

MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE DEUX SERIES DE NITRONES ET D'ISOXAZOLIDINES SYNTHETISEES

Reçu le 26/11/2007– Accepté le 11/11/2008

Résumé

Différentes nitrones ont été synthétisées et caractérisées par des méthodes physiques et spectroscopiques. Ces nitrones ont été utilisées dans la synthèse d'une série d'isoxazolidines par la méthode classique. Les différentes analyses effectuées sur ces dernières ont montré qu'elles se trouvent sous forme de mélanges de quatre isomères. Des tests biologiques préliminaires de ces nitrones et des isoxazolidines correspondantes sur cinq germes cibles dont deux champignons (*Mucor ramannianus* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*) et trois bactéries (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) ont été effectués. Les résultats obtenus ont montré que ces composés chimiques présentent une bonne activité antifongique.

Mots clés : nitrone, isoxazolidine, stéréoisomère, bactéries, champignons, effet antifongique.

Abstract

Different nitrones were synthesized and characterized by different physical and spectroscopic methods. These nitrones were used in the synthesis of the corresponding isoxazolidines by the classical method. Different analysis showed that these isoxazolidines are as mixtures of four isomers. Preliminary biological tests of nitrones and their corresponding isoxazolidines were made on five targeted germs: two fungi (*Mucor ramannianus* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*) and three bacteria (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*). The results showed that nitrones as well as the isoxazolidines have significant antifungal effect.

Keywords: nitrone, isoxazolidine, stereoisomer, bacteria, fungi, antifungal effect.

H. KAHINA¹
A. TOUATI
A. AIT YAHIA
A. MEKLAT

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

ملخص

قمنا بتحضير و تنقية و تحليل، بالطرق الفيزيائية والطيفية، مجموعة من النيترونات. إنطلاقاً من هذه الأخيرة، قمنا بتحضير سلسلة من الإيزوكسازوليدينات في الوسط الكلاسيكي. بين تحليل هذه الأخيرة بأنها توجد على شكل مزيج من أربعة إيزوميرات. مجموعة من التجارب البيولوجية الأولية على النيترونات المحضرة و الإيزوكسازوليدينات الموافقة لها تم القيام بها على مجموعة من الجراثيم إثنان منها فطرية (*Mucor ramannianus* و *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*) و ثلاثة أخرى بكتيرية (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, و *Escherichia coli*). بينت هذه الدراسة أن هذه النيترونات و الإيزوكسازوليدينات تمتاز بخواص مضادة للفطريات جيدة.

الكلمات المفتاحية: نيترون، إيزوكسازوليدين، ستريوازومير، بكتيريا، فطريات، فعل مضاد للفطريات.

L'augmentation de la résistance aux agents antimicrobiens s'est récemment accélérée avec l'augmentation de l'utilisation des antibiotiques. En même temps, les antibiotiques nouveaux commercialisés se font rares. Nous sommes donc confrontés à une situation de vulnérabilité d'où peut émerger à tout moment une bactérie pathogène épidémique et sans solution thérapeutique [2]. Afin de contrebalancer l'évolution de cette résistance, la communauté scientifique est amenée à découvrir sans cesse de nouveaux antibiotiques et d'en faire une utilisation intelligente. Cela peut être réalisé, entre autres, par des méthodes classiques, en recherchant de nouvelles substances bioactives naturelles, en exploitant la chimie combinatoire et/ou en recherchant de nouvelles cibles [3-4].

L'utilisation de la chimie combinatoire permet de synthétiser de nouvelles molécules, soit en modifiant des antibiotiques connus, soit par synthèse totale de nouvelles molécules. Ces nouvelles molécules permettraient de minimiser les risques de développement de résistance [5].

Les nitrones sont des composés dipolaires qui contiennent le groupement azométhine N-Oxide ($C=N^+-O^-$). Elles occupent une importante place dans la chimie organique [6]. Elles représentent des composés intermédiaires de beaucoup de produits d'intérêt biologique [7, 8]. Elles présentent aussi l'habileté d'incorporer différents stéréocentres en une seule étape de cycloaddition avec différents dipolarophiles.

