

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**Synthèse conventionnelle et sous irradiation micro-ondes de
composés 3,4-dihydropyrimidinones/thiones à partir de la
curcumine.**

Présenté par : Melle IDIR Taous et Melle OULDLAMARA Kamilia

Soutenu publiquement, le 27 / 06 / 2018, devant le Jury composé de :

| | | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|--------------|---------------------|
| <i>DERRIDJ Fazia</i> | <i>MCA</i> | <i>UMMTO</i> | <i>PRESIDENTE</i> |
| <i>MAKHOULFI-CHEBLI Malika</i> | <i>MCA</i> | <i>UMMTO</i> | <i>ENCADREUR</i> |
| <i>ABDOUN Amar</i> | <i>Pharmacien microbiologiste</i> | <i>UMMTO</i> | <i>Co-ENCADREUR</i> |
| <i>HIKEM-OUKACHA Djamilia</i> | <i>MCA</i> | <i>UMMTO</i> | <i>EXAMINATRICE</i> |
| <i>BENAZZOZ-TOUAMI Amina</i> | <i>MCB</i> | <i>UMMTO</i> | <i>EXAMINATRICE</i> |

Remerciements

Nous adressons nos remerciements les plus chaleureux à Madame Makhloufi née Chebli Malika, notre directrice de recherche, pour son engagement à nos côtés et sa très grande disponibilité tout au long de ce mémoire. Soyez assurée Madame, de toute notre estime et notre profond respect.

Nous remercions aussi chaleureusement le docteur Abdoun Amar, notre Co-directeur de recherche pour nous avoir accueillis au sein du laboratoire de microbiologie et pour tous ces conseils avisés durant toute la durée du stage.

Nos remerciements vont aussi à Madame Benazzouz- Fouami Amina et M^{lle} Saher liza pour leur précieuse aide qu'elles ont su nous apporter durant ce travail.

Nous remercions profondément le professeur AZAM de nous avoir permis de faire des analyses au sein du laboratoire microbiologie de la faculté de médecine de l'université Mouloud Mammeri.

Nous adressons nos remerciements les plus sincères à M^{me} Derridj Fazia qui nous a fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et de présider ce jury. Trouvez ici Madame, l'expression de notre profonde reconnaissance.

Toute notre gratitude à Mesdames Benazzouz- Fouami Amina et Hikem-Oukacha Djamila, de nous avoir fait l'honneur de participer à ce jury.

Nous tenons aussi à remercier toutes les personnes qui ont participé à notre encadrement notamment M^{me} Benneni Leila et Monsieur Merzouk Tahar, et tous ceux qui de près ou de loin nous ont soutenue dans la réalisation de ce mémoire dans les meilleurs conditions.

Dédicaces

A mes très chers parents

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance.

Vous avez fait plus qu'un parent puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder la santé et une longue vie.

A mes très chers frères et sœurs Mouhand ouramdane, Arezki, Fatima, Zahoua, Dahbia et ouardia

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Mes anges gardiens et mes fidèles compagnons dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mes précieux neveux Kaci, Zaïna et Melinda que j'aime si fort et leurs chers papa Karim et abd el Kader.

A mes très chères grands-parents, que dieu les accueille dans son vaste paradis

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

Taous

Dédicaces

A mes très chers parents

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance.

Vous avez fait plus qu'un parent puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder la santé et une longue vie.

A mes très chers frères Achour et Lyes

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Mes anges gardiens et mes fidèles compagnons dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A ma très chère grand-mère Zahia

A toute ma famille et amis en particulier Yamina et Hannane

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

Kamília

Sommaire :

| | |
|----------------------------|---|
| Introduction générale..... | 1 |
|----------------------------|---|

Chapitre I : Partie théorique

| | |
|----------------------------------------------------------------|----|
| I. Curcuma..... | 3 |
| I.1. Définition du curcuma | 3 |
| I.2. Origines..... | 3 |
| I.3. Principaux composés du curcuma..... | 3 |
| I.4. Aspect et structure de la curcumine | 5 |
| I.5. Propriétés pharmacologique..... | 5 |
| I.5.1. Antioxydant..... | 5 |
| I.5.2. Anti-inflammatoire | 6 |
| I.5.3. Traitement des problèmes digestifs..... | 6 |
| I.5.4. Anticancéreuse | 7 |
| II. Réaction multi-composants | 7 |
| II.1. Réaction conventionnelle de Biginelli..... | 7 |
| II.2. Mécanisme de la réaction de Biginelli..... | 8 |
| II.3. Intérêts biologiques des dihydropyrimidinones DHPMs..... | 9 |
| III. Synthèse sous irradiations micro-ondes MO..... | 9 |
| III.1. Micro-ondes | 10 |
| III.2. Four à micro-ondes..... | 10 |
| IV. Polyoxométallates de type Keggin..... | 11 |
| IV.1. Propriétés des polyoxométallates..... | 11 |

