Synthèse, Caractérisation et Etude de Propriétés Antimicrobiennes de la Semicarbazone et la Thiosemicarbazone de la Carvone.

Houssou Raymond Fatondji[1], Fernand Gbaguidi[2*], Salomé Kpoviessi[1], Expédit Sonounameto[1], Latifou Lagnika[4], Sanni Ambaliou,[4] Moudachirou Mansourou[2] Jacques Poupaert[3] et Georges Coffi Accrombessi[1]

[1] Laboratoire de Chimie Organique Physique et de Synthèse, Université d'Abomey-Calavi, Faculté des Sciences et Techniques Cotonou BP 4521, Bénin.
[2]Laboratoire National de Pharmacognosie/Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique (CBRST) Bp 06 Oganla Porto-Novo
[3]CMFA de l'Université Catholique de Louvain, 73.40 B-1200 Bruxelles-Belgique.
[4] Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire de l'Université d'Abomey-Calavi

(Reçu le 22/02/2010 – Accepté après corrections le 18/11/2010)

Résumé : La semicarbazone et la thiosemicarbazone de la R-(-)carvone ont été synthétisées par condensation directe du semi ou thiosemicarbazide en milieu acide puis testées pour leurs activités antibactériennes. Après recristallisation, la pureté des produits de synthèse a été évaluée par la chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC), leurs structures confirmées par la spectrométrie IR, la résonance magnétique nucléaire (RMN ^{1}H et ^{13}C) et la spectrométrie de masse (SM). Les deux molécules ont été testées sur des souches de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Ces composés ont montré une activité inhibitrice sur *Pseudomonas aeruginosa* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 78,1µg/ml pour la thiosemicarbazone et 312,5 µg/ml pour la semicarbazone. La thiosemicarbazone s'est aussi révélée active sur *Staphylococcus aureus*, avec une CMI de 39 µg/ml. Ces valeurs retiennent notre attention car *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* deviennent de plus en plus résistants aux antibiotiques telle l'oxacilline (CMI = 1,5µg/ml pour *Staphylococcus aureus*) et la céfixime (CMI < 1µg/ml). Une évaluation sommaire de leur cytotoxicité a été réalisée sur des larves d'*Artémia salina* en culture. Des concentrations inhibitrices (IC_{50}) de 117,1 µg/ml pour la semicarbazone et 4,59 µg/ml pour la thiosemicarbazone ont été observées.

Mots clés : carvone ; semicarbazone ; thiosemicarbazone ; activités antimicrobiennes ; cytotoxicité.

Synthesis, Characterisation and Study of Antimicrobial activities of the Semicarbazone and the Thiosemicarbazone of the Carvone.

Summary: The semicarbazone and thiosemicarbazone of R-(-) carvone were synthesized by direct condensation of the semicabazide or thiosemicarbazide in acidic medium and tested for their antibacterial activities. After recrystallization, the purity of the synthesis products was evaluated by thin layer chromatography (TLC) and their structures confirmed by IR spectrometry, nuclear magnetic resonance (NMR $^{1}H$and ^{13}C) and mass spectrometry (MS). The two molecules were tested on stocks of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Finally a summary evaluation of their cytotoxic activity was made on larvae of *Artémia salina* in culture. They showed an inhibitory activity on *Pseudomonas aeruginosa* with a minimal inhibitory concentration (MIC) value of 78.1 µg/ml for the thiosemicarbazone and 312.5 µg/ml for the semicarbazone. The thiosemicarbazone is also active on *Staphylococcus aureus* with a MIC value of 39 µg/ml. These values retain our attention as *Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus* become increasingly resistant to antibiotics like oxacilline (MIC = 1.5µg/ml for *Staphylococcus aureus*) and cefixime (MIC < 1 µg/ml). The test of cytotoxicity gave inhibitory concentrations (IC_{50}) of 117.1 µg/ml for semicarbazone and 4.59 µg/ml for thiosemicarbazone.

Key Words: carvone ; semicarbazone ; thiosemicarbazone ; antimicrobial activities ; cytotoxicity.

* Auteur de correspondance : ahokannou@yahoo.fr

1. Introduction

Les microorganismes pathogènes, sont généralement à l'origine de nombreuses maladies humaines. Pour combattre ces maladies, des antibiotiques tels que les pénicillines, la céfixime, l'érythromycine, la tétracycline etc…, sont couramment utilisés. Cependant on assiste de plus en plus à l'émergence de souches microbiennes résistantes à ces agents antimicrobiens. De ce fait, bon nombre de maladies infectieuses courantes deviennent difficiles et coûteuses à soigner [1].

