leur cycle des atomes d'azote et d'oxygène, comme c'est le cas dans les molécules des isoxazolidines, pour cela l'objectif de ce travail est d'apporter une contribution à la synthèse de nouvelles biomolécules par une évaluation de l'activité biologique de trois isoxazolidines synthétisées par action d'oléfines sur des nitrones, vis avis de 16 germes-tests par utilisation de trois concentrations différentes du produit.

PARTIE EXPERIMENTALE

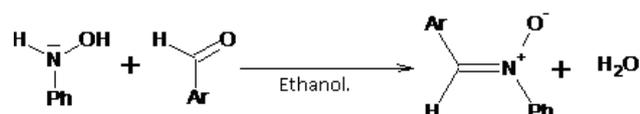
Procédure générale de la synthèse des nitrones

Préparation de la N-phénylhydroxylamine:

La N-phénylhydroxylamine est obtenue par réduction du nitrobenzène par le zinc en poudre à température ambiante (7).

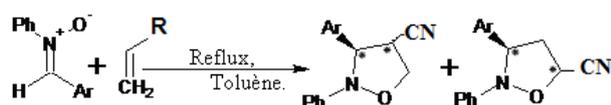
Synthèse des nitrones

Toutes les nitrones sont obtenues par condensation des aldéhydes appropriés avec la N-phénylhydroxylamine (7) (éq.1).



Procédure générale de la synthèse des isoxazolidines

Les isoxazolidines sont synthétisées à partir de la réaction de cycloaddition dipolaire de la nitrone avec l'alcène substitué l'acrylonitrile (éq.2) :



- 1-Ar: ph
- 2-Ar: pFph
- 3-Ar: pOHph
- 4-Ar: furyl

La nitrone appropriée est dissoute dans le toluène et l'acrylonitrile est ajouté. Le mélange réactionnel est maintenu sous reflux, et suivi par CCM. La concentration de la solution sous vide donne le produit (huile), qui est

crystallisé dans le mélange (CH₂Cl₂/C₅H₁₂), et recristallisé dans le méthanol.

Les caractéristiques des réactions et celles des cycloadduits sont rassemblées dans le tableau (1).

Tableau (1) : conditions opératoires de la synthèse des isoxazolidines.

Isoxazolidine	Ar	Formule brute	solvant	Temps réaction	Pf (°C)	Rdt (%)
1'	Ph	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O	Toluène	1H	61,5-62	75,8
2'	pOHPh	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	Toluène	2H	//	TF
3'	pFPh	C ₁₆ H ₁₃ N ₂ OF	Toluène	2H	65-66	57
4'	Furyle	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₂	Toluène	3H	106,2-107	67

TF: Très faible

Partie biologique

Les germes-test sont obtenus à partir de collections de culture conservée au Laboratoire de Microbiologie (ENS KOUBA). Les germes-test sont:

Bactéries (Gram+): *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*.

Bactéries (Gram-): *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Salmonella enterica*, *Streptococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, *Listeria monocytogenese*

Levures : *Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*

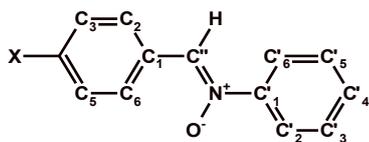
Moisissures : *Mucor ramanniamus*.

L'évaluation de l'activité biologique est déterminée par la méthode de diffusion dans l'agar (8) pour chaque isoxazolidine, les dilutions sont réalisées et ajoutées à la gélose nutritive qui est coulée dans les boîtes de Pétri. Les concentrations utilisées sont 20, 40 et 75 µg/ ml. Après solidification de la gélose, des spots (2µl) contenant approximativement 10⁶ CFU de chaque germe-test sont inoculés. Un milieu témoin (sans isoxazolidine) est réalisé.