Chapitre II : Partie expérimentale

| | |
|---------------------------------------------------|----|
| I. Appareillages et techniques analytiques | 12 |
| I.1. Point de fusion | 12 |
| I.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) | 12 |
| I.3. Spectroscopie infrarouge | 12 |
| I.4. Spectrophotométrie UV-Visible | 12 |
| I.5. Micro-ondes utilisé pour la synthèse | 12 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II. Réactifs | 13 |
| III. Manipulations..... | 13 |
| III.1. Synthèse conventionnelle des 3,4-dihydropyrimidin (2 <i>H</i>) -1-ones / thiones..... | 13 |
| III.2. Synthèse sous irradiation micro-ondes des 3,4-dihydropyrimidin (2 <i>H</i>) -1-ones / thiones.. | 14 |
| IV. Etude de l'activité biologique des 3,4-dihydropyrimidin (2 <i>H</i>) -1-ones / thiones | 15 |
| IV.1. Activité antioxydante | 15 |
| IV.1.1. Principe | 15 |
| IV.1.2. Mode opératoire | 16 |
| IV.2. Activité antifongique..... | 17 |
| IV.2.1. Levures testées | 17 |
| IV.2.2. Milieu de culture | 17 |
| IV.2.3. Méthodes | 18 |
| IV.3. Activité antibactérienne | 18 |
| IV.3.1. Choix et origine des souches microbiennes testées..... | 18 |
| IV.3.2. Repiquage..... | 19 |
| IV.3.3. Confirmation des souches bactériennes | 19 |
| IV.3.4. Réalisation de l'antibiogramme | 19 |
| IV.3.4.1.Préparation de l'inoculum..... | 19 |
| IV.3.4.2. Ensemencement et dépôt des disques | 19 |
| IV.3.4.3. Incubation..... | 20 |
| IV.3.5. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) | 20 |
| IV.3.5.1. Méthodes | 20 |
| IV.3.5.2. Incubation..... | 20 |

Chapitre III : Résultats et discussion

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Introduction..... | 21 |
| II. Synthèse des 3,4-dihydropyrimidin (2 <i>H</i>)-1-ones / thiones..... | 22 |
| III. Mécanisme de la réaction | 23 |
| IV. Résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) | 24 |
| V. Analyse par spectrophotométrie UV-Visible | 25 |
| VI. Analyse par spectroscopie IR..... | 26 |

| | |
|----------------------------------------------------------------|----|
| VII. Résultats de l'activité antioxydante | 27 |
| VIII. Détermination de la CE50 ou IC50 | 31 |
| IX. Activité antibactérienne | 33 |
| IX.1. Résultats de la concentration minimale inhibitrice | 34 |
| X. Activité antifongique | 36 |
| Conclusion générale | 37 |
| Annexes | |

Liste de figures

- Figure 1.1 : Aspect général de curcuma longa.
- Figure 1.2 : Structure de la curcumine et de ses principaux dérivés.
- Figure 1.3 : Tautomérie céto-énolique de la curcumine ; formes dicétone et énol.
- Figure 2.1 : Micro-onde utilisé pour la synthèse des composés 4a-n.
- Figure 3.1 : Tautomérie de la curcumine dans des conditions physiologiques.
- Figure 3.2 : Spectre UV-Visible de la curcumine dans le DMSO.
- Figure 3.3: Spectre UV-Visible du composé 4a dans le DMSO.
- Figure 3.4 : Spectre UV-Visible du composé 4b dans le DMSO.
- Figure 3.5 : Spectre UV-Visible du composé 4c dans le DMSO.
- Figure 3.6 : Spectre UV-Visible du composé 4d dans le DMSO.
- Figure 3.7 : Spectre UV-Visible du composé 4 e dans le DMSO.
- Figure 3.8 : Spectre UV-Visible du composé 4f dans le DMSO.
- Figure 3.9 : Spectre UV-Visible du composé 4g dans le DMSO.
- Figure 3.10 : Spectre UV-Visible du composé 4h dans le DMSO.
- Figure 3.11 : Spectre UV-Visible du composé 4i dans le DMSO.
- Figure 3.12 : Spectre UV-Visible du composé 4j dans le DMSO.
- Figure 3.13 : Spectre UV-Visible du composé 4k dans le DMSO.
- Figure 3.14 : Spectre UV-Visible du composé 4l dans le DMSO.
- Figure 3.15 : Spectre UV-Visible du composé 4m dans le DMSO.
- Figure 3.16: Spectre UV-Visible du composé 4n dans le DMSO.
- Figure 3.17 : Spectre IR de la curcumine.
- Figure 3.18 : Spectre IR du composé 4a.
- Figure 3.19 : Spectre IR du composé 4b.
- Figure 3.20 : Spectre IR du composé 4c.
- Figure 3.21 : Spectre IR du composé 4d.
- Figure 3.22 : Spectre IR du composé 4 e.
- Figure 3.23 : Spectre IR du composé 4f.

Figure 3.24 : Spectre IR du composé 4g.

Figure 3.25 : Spectre IR du composé 4h.

Figure 3.26 : Spectre IR du composé 4i.

Figure 3.27 : Spectre IR du composé 4j.

Figure 3.28 : Spectre IR du composé 4k.

Figure 3.29 : Spectre IR du composé 4l.

Figure 3.30 : Spectre IR du composé 4m.