L'activité antimicrobienne de certaines nitrones est déjà rapportée dans la littérature [9]. On cite comme exemple, les composés quinoléines N-oxide disubstitués testés par Coutts et al. (fig 1) [10]. Ces auteurs ont montré que ces composés possèdent des propriétés inhibitrices de la croissance des bactéries et ont ainsi déterminé pour une pour une série de cinq nitrones la concentration minimale d'inhibition (CMI) contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

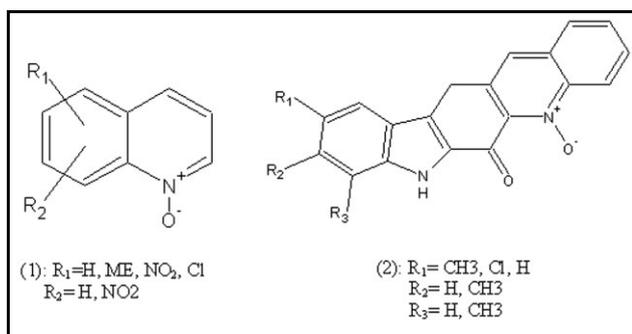


Figure 1 : Structure des nitrones testées. (1) : réf [10] ; (2) : réf [11]

Par ailleurs, une autre série de nitronne (fig1-2) a été synthétisée par Danish et al. [11]. Comparés aux molécules standards antibactériennes (furacine) et antifongiques (carbendazim), ces composés ont montré qu'ils ont une meilleure activité antibactérienne et antifongique sur les germes utilisés tels que *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas*

aeruginosa (ATCC 9027), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Aspergillus niger* (ATCC 16404), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Alternaria macrospora* et *Fusarium oxysporum*. Cette bonne activité est attribuée à la présence de la fonction N-oxide.

Les isoxazolidines constituent aussi une importante classe de composés bioactifs. Elles sont très connues pour leur activité anti-inflammatoire [12]. Ces composés sont considérés comme des précurseurs d'acides aminés. Dans des conditions appropriées, les isoxazolidines peuvent donner des acides aminés hydroxylés et des alcools β -aminés qui rentrent dans la préparation d'une grande variété de composés bioactifs [13]. Les isoxazolidines peuvent aussi être utilisées dans la fabrication de médicaments antiviraux [14]. Aussi, plusieurs auteurs ont rapporté l'activité antimicrobienne des isoxazolidines et ont montré que ces derniers sont de très bons antifongiques et antibactériens que se soit contre les bactéries à Gram positif ou négatif [15, 16, 17].

Nous nous sommes intéressés dans notre travail à la synthèse de nouvelles nitrones aromatiques (fig. 2-a) et leurs isoxazolidines correspondantes (fig. 2-b) qui pourraient présenter potentiellement des propriétés biologiques intéressantes.

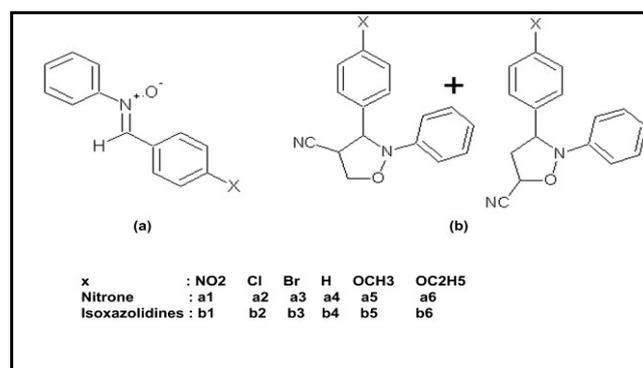


Figure 2 : Structure des nitrones (a) et d'isoxazolidines (b) synthétisées

Des tests biologiques préliminaires de ces composés sur cinq germes cibles dont deux champignons (*Mucor ramannianus* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*) et trois bactéries (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) ont été ensuite effectués.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Les spectres UV-Visible des nitrones ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, de marque SCHIMADZU 160 à doubles faisceaux. Les spectres FTIR sont enregistrés à température ambiante, en pastille de KBr sur un appareil de marque PERKIN ELMER 550. Les spectres de masse en impact électronique (IE) sont réalisés à l'aide d'un appareil de marque NERMAG R 10-10 et ceux de RMN 1H et ^{13}C (dans le DMSO deutérié) sont obtenus à l'aide d'un appareil de marque Bruker AC 200.

Les points de fusion des nitrones et d'isoxazolidines synthétisées sont mesurés à l'aide d'un appareil de marque Büchi 512 à bain d'huile.

Synthèse des nitrones

Les nitrones sont préparées par condensation de la phénylhydroxylamine sur des aldéhydes aromatiques. La synthèse de l'hydroxylamine est réalisée selon le mode opératoire décrit dans la référence [18]. Les caractéristiques physiques et spectrales ainsi que le rendement en hydroxylamine obtenue sont données dans le tableau 1.