Devant cette situation, il apparaît urgent de développer de nouveaux profils de molécules antibactériennes. Les semi et thiosemicarbazones, reconnu pour leurs propriétés antivirale[2], antibactérienne [3,5], antipaludéenne [6], antitumorale [7], anticonvulsivante [8] etc… font l'objet d'études surtout pour évaluer leurs activités biologiques. Le but du présent travail est de synthétiser les semicarbazone et thiosemicarbazone de la R-(-) carvone, terpène naturel, constituant majeur des essences de menthe verte [9] et d'en évaluer les activités biologiques**.**

2. Matériel et méthodes

2.1- Matériel

La R-(-) carvone, le chlorhydrate de semicarbazide ainsi que la thiosemicarbazide sont ceux vendus par la société ACROS ORGANIQUE. La chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC) a permis d'évaluer la pureté des produits de synthèse et de suivre l'évolution de la composition du milieu réactionnel. Dans ces deux cas l'éluant utilisé est le mélange acétate d'éthyle/toluène (7/6 v/v). Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un fusionomètre de type *eletrothermal 1A 9000*. Les données spectrométriques (Tableau I) ont été enregistrées à l'aide des spectrophotomètres Perkin Elmer FTIR 286 pour l'IR, Bruker 400 pour la résonnance magnétique ^{1}H RMN et ^{13}C RMN, Xcalibur en mode APCI pour la mesure des masses et CAMAG TLC Scanner 3 pour la chromatographie liquide haute performance (HPTLC).

2.2- Méthodes

2.2.1- Synthèse des semi et thiosemicarbazones

Les réactions de synthèse des semicarbazones sont illustrées par le schéma N°1 ci-après :

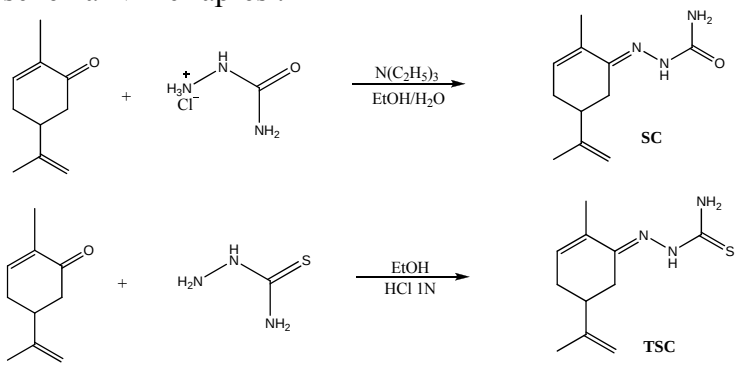


Schéma N°1 : Voies de synthèse des semicarbazone et thiosemicarbazone de la carvone.

Semicarbazone : A un mélange sous agitation de 20 mmol de carvone dissoute dans 100 ml d'éthanol à 96° et 20 mmol de chlorhydrate de semicarbazide dissous dans 15 ml d'eau distillée, on ajoute quelques gouttes de triéthylamine. On poursuit l'agitation à température ambiante jusqu'à l'apparition d'un précipité qui est filtré puis recristallisé dans l'éthanol à 96°. Les cristaux sont filtrés puis séchés sous vide dans un dessiccateur contenant du chlorure de calcium ($CaCl_2$).

Thiosemicarbazone : On prépare un mélange de 20 mmol de carvone dissoute dans 100 ml d'éthanol à 96°C et de 20 mmol de thiosemicarbazide dissous dans 20 ml d'acide chlorhydrique 1N. Ce mélange est maintenu sous agitation à température ambiante jusqu'à l'obtention des cristaux que l'on filtre. On les recristallise dans l'éthanol à 96°. Les cristaux sont filtrés puis séchés sous vide dans un dessiccateur contenant du chlorure de calcium ($CaCl_2$).

2.2.2- Tests microbiologiques

Pour la réalisation des tests microbiologiques, nous avons utilisé quatre souches de bactérie : *Eschérichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *et Enterococcus faecalis* ATCC 29212. La méthode utilisée pour ces tests est celle de la dilution en milieu liquide. Ainsi, les solutions de semicarbazones et thiosemicarbazones ont été préparées à une concentration initiale de 20 mg/ml dans l'acétone. Les suspensions bactériennes ont été réalisées à une colonie pour 5 ml respectivement en milieu luria Bertani (LB) pour *Eschérichia coli* et *Staphylococcus aureus* et en milieu tripton-yeast pour *Pseudomonas aeruginosa et Enterococcus faecalis.*