Figure 3.31 : Spectre IR du composé 4n.

Figure 3.32 : Densité Optique en fonction de la concentration des composés 4a-n.

Figure 3.33 : Densité Optique en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.

Figure 3.34 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4a.

Figure 3.35 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4b.

Figure 3.36 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4c.

Figure 3.37 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4d.

Figure 3.38 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4e.

Figure 3.39 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4f.

Figure 3.40 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4g.

Figure 3.41 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4h.

Figure 3.42 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4i.

Figure 3.43 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4j.

Figure 3.44 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4k.

Figure 3.45 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4l.

Figure 3.46 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4m.

Figure 3.47 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du composé 4n.

Figure 3.48 : Valeur d'IC₅₀ des composés 4a-n et de l'acide ascorbique (AA).

Figure 3.49 : Diamètre des zones d'inhibition des composés 4a-n.

Figure 3.50 : Diamètre de zones d'inhibition des composés 4a-n réalisé au laboratoire.

Figure 3.51 : Résultats de la concentration minimale inhibitrice.

Figure 3.52 : Résultats de l'activité antifongique.

Liste de schéma

Schéma 1.1 : Réaction de Biginelli

Schéma 1.2 : Différentes étapes du mécanisme de la réaction de Biginelli

Schéma 2.1 : Mécanisme général de synthèse conventionnelle des 3,4-dihydroprimidin (2*H*)-1-ones / thiones à partir de la curcumine.

Schéma 2.2 : Mécanisme général de réduction de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH).

Schéma 3.1 : Synthèse des DHPMs à partir de la curcumine

Schéma 3.2 : Mécanisme de synthèse des DHPMs à partir de la curcumine.

Liste des tableaux :

Tableau 2.1 : Durée des réactions effectuées.

Tableau 3.1 : Résultats et propriétés physico-chimiques des DHPMs obtenus.

Tableau 3.2 : Rapports frontaux des différents produits.

Tableau 3.3 : Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible des composés 4a-n.

Tableau 3.4 : Résultats de spectroscopie IR des composés 4a-n.

Tableau 3.5 : Les valeurs des IC50 % des composés 4a-n et de l'acide ascorbique.

Tableau 3.6 : Diamètre de zone d'inhibition en mm.

Tableau 3.7 : Résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Liste des abréviations

| | |
|-------------|--------------------------------------------|
| AA | Acide Ascorbique |
| Abs | Absorption |
| ATB | Antibiotique |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CCM | Chromatographie sur Couche Mince |
| CL 25 | Colistine |
| Cot 25 | Cotrimoxazole |
| Cp | Composés |
| Cris | Cristalline |
| DHPMs | Dihdropyrimidiones |
| DMSO | Dimethylsulfoxyde |
| DPPH | 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle |
| E.Coli | Escherichia coli |
| HIV | Virus de l'immunodéficience humaine (SIDA) |
| HPA | Hétéro-polyacide |
| IC50 / CE50 | Concentration Inhibitrice médiane |
| IR | Infra Rouge |
| Max | Maximum |
| MF | MC Farland |
| MO | Micro-ondes |
| P | Poudre |
| Pf | Point de fusion |
| Pf litt | point de fusion de littérature |
| Rdt | Rendement |
| Rif 5 | Rifampicine |

THC

Tétrahydrocurcuminoïdes

UV-Visible

Ultra-Violet-Visible

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les produits naturels ont été utilisés par l'homme depuis l'Antiquité comme remèdes contre la maladie comme épices, narcotiques, colorants et comme poisons pour la guerre et la chasse. Les gens ont utilisé des remèdes traditionnels sans justification scientifique, mais avec l'expérience ils ont montré qu'ils peuvent être très efficaces s'ils sont pris à des doses thérapeutiques. La plupart de ces produits naturels ont été utilisés dans des formes brutes et les composants actifs ont été isolés seulement pendant et après le dix-neuvième siècle. L'application large de composés biologiquement actifs naturels comme médicaments antiviraux, antipaludéens, anti-tumoraux a stimulé les chimistes organiciens à développer des méthodes pour la synthèse de ces composés. La contribution des chimistes organiciens ne réside pas seulement dans leur capacité à produire des substances connues pour une étude plus approfondie, mais surtout dans leur capacité à créer de nouvelles entités qui peuvent avoir une activité accrue.

Les zingibéracées sont des plantes herbacées vivaces, à rhizome souterrain. Ces derniers sont le plus souvent utilisés comme épices et remèdes car ils présentent énormément de vertus et de bienfaits. Nous avons porté notre attention sur une plante de cette famille qui est le curcuma Longa considérée comme un réservoir de nutriments, de fibres, de vitamines et de curcuminoïdes. La curcumine représente la majeure partie de ces derniers et constitue le principe actif de la plante.

Le nom chimique de la curcumine est le 1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxy phényl)-1,6-heptadiène-3,5-dione, c'est une molécule symétrique qui contient deux fonctions cétoniques séparées par un méthylène (-CH₂), et deux noyaux aromatiques dans les deux extrémités. Chacun des deux noyaux porte deux groupements ; hydroxyle et méthoxy en position para et méta respectivement.