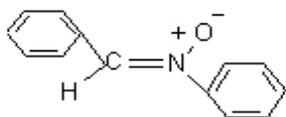
Les boîtes sont ensuite portées à 4°C de manière à laisser le produit diffuser tout en inhibant la croissance du germe. Elles sont ensuite incubées à 30°C. La lecture se fait après 24 à 48H d'incubation en comparaison avec le milieu témoin.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les caractéristiques des nitrones synthétisées sont :



*C,N-diphenylnitrone: (1)

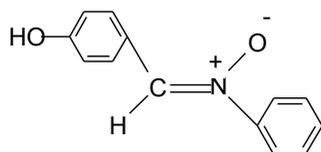


Rt: 60%; Pf: 112°C

UV (λ max (nm)) : (E₁:204; E₂:228,5; K:307,25)

IR (KBR): ν (cm⁻¹): 1063,4 (N→O), 1504,6 (C=N)

*C-(4hydroxyphenyl)-N-phenylnitrone: (2)



Rt : 68%, Pf : 231°C (décomposition)

UV (λ max (nm)) : (E₁:203,88; E₂:226,11; K:312,22)

IR (KBR): ν (cm⁻¹): 1056,9 (N→O), 1573,8 (C=N), 1168,8 (C—O)

RMN ¹H ((CDCl₃) : δ (ppm)= 7,86(s, 1H, H''); 8,37(dd, 2H-2,6); 7,88(dd, 2H-2',6');

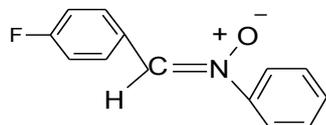
6,87(d, 2H-3,5); 7,5(m, 3H-3',4',5'), 7,49(H-OH)

RMN ¹³C (DMSO-d₆) : δ (ppm)= 133,42 (C'' (CH)); 129,22 (C-1); 129,53 (C-2,6

(CH)); 129,18 (C-3, 5(CH); 156,85 (C-4); 148,62 (C-1'); 115,47 (C-2', 6'(CH));

122,81 (C-3', 5'(CH)); 131,39 (C-4' (CH))

*C-(4fluorophenyl)-N-phenylnitrone: (3)



Rt: 71%, Pf: 139,5°C

UV (λ max (nm)) : (E₁:205,78; E₂:224,21; K:332,10)

IR (KBR): ν (cm⁻¹): 1072,3 (N→O), 1550 (C=N), 840,9 (C—F)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ (ppm)= 7,91(s, 1H, H''); 8,45(dd, 2H-2,6); 7,75(dd, 2H-2',6');

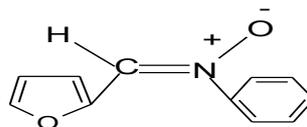
7,46(d, 2H-3,5); 7,47(m, 3H-3',4',5')

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ (ppm)= 133,31 (C'' (CH)); 129,98 (C-1); 131,33 (C-2,6(CH));

131,22 (C-3, 5(CH)); 115,65 (C-4); 129,19 (C-1'); 121,69 (C-2', 6'(CH)); 115,94 (C-3', 5'(CH));

133,28 (C-4' (CH))

*C-(furyl)-N-phenylnitrone: (4)



Rt : 59%, Pf: 84°C

UV (λ max (nm)) : (E₁:205,30; E₂:223,33; K:328,88)

IR (KBR): ν (cm⁻¹): 1068,5 (N→O), 1542,9 (C=N),

RMN ¹H ((CDCl₃) : δ (ppm)= 8,16(s, 1H, H''); 7,82(H-2); 7,59(dd, 2H-2',6');

8,01(d, 2H-3,5); 7,48(m, 3H-3',4',5')

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ (ppm)= 144,61 (C'' (CH)); 129,93 (C-1); 129,16 (C-2,3

(CH)); 147,30 (C-4); 147,52 (C-1'); 116,47 (C-2', 6'(CH)); 124,26 (C-3', 5'(CH)); 121,03 (C-4' (CH))

D'après l'analyse UV-Visible, trois bandes d'absorption E₁, E₂ et K sont observées, ceci est conforme avec la littérature⁽⁶⁾. Les bandes E₁ et E₂ sont situées entre 200 et 265 nm, quant à la bande d'absorption K, elle est intense et située entre 307 et 360 nm, elle est caractéristique des nitrones.