Trois séries de huit puits contenant initialement 100 µl d'eau distillée ont été réalisées. 100 µl de solution de semicarbazone ou thiosemicarbazone ont été ajoutés au premier puits de chaque série. Une dilution de 2 en 2 d'une rangée à l'autre jusqu'au huitième puits de la troisième série a été réalisée et les suspensions microbiennes sont ensuite ajoutées puis l'ensemble est incubé à l'étuve à 37°C. Après 18 heures d'incubation, on ajoute au contenu de chaque puits 40 µl d'une solution à 0,2 mg/ml de para-iodonitrotetrazolium violet (p-INT) et le tout est à nouveau incubé durant une heure

Les puits colorés en rouge sont ceux dans lesquels la concentration de composé de synthèse est insuffisante pour inhiber la croissance bactérienne. La CMI correspond à la concentration du puits non coloré en rouge dans lequel il y a la plus faible quantité de semicarbazone ou de thiosemicarbazone. La lecture est faite en comparaison avec les puits témoins.

2.2.3- Tests de toxicité sur larves de crevettes

Le test est réalisé sur des larves de crevettes de saumure (*Artémia salina LEACH*) selon la méthode de Michael et al. [10] reprise par Vanhaecke et al [11] puis par Grésil et Brendel [12]. De ce fait, les œufs d'*Arténia salina* sont incubés dans de l'eau de mer jusqu'à éclosion de jeunes larves (48heures). On prépare alors une série de solutions des substances à tester à des concentrations variables et progressives. Un nombre défini de larves est introduit dans chaque solution. Toutes les solutions ainsi que des solutions témoins ne contenant pas de substance active sont laissées sous agitation pendant 24 heures. Le comptage sous microscope du nombre de larves survivantes dans chaque solution permet d'évaluer la toxicité de la solution. Dans le cas où l'on constate des décès dans le milieu témoin, les données sont corrigées par la formule d'Abbott :

$$\%\text{décès} = [(\text{test} - \text{témoin})/\text{témoin})] \times 100$$

Les données (dose-réponse) sont transformées par logarithme et la LC_{50} est déterminée par une régression linéaire.

3- Résultats et discussions

Lors de la synthèse de la semicarbazone, l'utilisation de la triéthylamine en lieu et place de la pyridine [13] ou de l'acétate de sodium [14] conduit à l'amélioration du rendement (81 % contre 68 % selon Aggarwal et al 2008 [14].

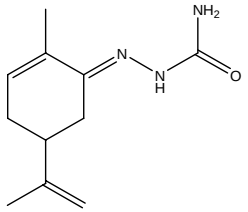
Par contre, la synthèse de la thiosemicarbazone en présence d'acide chlorhydrique conduit au même rendement que celui de Aggarwal et al 2008 [14] qui utilisait de l'acide acétique dans le milieu réactionnel.

Le Tableau I indique les données physiques et spectrométriques des deux composés synthétisés. Ces données sont conformes aux structures proposées pour la semicarbazone et la thiosemicarbazone de la carvone. Ainsi les spectres IR (Figure 1a et 1b) montrent des bandes dans la région de 3459-3425 cm^{-1} dues à la vibration d'élongation de N-H. La vibration d'élongation du C=O de la semicarbazone apparaît à 1673 cm^{-1}. La bande d'élongation du C=N apparaît à 1568 cm^{-1} pour la semicarbazone et à 1598 cm^{-1} pour la thiosemicarbazone. Ce carbone correspond à la jonction entre la semicarbazide ou
la thiosemicarbazide et la carvone.

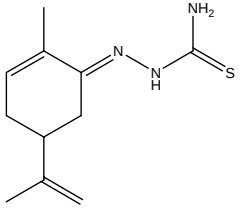
Pour la RMN ^{1}H (Figure 2a, 2b), le proton le plus déblindé qui est lié à l'atome d'azote central du fragment semicarbazide apparaît sous forme d'un singulet élargi à 9,3 ppm pour la semi et à 10,3 ppm pour la thiosemicarbazone. En RMN du ^{13}C (figures 2c et 2d), le carbone de la liaison C=N au niveau de la jonction se caractérise par un déplacement chimique à 147 ppm. Celui de la fonction C=O de la semicarbazone apparaît à 160 ppm tandis que pour la fonction C=S de la thiosemicarbazone, le carbone se caractérise par un déplacement chimique à 178 ppm. Les différents atomes de carbone éthyléniques des deux produits apparaissent entre 150 et 110 ppm, les carbones allyliques (-CH et $–CH_2$) entre 40 et 30 ppm et ceux des deux méthyles à 22 et 19 ppm. En spectrométrie de masse (Figure 3a, 3b et 3c), les pics $[M\ H]^{+}$ (208,14 pour SC et 224,12 pour TSC) obtenus en mode APCI correspondent aux masses moléculaires attendues pour ces produits. Les autres pics obtenus (148,11 ; 191,12 pour SC et 148,11 ; 207,10 pour TSC) correspondent à la perte des fragments NH_3 et $NH_2.CO.NH_2$ ou $NH_2.CS.NH_2$ sur les molécules correspondantes.