Plusieurs études menées *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'efficacité de ce principe actif et lui ont découvert plusieurs activités pharmacologiques dont l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne, anti- HIV, anti- Alzheimer, anti-cancer, antidépresseur et encore pleins d'autres activités [1]. Ces nombreuses propriétés rendent cette molécule très intéressante et nous pousse à approfondir les recherches.

La réaction de Biginelli est un excellent outil pour la synthèse des molécules hétérocycliques les 3,4-dihydropyrimidinones à divers propriétés biologiques reconnues. Récemment cette réaction a été sujette à plusieurs modifications afin d'améliorer la cinétique de la réaction, le rendement ou bien les propriétés pharmacologiques des produits.

Introduction générale

L'objectif de ce mémoire est de synthétiser les 3,4-dihydropyrimidinones / thiones par réaction de Biginelli en substituant l'acétoacétate d'éthyle par la curcumine et en utilisant un catalyseur fort HPA de type Keggin commercial $H_3PMo_{12}O_{40}$, par reflux et sous irradiations micro-ondes dans le but d'améliorer les rendements. Les composés synthétisés sont caractérisés par diverses techniques analytiques à savoir ; IR, UV-Visible. L'activité antioxydante et antimicrobienne de ces composés a été évaluée.

En plus de l'introduction et de la conclusion générale ce travail est subdivisé en trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à la synthèse bibliographique sur le curcuma, la réaction de Biginelli et les 3,4-dihydropyrimidinones.

Le deuxième chapitre décrit les différentes techniques expérimentales et les procédés utilisés pour la synthèse et la caractérisation de nos produits.

Le troisième chapitre quant à lui présente les résultats obtenus et les commentaires qui en découlent.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Curcuma

I.1. Définition du curcuma

Le curcuma (*Curcuma Longa*) est une plante vivace appartenant à la même famille que le gingembre, les *zingiberaceae* [2] (figI.1), avec une envergure pouvant atteindre un mètre. Son rhizome semblable au gingembre est comestible, tubéreux et très ramifiés, et ses feuilles issues du rhizome sont longues et distiques [3].

Le curcuma détient une place très importante en médecine ayurvédique (médecine traditionnelle hindoue) et dans la prévention et la guérison de plusieurs maladies [4].



Figure I.1 Aspect général de *Curcuma Longa* [5]

I.2. Origines

Le curcuma pousse de manière sauvage dans les forêts pluvieuses tropicales et sud tropicales. On la trouve en : Asie du sud et du sud est, sous continent indien, Birmanie, Thaïlande, Laos, Viêt-Nam, Maghreb (Maroc), Indonésie, Afrique centrale et l'Île de la Réunion [3].

Utilisée en inde pendant des siècles, elle ne présente aucun effet secondaire. Elle est non seulement utilisée pour ses vertus thérapeutiques mais aussi comme colorant jaune pour les textiles, en cuisine et pour la préservation des aliments [4].

I.3. Les principaux composés du curcuma

Le curcuma contient énormément de micronutriments, mais son ingrédient actif reste les curcuminoïdes, pigments polyphénoliques, dont le principe actif majoritaire est la

curcumine. Il contient aussi la déméthoxycurcumine, la dihydrocurcumine et la bisdéméthoxycurcumine.