Tableau 1: Caractéristiques physiques et spectrales et rendement (Rdt) en phénylhydroxylamine

Aspect et couleur	Rdt ¹ (%)	R _f ²	P _r ³ (°C)	UV
Cristaux blancs	57	0,52	82	λ _{max} : 240 nm ε _{max} : 26240

La synthèse des nitrones aromatiques a été réalisée comme suit :

A une solution de 0,018 mole d'aldéhyde approprié dans l'éthanol (50 mL), on ajoute une solution de 2 g (0,018 mole) de β-phénylhydroxylamine dans l'éthanol (50 mL). Ce mélange est chauffé à reflux pendant 3 h. On laisse décanter à température ambiante. On filtre et on récupère un composé solide. Ce dernier est recristallisé dans l'acétate d'éthyle. On obtient la nitrone attendue sous forme de cristaux ou de poudre.

Synthèse des isoxazolidines

À une solution de 0,005 mole de nitrone dans 50 mL de toluène, on ajoute une solution de 0,1 mole d'acrylonitrile dans 50 mL de toluène. Le mélange est chauffé à reflux pendant 12 h. Après évaporation du solvant, on obtient un liquide visqueux, lequel est traité avec de l'éther de pétrole. Après refroidissement, on obtient un composé solide qui, une fois séché, sera purifié par recristallisation dans un mélange de 20% de dichlorométhane et 80% de pentane.

Analyses physiques et spectroscopiques

Les nitrones et isoxazolidines obtenues ont été caractérisées par les différentes méthodes physiques et spectroscopiques (UV, IR, spectroscopie de masse, RMN ¹H, RMN ¹³C, analyse élémentaire et point de fusion). Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux 3 et 4.

Souches de microorganismes cibles

Des tests biologiques préliminaires de la série de nitrones et d'isoxazolidines synthétisées sont effectués sur cinq germes cibles, dont deux champignons

(*Mucor ramannianus* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*) et trois bactéries (*Bacillus subtilis*, Gram positif; *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, Gram négatif). Les références et les pathologies de ces germes-cibles sont données dans le tableau 2.

Tableau 2: Références et pathologies des microorganismes test utilisés

Germes-tests	Référence des souches	pathologies [19]
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Non pathogène
<i>Escherichia coli</i>	CIP 54.8	- Infections intestinales et urinaires. - Méningites néonatales.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP A 22	-Infections cutanées -Infection des plaies de brûlures -Broncho-pneumonies -Infection du tractus digestif -Endocardites, infections urinaires, oculaires et méningées.
<i>Mucor ramannianus</i>	NRRL 6606	Mucoromycoses opportunistes
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i>	I.N.R.A. de Dijon (France)	Responsable de la fusariose du lin

Mise en évidence de l'activité antibiotique des nitrones et des isoxazolidine

Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est l'ISP2, préconisé par Shirling et Gottlieb [20] lors de l'International *Sreptomycetes* Project. Sa composition est la suivante: 4 g d'extrait de levure, 10 g d'extrait de malt, 4 g de glucose, 20 g d'agar, 1000 mL d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 7,2 avant stérilisation. Celle-ci est réalisée à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

Obtention des précultures et ensemencement

Des tubes contenant 3 mL d'ISP2 liquide sont ensemencés par des germes cibles puis incubés à 30°C pendant 24 h pour les bactéries et 48 h pour les champignons.

Chaque préculture (bien homogénéisée à l'aide d'un vortex) est ajoutée aseptiquement à un flacon contenant 100 mL du milieu de culture ISP2 en surfusion, lequel est coulé dans des boîtes de Pétri stériles à raison de 20 mL par boîte.

Antibiographie

Lors des tests d'antibiose par la méthode des disques en papier imprégnés, ceux-ci doivent être stérilisés aux rayons UV (à 254 nm pendant 45 min) avant d'être déposés aseptiquement à la surface du milieu de culture déjà ensemencé par le germe cible. Or, il est décrit dans la littérature que les nitrones sont très sensibles aux rayons UV [21]. Pour étudier l'effet de ces rayons sur cette activité, on a suivi deux procédures.

Tableau 3 : Masse molaire (MM), rendements (Rdt), points de fusion (P_f), rapports frontaux (R_f), compositions en C, H, N et caractéristiques spectrales en UV-Visible, infrarouge (IR) et en spectroscopie de masse en impact électronique (SM), RMN ¹H et RMN ¹³C des nitrones synthétisées.