Les composés synthétisés ont été testés pour leur activité antimicrobienne. Une évaluation sommaire de leur toxicité a également été réalisée. Les résultats du test antimicrobien par la méthode de diffusion en milieu liquide et ceux de la toxicité sur larve de crevette de saumure (*Artémia salina*). sont résumés dans les Tableaux II et III.

Tableau I : Données physiques, analytiques et spectrométriques des semicarbazone (SC) et thiosemicarbazone (TSC) de la carvone



SC



TSC

SC et TSC[a]	Pf[c]	R%	Rf[e]	^{1}H RMN (DMSOd$_6$, δ ppm)	^{13}C RMN (DMSOd$_6$ δ, ppm)	IR (KBr , cm^{-1})	[b][M H]$^+$cal	SM[f]
SC	142	81	0,34	1,82 (s, 3H, CH_3) ; 1,9 (s , 3H,CH_3) ; 2 ,28 (m, 4H , 2CH_2) ; 2,68 (p,1H, CH_2-CH-CH_2) ; 4,8 (s ;2H, =CH_2); 4,9 (t, 1H, CH=C); 6,3 (s, 2H, -$CONH_2$); 9,3 (s, 1H, =NNH)	158,58 ; 148,29; 147,27 ; 133,28; 132,04 ; 110,32 ; 30,50 ; 30,21; 21,41 ;18,83	3459 ; 3256 ; 2970 ; 2923 ; 2845 ; 1673 ; 1641 ;1618 ;1568 ; 1471 ; 1423 ; 1373	208,145	208,14 ; 191,12 ; 148, 11
TSC	111	65	0,70	1,82 (s, 3H, CH_3) ; 1,9 (s , 3HCH_3) ; 2 ,28 (m, 4H , 2CH_2) ; 2,68 (p,1H, CH_2-CH-CH_2) ; 4,8 (s ; 2H, =CH_2); 6,3 (s, 2H, -$CSNH_2$); 10,3 (s, 1H, =NNH)	176,16 ; 148,29; 147,27 ; 133,28; 132,04 ; 110,32 ; 30,50 ; 30,21; 21,41 ;18,83	3415 ; 3259 ; 2965 ; 2943 ; 1598 ; 1500 ; 1463 ; 1443 ; 1373	224,1221	224,12 ; 207,10

[a] Semicarbazones et thiosemicarbazones de la carvone ; [b] [M+H]$^+$calculé ; [c] Point de fusion en °C ; [d] Rendement ; ; [e] Rf (acétate d'éthyle/toluène 7 /6); [f] Spectrométrie de masse en mode APCI [M H

Tableau II : Activités antimicrobiennes des semicarbazone (SC) et thiosemicarbazone (TSC) de la carvone

Composés	CMI (mg /ml)			
	E. coli (gram -)	***S. aureus (gram +)***	***P. aeruginosa (gram -)***	***E. faecalis (gram +)***
SC	5	5	0,3125	>5
TSC	5	0,039	0,0781	>5

Tableau III : Toxicité des semicarbazone (SC) et thiosemicarbazone (TSC) de la carvone sur larves de crevettes de saumure

Composés	IC_{50} (µg/ml)
SC	117,1
TSC	4,59

A la lumière de ces résultats, nous pouvons dire que la semicarbazone et la thiosemicarbazone de la carvone sont actives. Cette activité pourrait être due à la propriété chélatrice des semicarbazones et thiosemicarbazones vis-à-vis de certains ions métalliques cofacteurs d'enzymes intervenants dans la réplication de l'ADN [15]. De plus, la thiosemicarbazone est beaucoup plus active que la semicarbazone. En effet, la thiosemicarbazone de la carvone a une activité antimicrobienne prononcée contre *S. Aureus* et *P. aeruginosa* avec des CMI de 39 et 78,1 µg/ml respectivement. La bonne lipophilie de la thiosemicarbazone par rapport à la semicarbazone expliquerait ce résultat. En effet d'après French et al [15] la thiosemicarbazone traverserait plus facilement les membranes cellulaires pour exercer son action inhibitrice sur la réplication de l'ADN à l'intérieur des cellules microbiennes. Cette activité retient notre attention car la thiosemicarbazone pourrait être une alternative de lutte contre *Pseudomonas aeruginosa et Staphylococcus aureus* qui sont de plus en plus résistants aux antibiotiques comme l'oxaciline (CMI = 1,5µg/ml pour *Staphylococcus aureus*) et la céfixime (CMI < 1µg/ml) [16].