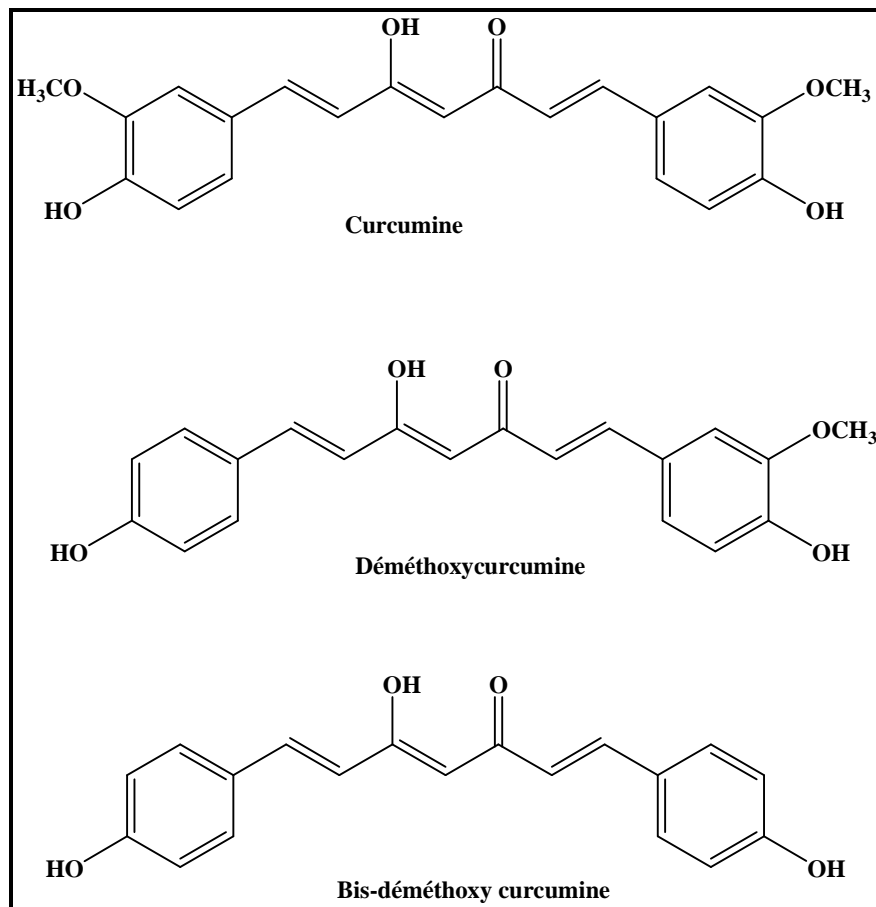


Figure I.2. Structure de la curcumine et de ses principaux dérivés. [6]

Le curcuma est également une bonne source de fibres alimentaires, de manganèse, de fer, de vitamine B6 et de la vitamine C.

Il renferme également de l'huile essentielle, des quinoides, des stéroïdes dont le cholestérol et le campestérol, des monoterpènes, des phénylpropanoïdes, des benzénoïdes, des carbohydrates et des alcaloïdes.

La curcumine est la molécule la plus abondante et la plus étudiée. Elle a été isolée pour la première fois en 1815 par Vogel et identifiée comme 1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,6-heptadiène -3,5-dione) ou diferuloylmethane [4].

C'est une poudre cristalline, jaunâtre et inodore, très peu soluble dans l'eau, l'éther de pétrole et le benzène. Soluble dans l'alcool éthylique, l'acide acétique glacial et le propylène glycol, et très soluble dans l'acétone et l'éther éthylique [4].

En plus, la curcumine est considérée comme un composé chimique non-nutritif et non toxique pour les mammifères même en doses élevées [4].

I.4. Aspect et structure de la curcumine

La curcumine est une poudre jaune-orange pour un pH compris entre 2,5 et 7, et rouge à pH supérieur à 7. En conditions physiologiques, il existe un équilibre entre une forme énolique et une forme dicétonique (Figure I.3). Cette propriété de la curcumine peut être d'une importance cruciale dans la détermination de la sélectivité de sa liaison aux protéines, y compris à la protéine amyloïde β dans les modèles de la maladie d'Alzheimer [7].

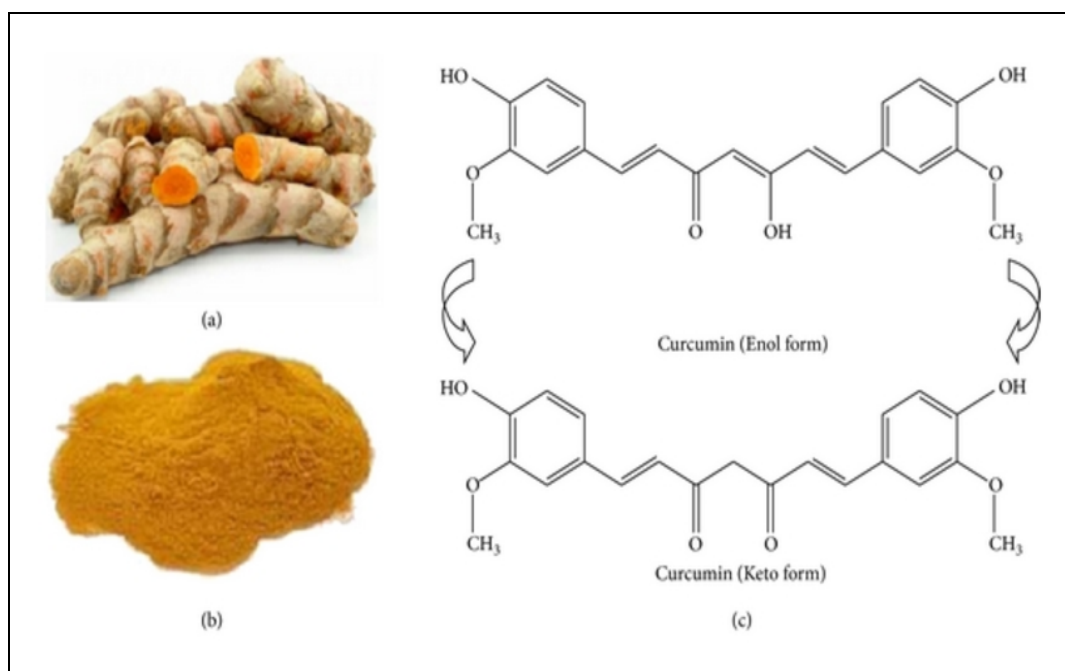


Figure I.3. Tautomérie céto-énolique de la curcumine ; formes dicétone (en bas) et énol (en haut) [8]

I.5. Propriétés pharmacologiques

«C'est une herbe contre toute souffrance », dit un proverbe bien connu en Inde. Le curcuma (*Curcuma Longa*), est une plante dont le rhizome (tige souterraine), est considéré dans les régions tropicales et subtropicales de l'Asie comme un remède universel [9].