(1):Poudre jaune, (2): Cristaux blancs, (3):Poudre blanche, (a):CCM plaque de silice, éluant :diéthyléther-éther de pétrole (50/50%)v/v), (b): en pastilles de KBr, (c): dans le méthanol (10⁻⁴ mol/L) à 25°C

Nitronne	X	MM (g)	Rdt (%)	P _f (°C)	R _f (a)	AE (%)		UV-Visible (c)		IR (b) (cm ⁻¹)	SM (m/z)		RMN ¹ H (d) δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹³ C δ (ppm), J(Hz)
						Théorique	Expérimental	λ _{max} (nm)	ε		M ⁺	Pic de base		
I ⁽¹⁾	NO ₂	242.230	79	191	0,32	C:64.46 H:4.16 N:11.56	C:63.53 H:3.81 N:11.52	351.5 265.0 203.5	20660 9600 19620	(N-O):1074.5 (C=N):1595.4 (C-X):1342.0 -1510	242	91	8.10 (H, H ¹ -S) 8.56 (2H, H-2', 6'-dd) 7.80 (2H, H-2', 6'-dd) 8.35 (2H, H-3, 5-d) 7.56-7.51 (3H, H-3', 4', 5'-m)	132.3(CH, C ¹), 136.21(C, C-1), 129.40(CH, C-2, 6) 123.94(CH, C-3, 5), 148.00(C, C-4), 148.92(C, C-1'), 121.73(CH, C-2', 6'), 129.23 (CH, C-3', 5'), 130.74 (CH, C-4')
II ⁽²⁾	Cl	231.677	76	157	0,35	C: 67.33 H: 4.33 N: 6.04	C: 67.00 H: 4.28 N: 6.18	319.0 256.5 204.0	26020 7160 18920	(N-O) :1072.3 (C=N):1542.9 (C-X):840.9	231	91	7.92(H, H ¹ -S) 8.39(2H, H-2', 6'-dd) 7.78(2H, H-2', 6'-dd) 7.43(2H, H-3, 5-d) 7.50(3H, H-3', 4', 5'-m)	133.37(CH, C ¹), 129.22(C, C-1), 129.45(CH, C-2, 6) 129.18(CH, C-3, 5), 136.34(C, C-4), 148.92(C, C-1'), 121.68(CH, C-2', 6'), 128.92(CH, C-3', 5'), 129.63(CH, C-4')
III ⁽³⁾	Br	276.129	71	162	0,34	C:56.55 H:3.65 N:5.07	C:56.41 H: 3.42 N: 5.21	319.5 258.5 203.5	25420 6650 17970	(N-O) :1072.3 (C=N):1542.9 (C-X):686.6	276.1	293.2	7.9(H, H ¹ -S) 8.30(2H, H-2', 6'-dd) 7.75(2H, H-2', 6'-dd) 7.60(2H, H-3, 5-d) 7.48(3H, H-3', 4', 5'-m)	133.43(CH, C ¹), 129.57(C, C-1), 131.89(CH, C-2, 6) 130.30(CH, C-3, 5), 124.78(C, C-4), 148.95(C, C-1'), 121.67(CH, C-2', 6'), 129.23 (CH, C-3', 5'), 130.14 (CH, C-4')
IV ⁽²⁾	H	197.233	68	125	0,31	C: 79.09 H: 5.57 N: 7.09	C: 78.80 H: 5.45 N: 7.37	312.5 230.5 203.5	21890 10840 18410	(N-O) :1063.4 (C=N):1504.6	197	91	7.49 (H, H ¹ -S) 8.42 (2H, H-2', 6'-dd) 7.80 (2H, H-2', 6'-dd) 7.50 (2H, H-3, 5-d) 7.42 (3H, H-3', 4', 5'-m)	134.57(CH, C ¹), 131.99(C, C-1), 129.74(CH, C-2, 6), 129.09(CH, C-3, 5), 130.99(C, C-4), 149.08(C, C-1') 122.35(CH, C-2', 6'), 129.67(CH, C-3', 5') 130.67 (CH, C-4')
V ⁽²⁾	OCH ₃	227.259	59	120	0,19	C:73.99 H:5.77 N:6.16	C:74.01 H:5.78 N:6.10	330.0 237.5 203.0	26710 10050 18330	(N-O) :1064.6 (C=N):1550.7 (C-X):1257.5	227	212.3	7.865(H, H ¹ -S) 8.41(2H, H-2', 6'-dd) 7.77(2H, H-2', 6'-dd) 7.01(2H, H-3, 5-d) 7.44(3H, H-3', 4', 5'-m) 3.88(3H, CH ₃)	134.1(CH, C ¹), 123.78(C, C-1), 131.6(CH, C-2, 6), 114.4(CH, C-3, 5), 161.53(C, C-4), 148.95(C, C-1') 121.65(CH, C-2', 6'), 129.11(CH, C-3', 5') 129.62(CH, C-4'), 55.7(CH ₃)
VI ⁽²⁾	OC ₂ H ₅	241.285	58	135	0,23	C:74.67 H:5.81 N:6.27	C:74.67 H:5.81 N:6.35	331.5 237.5 202.5	27830 10400 19480	(N-O) :1063.9 (C=N):1553.6 (C-X):1256.9	241	242.2	7.86(H, H ¹ -S), 8.43(2H, H-2', 6'-dd) 7.8(2H, H-2', 6'-dd) 7.00(2H, H-3, 5-d) 7.48(3H, H-3', 4', 5'-m) 4.15(2H, CH ₂) 1.47(3H, CH ₃)	134.24 (CH, C ¹), 123.58(C, C-1), 131.18 (CH, C-2, 6) 114.51 (CH, C-3, 5), 160.98(C, C-4), 148.97(C, C-1') 121.66 (CH, C-2', 6'), 129.10 (CH, C-3', 5') 129.59 (CH, C-4'), 14.71 (CH ₂), 63.65 (CH ₃)