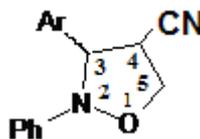
D'après l'analyse FTIR, on note l'absence de la bande d'absorption située entre 1695 et 1715 cm⁻¹, due à l'élongation de la liaison C=O du benzaldéhyde, et l'apparition des pics entre 1560 et 1620 cm⁻¹, caractéristique de la liaison C=N. De plus, des bandes intenses entre 1070 et 1280 cm⁻¹ sont attribuées à la liaison N-O.

L'étude par spectroscopie RMN ¹H a montré : en plus des pics associés aux protons aromatiques, on distingue entre 7,8 et 8,2 ppm, un seul pic associé au proton du carbone de la fonction nitrone sous forme de singulet, ce qui confirme la formation d'un seul isomère Z.

-Les spectres RMN ¹³C, présentent tous un seul pic attribué au carbone de la fonction nitrone C'', cela confirme aussi la formation d'un seul isomère Z.

Les résultats de la caractérisation des isoxazolidines sont :

*5-cyano-2,3-diphenyl isoxazolidine : (1')



Ar : ph

Rt : 75,8%, Pf : 61,5-62°C

Rf : 0,32 – 0,43 – 0,48 – 0,53 (CCM sur plaque de gel de silice, éluant: diéthyléther - éther de pétrole (50/50 %) (V/V))

UV (λ max (nm)) : (E₁:210,0; E₂:238,5)

IR (KBR): ν (cm⁻¹)=1037,8(N—O), 1089,6(C—N), 1185,3(C—O),2242,0(C≡N)
 RMN ¹H(CDCl₃) : δ (ppm)= 2,1(m,2H,H-4); 4,04(m,2H,H-3 et H-5); 7,5→6,9 (m ,10H Aromat.)

*5-cyano -3-(4-hydroxyphenyl) -2-phenyl isoxazolidine: (2')

Ar : pOHph

UV (λ max (nm)) : (E₁:206,5;E₂:230,5)

IR (KBR): ν (cm⁻¹)=1039,9(N—O), 1088,2(C—N), 1183,6(C—O) , 2248,2(C≡N)

RMN ¹H(D₂O+NaOD) : δ (ppm)= 2,5(m,2H,H-4); 4,5(m,1H,H-3) ; 4,79(s,1H,H-5); 7,7→6,3 (m ,9H Aromat.)

*5-cyano-3-(4-fluorophenyl)- 2-phenyl isoxazolidine: (3')

Ar : pFph

Rt: 66%, mp:65-66°C

Rf: 0,15- 0,25 -0,3- 0,37 (CCM sur plaque de gel de silice, éluant: diéthyléther - éther de pétrole (50/50 %) (V/V))

UV (λ max (nm)) : (E₁:208,5;E₂:238,5)

IR (KBR): ν (cm⁻¹)=1029,7(N—O), 1086,3(C—N), 1182,6(C—O),2256,1(C≡N)

RMN ¹H(CDCl₃) : δ (ppm)= 2,7(m,2H,H-4); 4,9(s,1H,H-3) ;5(m,1H,H-5);

7,6→6,9(m ,9H Aromat.)

*5-cyano -3-(furyl)- 2-phenyl isoxazolidine: (4')

Ar : furyle

Rt: 67%, Pf: 106,2-107°C

Rf: 0,2 - 0,5 (CCM sur plaque de gel de silice, éluant: diéthyléther - éther de pétrole (50/50 %) (V/V))

UV (λ max (nm)) : (E₁:206)

IR (KBR): ν (cm⁻¹)=1044,5 (N—O), 1073,1 (C—N), 1170,7 (C—O), 2240,9 (C≡N)

RMN ¹H (CDCl₃) : δ (ppm)= 2,1 (m, 2H, H-4); 4,1(m, 2H, H-3 et H-5); 6,1→7,3(m ,8H Aromat.)

D'après l'analyse par spectroscopie UV, on note l'absence de la bande d'absorption K des nitrones.

D'après l'analyse par spectroscopie IR, on note l'absence de la bande d'absorption vers 1540 cm⁻¹, due à l'élongation de la liaison C=N de la fonction nitrone, et l'apparition d'une bande d'absorption attribuées à la vibration d'élongation de la liaison C-N vers 1080 cm⁻¹, ainsi qu'une bande d'absorption attribuée à la vibration d'élongation de la liaison C≡N entre 2242 et 2256 cm⁻¹.