Les tests de cytotoxicité réalisés sur les larves de crevette ont donné des concentrations inhibitrices (IC_{50}) de 117,1 µg/ml pour la semicarbazone et 4,59 µg/ml pour la thiosemicarbazone. Ces tests qui constituent une évaluation sommaire de la toxicité des produits reflète la sensibilité des larves de crevette à la thiosemicarbazone et par ricochet celle de l'espèce humaine. En effet, il existe une corrélation entre la cytotoxicté sur les larves de crevette et sur les cellules 9PS et 9KB (carcinome nasopharygien humain) d'une part [17], les cellules A-549 du carcinome pulmonaire et les cellules HT-29 du carcinome du côlon d'autre part [18].

4. Conclusion

La semicarbazone et la thiosemicarbazone de la carvone ont été synthétisées par la méthode modifiée de Aggarwal et al 2008. Ce qui a permis d'améliorer le rendement (de 68 à 81%) de la formation de la semicarbazone. Les structures de ces composés ont été confirmées par les méthodes spectrométriques telles la spectrométrie infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 (RMN ^{1}H et ^{13}C) puis en spectrométrie de masse (SM) en mode APCI. Les deux composés synthétisés ont

montré une faible activité biologique sur *E. coli et E. faecalis*. Cependant, sur *S. Aureus* et *P aeruginosa*. La thiosemicarbazone exerce de façon reproductible un effet inhibiteur intéressant.

Bibliographie

[1] OMS, relevé épidémiologique hebdomadaire (1996).Vol 71, n° 47.
[2] García C.C., Brousse B.N., Carlucci M.J., Moglioni A.G., Martins Alho. M., Moltrasio G.Y., D'Accorso N.B., Damonte E.B., Antivir. Chem. Chemother (2004) 14, 99-105.
[3] Sau D.K., Butcher R.J., Chaudhuri S., Saha N., Mol. Cell. Biochem (2003) 253, 21-29.

[4] Rebolledo A.P., de Lima G.M., Gambi L.N., Speziali N.L., Maia D.F., Pinheiro C.B., Ardisson J.D., Cortes M.E., Beraldo H., Appl. Organomet . Chem (2003) 17, 945-951.

[5] Kasuga N.C., Sekino K., Ishikawa M., Honda A., Yokoyama M., Nakano S., Shimada N., Koumo S. & Nomiya K (2003) Inorg. Biochem. 96, 298-310.
[6] Klayman D.L., Scovill J.P., Bruce J., Bartosevich J.F., J. Med. Chem (1984) 27, 84-87.
[7] Afrasiabi Z., Sinn E., Chen J.,Ma Y., Rheingold A.L., Zakharov L.N., Rath N., Padhye S Inorg. Chem. Acta (2004) 357, 271-278.
[8] Pandeya S.N., Aggarwal N., Jain J. S., Pharmazie (1999) 54, 300-302.
[9] Bouwmeester J.H., Jacques A.R., Toxopeus H.. Journal of Agriculture and Food Chemistry (1995) 43, 3057-3064.
[10] Michael A.S, Thompson C.G, Abramovitz M., Science (1956) 123:464.
[11] Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Soorgeloos P., Ecotoxicol Env Safety (1981) 5, 382-387.
[12] Sleet R.B, Brendel K Ecotoxicol Env Safety (1983) 7, 435-446.
[13] L. FIESER and M. FIESER. Reagents for Organic Synthesis / John wiley and sons. Edition 1967, New York.
[14] Aggarwal N., Aggarwal R., Mishra P., Jain J.S., Bansal S.K., Jha K.K., Central Nervous Systhem Agents in Medicinal Chimistry (2008) 8, 26-28.
[15] French F.A., Blanz E.J., J. Med. Chemistry (1966) 9, 585.
[16] Larmaraud-Sevin O., Allouch P.Y., Ghnassia J.C., Pangon B., Annales de Biologie Clinique (1998) 56, 85-87.
[17] Pelka M., Danzl C., Distler W., Petschelt A., J Dent (2000) 28, 341-345.
[18] Carballo J.L., Hernández-Inda Z.L., Pérez P., García-Grávalos M.D., BMC. Biotechnology (2002) 2:17.