Tableau 4 : Masse molaire (MM), rendements (Rdt), points de fusion (P_f), rapports frontaux (R_f), compositions en C, H, N et caractéristiques spectrales en UV-Visible, infrarouge (IR) et en spectroscopie de masse en impact électronique (SM) des isoxazolidines synthétisées.

(1):huile, (2):pâte blanche, (3):cristaux incolores, (a): CCM plaque de silice, éluant :diéthyléther-éther de pétrole (50/50%)v/v), n pastilles de KBr, (c): dans le méthanol (10⁻⁴ mol/L), (d):non identifié 25°C

Isoxazolidine	X	MM (g)	Rdt (%)	P _f (°C)	R _f (a)	AE (%)		UV-Visible (c)		IR (b) (cm ⁻¹)	SM (m/z)	
						Théorique	Expérimental	λ _{max} (nm)	ε		Pic de base	Pic Mol
I ⁽¹⁾	NO ₂	295.293	69	112	0.33 0.43 0.58 0.68	C:65.08 H:04.44 N:14.23	C:65.38 H:04.59 N:14.33	265 203	324 851	(C-N): 1110.9 (C-O): 1257.5 (N-O): 1033.8 (C-X): 1342.4 (C≡N): 2445.6	91	295
II ⁽²⁾	Cl	284.740	48	105	0.5 0.63 0.75 0.81	C: 67.33 H: 04.33 N: 06.04	C: 67.00 H: 04.28 N: 06.18	225 204	345 1499	(C-N): 1087.8 (C-O): 1257.5 (N-O): 1041.5 (C-X): 840.9 (C≡N): 2360.7	284	284
III ⁽²⁾	Br	329.191	46	140	0.5 0.61 0.75 0.81	C:58.38 H:03.98 N:08.51	C:58.15 H: 03.94 N: 0 8.65	226 202	355 824	(C-N): 1069.6 (C-O): 1256.6 (N-O): 1050.0 (C-X): 896.0 (C≡N): 2428.57	77	328
IV ⁽³⁾	H	250.295	46	45	0.51 0.61 0.66 0.71	C: 76.78 H: 05.64 N: 11.19	NE ^(d)	238.5 203	179 688	(C-N): 1026.1 (C-O): 1257.5 (N-O): 1026.1 (C≡N): 2241.1	91	250
V ⁽¹⁾	OCH ₃	280.321	39	60	0.43 0.51 0.56 0.58	C: 72.84 H: 05.75 N: 09.99	NE ^(d)	230 202.5	475 967	(C-N): 1110.9 (C-O): 1249.8 (N-O): 1029.9 (C-X): 1300.0 (C≡N): 2245	172	280
VI ⁽¹⁾	OC ₂ H ₅	294.348	31	65	0.48 0.58 0.63 0.66	C: 73.45 H: 06.16 N: 09.52	C: 74.04 H: 06.45 N:0 9.63	230.5 202.5	511 1045	(C-N): 1118.6 (C-O): 1172.6 (N-O): 1049.2 (C-X): 1242.1 (C≡N): 2368.4	77	294

Dans la première, les disques sont d'abord stérilisés puis imbibés aseptiquement par 20, 40 ou 60 µL des solutions de 1 mg de nitrones dans 1 mL de chloroforme, sans que les nitrones ne soient exposées aux rayons UV. Dans la deuxième procédure, les disques sont imbibés avec les mêmes quantités de la même solution puis stérilisés aux rayons UV.