I.5.1. Antioxydant

Les radicaux libres sont impliqués, en tant que médiateur, dans la progression de nombreuses maladies chroniques et dans le vieillissement des cellules en général. Les

radicaux sont des espèces réactives vis-à-vis des constituants organiques et des structures cellulaires [2].

Plusieurs études ont montrés que les curcuminoïdes et leurs dérivés (les tétrahydrocurcuminoïdes) sont des puissants antioxydants et que la curcumine est considérée comme un antioxydant dix fois plus actif que la vitamine E [2,10]. Les tétrahydrocurcuminoïdes (THC) sont classés comme bioprotecteurs. Ils agissent à deux niveaux sur les radicaux libres : sur la phase d'initiation en piégeant les amorceurs radicalaires et sur la phase de propagation des réactions radicalaires en offrant d'autres possibilités de réactions aux intermédiaires radicalaires [2].

I.5.2. Anti-inflammatoire

Dans des études réalisées in vitro, in vivo et chez l'homme, il a été rapporté que le curcuma a des propriétés anti-inflammatoire et que son utilisation est sûre même à une dose de 12g/jour [11].

Le curcuma se révèle très efficace pour prévenir toutes les maladies qui se développent à partir d'une inflammation passant souvent inaperçue. Le curcuma peut ainsi soigner l'arthrose, les tendinites, les névralgies, les sciaticques. Dans les pays d'Asie il est prescrit contre toutes les douleurs (musculaire, articulaire), les rhumatismes les polyarthrites, l'artériosclérose, les complications cérébrales et coronariennes, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, parkinson) [9].

I.5.3. Traitement des problèmes digestifs

Le curcuma est un remède ancestral contre l'acidité gastrique et autres troubles digestifs, car il stimule la sécrétion de mucus et protège ainsi l'estomac. Il atténue aussi les nausées. Il est tout à fait indiqué dans les troubles digestifs liés à la paresse du foie [12].

Il est traditionnellement utilisé comme : cholérétique ou cholagogue, dans le traitement symptomatique des troubles fonctionnels digestifs attribués à une origine thérapeutique et comme stimulant de l'appétit [12].

I.5.4. Anticancéreuse

Plusieurs études indiquent que la curcumine est un puissant agent anti-cancer. Elle inhibe la croissance de cellules cancéreuses variées ; les tumorigenèses de la glande mammaire, de la cavité orale, des voies aérodigestives, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin, du colon, du poumon et du foie ont été stoppés par cette dernière [12].

La curcumine peut aussi supprimer l'activité tumorigénique d'une large variété de carcinogènes, notamment responsables des cancers du côlon, duodénum, œsophage, aérodigestif, foie, sein, buccaux et prostate [12].

II. Réactions multi - composants

Les réactions multi-composants sont définies comme étant des processus permettant d'assembler, en une seule étape (one - pot), au moins trois réactifs qui vont participer à la structure du produit final. Ces réactions sont des procédés très efficaces qui réunissent la rapidité, la diversité et la complexité structurale. Lorsque de telles réactions permettent de combiner des produits de départ majoritairement commerciaux ou aisément accessible elles deviennent de bons outils pour les industries pharmaceutiques, afin de créer des chimiothèques destinés au criblage à haut débit [13].

Parmi ces réactions nous nous sommes intéressés à une réaction particulièrement intéressante qui est la réaction de Biginelli.

II.1. Réaction conventionnelle de Biginelli

Le chimiste italien Pietro Biginelli a rapporté, pour la première fois, la préparation d'une nouvelle molécule, la 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one, notée DHPM, à partir d'une réaction de cyclocondensation à composants multiples en faisant réagir à la fois trois réactifs en une seule étape : l'acétoacétate d'éthyle **1**, le benzaldéhyde **2** et l'urée **3**, au reflux de l'éthanol comme solvant et en présence d'acide chlorhydrique comme catalyseur [14].

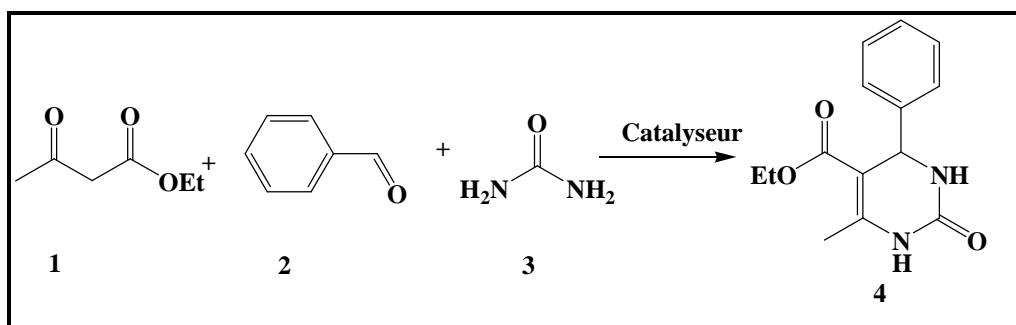


Schéma I.1 : Réaction de Biginelli

La réaction de Biginelli est effectuée dans un solvant polaire protique tel que l'éthanol et le méthanol utilisé dans les conditions classiques de la réaction. Les solvants polaires aprotiques ont été également utilisés tels que : le tétrahydrofurane, le dioxane et l'acétonitrile [15]. Elle a été aussi menée sans solvant et donne de très bons résultats [15].