L'étude par spectroscopie RMN ¹H a montré des pics associés aux protons aromatiques de 6 à 7,7 ppm, on distingue aussi de 2 à 5,7 ppm un spectre complexe attribué aux protons du cycle isoxazolidine. Il y a à signaler que cette étude a montré des spectres complexes à cause de la présence d'isomères.

Activité antimicrobienne

Les résultats de l'étude obtenue par la méthode de diffusion dans l'agar sont donnés dans le tableau 2.

Tableau (2): Concentration de l'isoxazolidine (μ g / ml) donnant un test positif.

	germe test	I 2'	I 3'	I 4'
Bactéries (Gram+)	<i>B. subtilis</i>	20	/	50
	<i>M. luteus</i>	/	20	20
	<i>S. aureus</i>	/	/	75
Bactéries (Gram-)	<i>A. tumefaciens</i>	/	20	75
	<i>E. coli</i>	75	75	20
	<i>K. pneumoniae</i>	/	/	/
	<i>P. aeruginose</i>	/	/	/
	<i>P. syringae</i>	20	75	20
	<i>S. enterica</i>	20	20	20
	<i>S. faecalis</i>	/	/	/
	<i>S. marcescens</i>	/	/	/
	<i>L. Monocytogenes</i>	/	/	20
Levures	<i>C. albicans</i>	75	/	50
	<i>K. lactis</i>	//	/	/
	<i>S. Cerevisiae</i>	20	20	20
Moisissures	<i>M. ramanniamus</i>	75	20	20

I : Isoxazolidine

Les isoxazolidines 2', 3' et 4' ont un effet inhibiteur commun sur :

*la bactérie (Gram+) : *M. luteus*

*les bactéries (Gram-) : *P. syringae*, *P. aeruginose*, *E. coli*

*la levure : *S. cerevisiae*

*la moisissure : *M. ramanniamus*

Les trois isoxazolidines inhibent la levure: *Saccharomyces Cerevisiae* à 20 μ g / ml.

Les isoxazolidines 3'et 4' inhibent aussi, la bactérie *Micrococcus luteus* et le champignon *Mucor ramanniamus* à 20 μ g / ml.

L'isoxazolidine 3' inhibe la bactérie *A. tumefaciens* à 20 μ g / ml.

L'isoxazolidine 2' inhibe aussi, la bactérie *B. subtilis* à 20 μ g / ml.

Seules les bactéries *K. pneumoniae*, *P. aeruginose* *S. faecalis*,*S. marcescens* et la levure *K. lactis* sont résistantes à l'action des isoxazolidines étudiées.

CONCLUSION

Les isoxazolidines synthétisées sont caractérisées, et leurs structures sont confirmées par les méthodes physicochimiques (UV, IR, AE, RMN¹H), leurs activités antimicrobiennes vis à vis de 11 germes-tests :bactéries (gram+ et gram-), levures et moisissures sont mises en évidence par la méthode de diffusion dans l'agar, et ce, pour de faibles concentrations .Les résultats sont prometteurs et ouvrent des perspectives dans la synthèse de nouvelles biomolécules.

REFERENCES

- [1]-S.Promod Pandey and k.Inder Pandey, Tetra. Lett. Vol. 38, N°41, 7237-7240, (1997). [5]-P.N.Confalone, G.Pizzolato, J.Am.Chem.Soc.102, 1954,(1980).
- [2]-M.Cacciarini,F.M.Cordero,C.Faggi,et A.Goti,Molécules,5,637,(2000). [6]-M.J.Kamlet, et L. A. Kaplan,Notes 22,576,(May 1957)
- [3]-T.Kwon,A.S.Heiman,E.T.Oriaku, J.Med.Chem.,38,1048,(1995). [7]-S.Franco, F.L. Merchan, P.Merino, T.Tejero, Synth., Commun.,25,2275-2284,(1995).
- [4]-J.J.Tufariello,D.J.P.Pinto,Tetrahedron Lett.,(1987),Vol.28,45,5481-54. [8]-K.A.Hammer,C.F.Carson and T.V.Riley, Journal of Applied Microbiology,86,985-990 (1999)