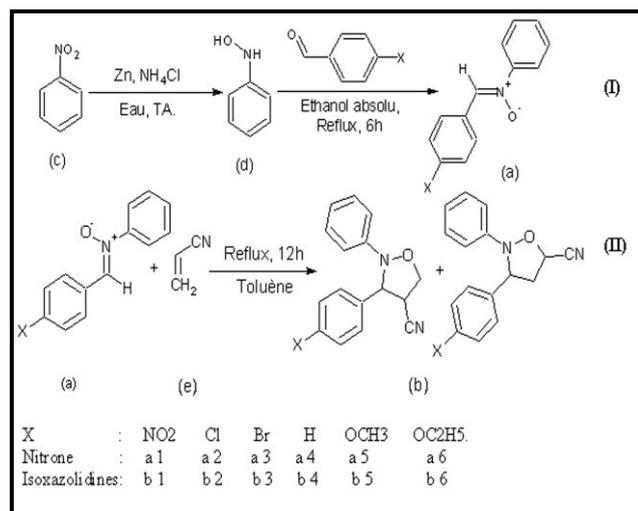
Dans les deux cas, Les disques en papier (Whatman N° 3) de 6 mm de diamètre sont ensuite déposés aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant le milieu ISP2 (à 10 g/L d'agar) préalablement ensemencé par le microorganisme cible. Pour permettre une bonne diffusion des nitrones dans le milieu et une inhibition momentanée de la croissance du germe cible, les boîtes sont placées à 4°C pendant 3 h, puis incubées à 30°C durant 24 h pour les bactéries et 48 h pour les champignons. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de l'auréole d'inhibition.

La série des isoxazolidines synthétisées est aussi testée par antibiographie contre les cinq germes précédents. L'effet des rayons UV sur cette activité n'a pas été étudié car aucun travail n'a rapporté l'effet de ces rayons sur ces composés. Nous avons donc suivi la deuxième procédure.

RESULTATS ET DISCUSSION

Synthèse des nitrones et des isoxazolidines correspondantes

Nous avons synthétisé une série de nitrones (a) par condensation des aldéhydes aromatiques sur la β-phénylhydroxylamine (d). Cette dernière est préparée par réduction du nitrobenzène (c) avec du zinc en poudre en présence du chlorure d'ammonium [18] (fig. 3-I). Ces nitrones ont été purifiées par recristallisation dans l'acétate d'éthyle. La cycloaddition de ces nitrones sur l'acrylonitrile (e) a conduit aux isoxazolidines correspondantes (b), sous forme de mélanges de plusieurs stéréoisomères (fig. 3-II).



Tests microbiologiques

Nitrones

La photo 1 montre à titre d'exemple, les antibiogrammes contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* et

Mucor ramannianus des nitrones testées selon que ces nitrones soient exposées ou non aux rayons UV.

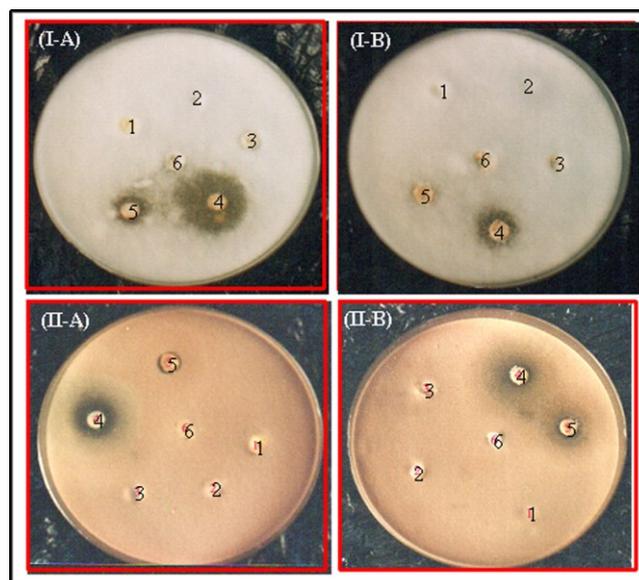


Photo 1: Antibiogramme contre (I) : *Fusarium oxysporum* et (II) : *Mucor ramannianus* des C-aryl, N-phényl nitrones. 1: a-1, 2:a-2, 3: a-3, 4: a-4, 5: a-5, 6: a-6. (A) : nitrones non exposées aux rayons UV. (B) : nitrones exposées aux rayons UV.

Les résultats obtenus dans le cas des nitrones testées sont illustrés dans le tableau 5.

Tableau 5: Zones d'inhibition des champignons obtenues avec les nitrones synthétisées

Type de procédure	Quantité de nitrones déposée par disque (µg)	Zone d'inhibition (mm).			
		<i>Mucor ramannianus</i>		<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i>	
		a-4	a-5	a-4	a-5
Nitrones exposées aux rayons UV	20	11,5 (R)	7 (R)	10 (N)	7 (N)
	40	8 (N)	12 (R)	12 (N)	7 (N)
	60	18 (R)	15 (R)	13 (N)	8 (N)
Nitrones non exposée aux rayons UV	20	9(N)	8 (R)	11 (N)	10 (R)
	40	11 (N)	12 (R)	20 (N)	14 (R)
	60	16 (N)	9 (N)	22 (N)	10 (N)

.Les nitrones a-1, a-2, a-3 et a-6 ne présentent pas d'activité microbiologique. R: ralentissement de la croissance ; N: inhibition nette.