II.2. Mécanisme de la réaction de Biginelli

La réaction de Biginelli implique la condensation de trois composants : 1,3-dicarbonylé, aldéhyde et urée ou la thio-urée. Le maintien de la réactivité de ces réactifs pourrait procéder selon plusieurs voies [16].

- La condensation de l'aldéhyde avec le composé 1,3-dicarbonylé par condensation d'aldol suivie d'une attaque nucléophile de la molécule d'urée [16].
- La condensation de l'aldéhyde avec le composé 1,3-dicarbonylé par réaction de Knoevenagel ensuite addition nucléophile de l'urée sur l'intermédiaire formé [16].
- La condensation de l'aldéhyde avec la molécule d'urée (via N-benzylidène-urée) puis addition nucléophile du composé 1,3-dicarbonylé [16].
- La condensation de l'aldéhyde avec deux molécules d'urée (par l'intermédiaire de N,N-benzylidènebisurée) et puis l'addition nucléophile du composé 1,3-dicarbonylé [16].
- Condensation nucléophile de l'urée sur le composé 1,3-dicarbonylé (via 3-uréido-crotonates) suivi d'une autre attaque nucléophile de ce condensat à l'aldéhyde [16].

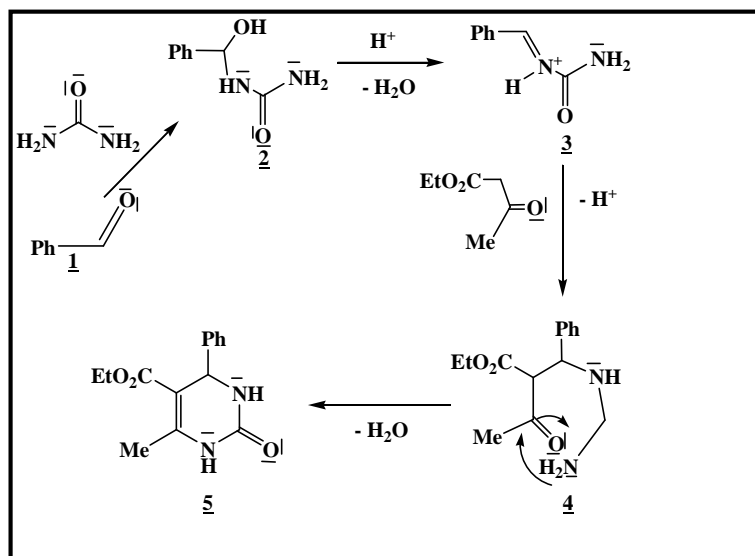


Schéma I.2 : Différentes étapes du mécanisme de la réaction de Biginelli

II.3. Intérêts biologiques des dihydropyrimidinones DHPMs

Les DHPMs présentent un système hétérocyclique d'une efficacité pharmacologique remarquable. un large domaine d'activités biologiques y compris l'activité antivirale, antitumorale, antibactérienne et anti-inflammatoire ont été attribuées à ces dérivés de la pyrimidinone partiellement réduits. Plus récemment, les DHPMs fonctionnalisées sont apparus comme de puissants inhibiteurs calciques, agents anti-hypertensifs, neuropeptides, et des agents adrénorécepteurs de type α_1 . Effectivement des DHPMs intéressantes sont considérées comme une classe importante de molécules dans le traitement de diverse maladies [17].

III. Synthèse sous irradiations micro-ondes

Les recherches menées aux interfaces de la chimie, de la biologie ou de la physique ont introduit un retour en force de la synthèse ciblée.

L'économie d'atomes, d'étapes et d'énergie est maintenant systématiquement recherchée, que ce soit pour préserver l'environnement ou pour des raisons financières. Dans ce contexte, il est important de développer de nouvelles méthodes, plus efficaces et plus rapides, permettant de mieux contrôler les sélectivités, tout en accédant à un degré de complexité élevé en un nombre limité d'opérations.

La chimie assistée par micro-ondes a connu un essor considérable ces dernières années avec l'arrivée sur le marché d'appareillages spécifiquement adaptés pour la synthèse. Ces

nouveaux réacteurs favorisent une meilleure reproductibilité des réactions et permettent actuellement une production quasi-industrielle. Les irradiations micro-ondes ont un effet bénéfique sur des réactions qui nécessitent des températures élevées et dont les temps de réaction sont importants. Les réactions impliquées sont également plus propres que par la voie traditionnelle (chauffages par bain d'huile ou métallique) aboutissent très souvent à des rendements supérieurs [18,19].

III.1. Micro-ondes

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques de longueurs d'onde intermédiaires entre l'infrarouge et les ondes de radiodiffusion [20].

En termes de fréquence, ce domaine s'étend de 300 MHz à 300 GHz, soit des longueurs d'onde comprises entre 1 m et 1 mm. Contrairement à la lumière du visible, exception faite des lasers, les micro-ondes sont des ondes cohérentes et polarisées, régies également par les lois de l'optique et pouvant être transmises, absorbées ou réfléchies selon le type de matériau rencontré. [20].