Les résultats de ce tableau montrent que parmi toutes les nitrones testées, seules les nitrones a-4 et a-5 présentent une activité microbiologique et uniquement sur les champignons, alors qu'elles ne présentent aucune activité antibactérienne. Cette activité augmente au fur et à mesure que la concentration augmente. Aussi, nous remarquons que l'activité de la a-4 est meilleure que celle de la a-5, que ce soit contre *Mucor ramannianus* ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*.

Les nitrones exposées aux rayons UV lors de la stérilisation des disques montrent une diminution de leur activité par rapport aux nitrones non exposées; cet effet étant plus net contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Cela se manifeste par une diminution du diamètre de la zone d'inhibition des champignons dans les antibiogrammes préparés selon la première procédure. En effet, en utilisant par exemple, 60 µL par disque de la solution à base de la nitrone a-4 non exposée aux rayons UV, *Mucor ramannianus* est nettement inhibée sur un diamètre de 16 mm. Par contre, lorsqu'on utilise la même concentration en nitrone a-4 exposée aux rayons UV, la croissance de ce champignon est seulement ralentie à un diamètre de 18 mm. La diminution de l'activité de ces nitrones pourrait être attribuée à un changement de structure après exposition aux rayons UV, ce qui pourrait diminuer leur activité biologique.

On note aussi que l'activité de ces nitrones dans les deux cas est persistante. En effet, après un mois d'incubation, aucune diminution du diamètre d'inhibition de la croissance des champignons n'a été observée.

Isoxazolidines

Les résultats des tests d'activité concernant les isoxazolidines sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6: Zones d'inhibition des champignons par les isoxazolidines.

Champignon	Quantité de l'isoxazolidine déposée par disque (µg)	Zone d'inhibition (mm)		
		b-4	b-5	b-6
<i>Mucor ramannianus</i>	60	11 (R)	12 (R)	10 (R)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i>	60	10 (N)	11 (R)	10 (R)

Les isoxazolidines b-1, b-2 et b-3 ne présentent pas d'activité microbiologique. R: ralentissement de la croissance; N: inhibition nette.

Les antibiogrammes montrent que seules les isoxazolidines méthoxylées, éthoxylées et non substituées présentent une activité et comme pour les nitrones, cette activité est sélective sur les champignons. En effet, aucune isoxazolidine n'a présenté une activité antibactérienne.

Ces résultats sont intéressants, particulièrement en ce qui concerne l'activité contre la souche de champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, qui est connue pourtant, pour être résistante à un puissant antifongique qui est le bénomyl [22]. De même, les *Fusarium oxysporum* et les *Fusarium* en général, sont des champignons difficiles à éliminer et responsables de nombreuses maladies chez les plantes [23].

CONCLUSION

Les tests microbiologiques préliminaires montrent que parmi les nitrones synthétisées, seules la nitrone a-4 et a-5 présentent une activité et que cette activité est sélective sur les champignons. Aussi, l'exposition de ces nitrones aux rayons UV diminue leur activité biologique. Parmi les isoxazolidines préparées, seules la b-4, b-5 et b-6 présentent une activité et comme pour les nitrones, celle-ci est sélective sur les champignons uniquement. Dans les études qui sont en cours, nous essayerons d'isoler et d'identifier les différents isomères d'isoxazolidines et de tester ensuite leur activité. Nous essayerons également, de synthétiser de nouvelles nitrones ayant une chaîne longue et d'étudier l'effet du nombre de carbone de cette chaîne sur l'activité antimicrobienne.

REFERENCES

- [1]- Abou-Charbia M. A., Joullie M. M., "Reactions of nitrones with ketenes" *Hétérocycles*, **12**(6), (1979), p 819-835.
- [2]- Andremont A., "L'impact des antibiotiques sur les flores commensales conditionne l'avenir de la résistance", *Médecine Sciences*, **18**, (2002), p 364-365.
- [3]- Neu H. C., "The crisis in antibiotic resistance" *Science*, **257**, (1992), p 1064 -1073.
- [4]- Belouni R., "critères de choix d'un antibiotique", *Médecine du Maghreb*, **91**, (2001), p 26-27.
- [5]- Mingeot-Leclercq M. P., Czynski Y. G., et Tulkens P. M., "Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob. Agents Chemother", *J. Am. Soc. Micro*, **43**(4), (1999), p 727-737.
- [6]- Merino P., Tejero T., "Polyalkoxy nitrones as chiral building blocs in asymmetric synthesis" *Molecules*, **4**, (1999), p 169 -179.
- [7]- Dagoneau C., Tomassini A., Denis J.N., Vallée Y., "a short synthesis of γ -amino acids from nitrones; synthesis of vigabatrin", *Synthesis*, **1**, (2001), p 150-154.
- [8]- Floyd R.A., Hensley K., Forester M.J., "nitrones, their value as therapeutics and probes to understand aging"; *Mech. Ageni. Dev.*, **123**(8), (2002), p 1021-1031.
- [9]- Thirumalaikumar M., Sivasubramanian S., Ponnuswamy A., Mohan P., "Synthesis, reactions and antimicrobial studies of α -aryl-N-(2-nitrocyclohexyl)nitrones" *Eur. J. Med. Chem*; **31**, (1996), p 905-908.
- [10]- Coutts R. T., Hindmarsh K. W., et Myers G. E., "Quinoline N-oxides and hydroxamic acids with antibacterial properties", *Can. J. Chem.* **10**, **48**, (1970), p 2393-2396.

- [11]- Danish I. A., Prasad K. J. R., A "one pot synthesis and evaluation of 13-oxo-quinoline 3,4-dihydrocarbazol-N-oxides as antimicrobial agents", *Acta. Pharm.* **53**, (2003), p 287-294.
- [12]- Palmer G. C., Ordy M. J., Simmons R. D., Strand J. C., Radov L. A., Mullen G. B., Kinsolving C. R., Georgiev V. St., Mitchell J. T., et Allen S. D.; "Selection of orally active antifungal agents from 3, 5-substituted isoxazolidine derivatives based on acute efficacy-safety profiles", *Antimicrob Agents chemother*; **33**, **6**, (June 1989), p. 895-905.
- [13]- Blanáriková I., Fišera L., Kopaničáková Z., Salanski P., Jurezak J., Hamtner C., "Synthesis of chiral amino acid - derived nitrones and 1,3-dipolar cycloadditions with acrylic acid methyl ester", *Arkivoc*, **5**, (2001), p 51-59.
- [14]- Chiacchio U., Corsaro A., Iannazzo D., Piperno A., Pistarà V., Procopio A., Rescifina A., Romeo G., Romeo R., Siciliano M. C. R., et Valveric E., "Enantioselective synthesis of isoxazolidinyl nucleosides containing uracil, 5-fluorouracil, thymine and cytosine as new potential anti-HIV drugs"; *Arkivoc*, **6**, (2002), p 159-167.
- [15]- Sadashiva M. P., Mallesha H., Karunakara Murthy K., Rangappa K. S., "Enhancement in antimicrobial activity of 2-(phenyl)-3-(2-butyl-4-chloro-1H-imidazolyl)-5-butylate isoxazolidine", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, (2005), p 1811-1814.
- [16]- Sadashiva M. P., Mallesha H., Hitesh N. A., Rangappa K. S., "Synthesis and microbial inhibition study of novel 5-imidazolyl substituted isoxazolidines", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, (2004), p 6389-6395.
- [17]- Thirumalaikumar M., Sivasubramanian S., Ponnuswamy A., Mohan P.; "Synthesis, reactions and antimicrobial studies of *c*-aryl-N-(2-nitrocyclohexyl) nitrones", *Eur J Med Chem*, **31**, (1996), p 905-908.
- [18]- Mallesha H. ; Ravi Kumar K. R. ; Vishu Kumar B. K.; Mantelingu K.; Rangappa K. S. *Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, August 2001, **113**, 291-296.
- [19]- Avril JL., Dabernat H., Denis F., Monteil Francisella tularensis H." *Bactériologie clinique*". Paris : Ellipse (3Ed), (2000), p 374-377.
- [20]- Shirling E. B., Gottlieb D., "Methods for characterization of *Streptomyces* species". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**, (1966), p 313-340.
- [21]- Kamlet M. J., et Kaplan L. A., "Adsorption Spectra of the Phenylnitrones" *Notes*, **22**, (May 1957), p 576-578.
- [22]- Hamid A., "Interaction entre populations du genre *Fusarium* dans les sols sahariens", thèse de doctorat en Sciences Naturelles, Université Des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger, (Novembre 1991).
- [23]- Ogawa K. et Komada H., "Biological control of fusarium wilt of sweet potato by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*." *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.*, **50**, (1984), p 1-9.