Le domaine des micro-ondes peut être divisé en bandes par des cadres de fréquence [20] :

- De 0.3 à 3 GHz UHF (Ultra-Haute Fréquences – ondes décimétriques)
- De 3 à 30 GHz SHF (Supra- Hautes Fréquences – ondes centimétriques)
- De 30 à 300 GHz EHF (Extra-Hautes Fréquences – ondes millimétriques)

Les micro-ondes utilisées en synthèse organique opèrent à une fréquence de 2,45 GHz, pour une longueur d'onde de 12,4 cm pour ne pas interférer avec les réseaux de communication. Les micro-ondes ne peuvent pas induire de réactions chimiques. Mais « chauffer » des produits organiques par micro-ondes est en réalité le résultat d'interactions entre les molécules. Une partie de l'énergie apportée par l'onde électromagnétique est réellement convertie en chaleur [21].

III.2. Four à micro-ondes

Le four à micro-ondes permet la cuisson rapide des aliments destinés à la consommation humaine ou animale. Il est de plus très pratique pour réchauffer des aliments

déjà préparés solides ou liquides. Le chauffage s'effectue par agitation des molécules d'eau contenues dans les aliments [22].

Cette agitation utilise la fréquence de résonance de la molécule d'eau, ainsi que sa polarisation électrique [22].

IV. Polyoxométallates de type Keggin

Les polyoxométallates (POMs) de type Keggin ont de vastes perspectives d'application en chimie de synthèse. Leurs propriétés acides et oxydantes dépendent de la composition et de la nature des composants et peuvent être modifiées en fonction des besoins de réaction. De plus, ils sont faciles à manipuler, non volatils et non toxiques. Les hétéropolyacides (HPA) ont été largement étudiés en tant que catalyseurs acides pour de nombreuses réactions dans notre laboratoire [23,24 ,25],

IV.1. Propriétés des polyoxométallates

Les hétéropolyacides ($H_n [XM_{12}O_{40}]$) de type Keggin sont des acides forts de Brønsted, leur force d'acidité est supérieure à celles des acides minéraux (H_2SO_4 , HCl, HBr), ils sont appelés superacides.

Dans le présent travail, une condensation multi-composants catalysée par $H_3PMo_{12}O_{40}$, de la curcumine, de l'aldéhyde aromatique et de l'urée / thiourée, utilisant l'irradiation par micro-ondes et le chauffage conventionnel est décrite. Une évaluation biologique des 3,4-dihydropyrimidinones dérivés de la curcumine comme antioxydants, antifongiques et agents antibactériens a été réalisée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Les références sont rédigées selon la norme ISO 690 (Norme AFNOR NFZ 44-005 de 1987).

- [1] LAL. J., SUSHIL. K. G., THAVASELVAM. D., AGARWAL. D. D. Sythesis and pharmacological activity evaluation of curcumine derivates. Chinese Chemical letters, 27, 2016, 1067-1072.
- [2] PORTES. E., « Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes : propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle», Thèse de doctorat, université de Bordeaux I, France, 2008, 1-34.
- [3] DAMOUR.B. «Le curcuma de la cuisine à la médecine», mémoire de fin de formation hippocratus, 2014, 6.
- [4] VINOD. S.T. Synthesis, caractérisation, application and inpurity profiling of curcumin derivatives. SOS in chemistry JIWAJI university, G WALIOR(MP).2017.1.
- [5] Rivera-Espinosa. Y., MURIEL. P. Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. Liver international, 2009, 1478-3223.
- [6] KIUCHI. F et al. Nematocidalactivity of turmeric : synergistic action of curcuminoids. Chem Pharm Bull. Toko, 1993.
- [7] Yang F., Lim G. P., Begum A. N., Ubeda O. J., Simmons M. R., Ambegaokar S. S., Chen P., Kayed R., Glabe C. G., Frautschy S. A., Cole G. M., *J. Biol. Chem.* 280,2005, 5892–5901.
- [8] Kolev. T. M., Velcheva. E. A., Stamboliyska. B. A and Spitteller. M. “DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin,” International Journal of Quantum Chemistry, 102, (6), 2005, 1069–1079.
- [9] SHAHID. N., Laboratoire phytomisan France 14, Rue de l'ours 68200 Mulhouse France ; valeur thérapeutique du curcuma ; source vitales 98, 2016,21.
- [10] SEGGANI. S., BOUKEHIL.H. «Corrélation entre le contenu polyphénolique et l'activité antioxydante et antimicrobienne in vitro de curcuma longa L». Mémoire de fin d'étude, université des frères Mentouri Constantine.2017.46.
- [11] ANAND. P et al., Bioavailability of curcumin : problems and promises. Molpharm. Nov-Dec, 4(6), 2007, 807-18.
- [12] CHRISTELLE. H., « Le curcuma, de l'épice au médicament », Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie, université HENRI POINCAIRE, Nancy 1, France, 2010,35.

Références bibliographiques

- [13] GHALEM. W., « Synthèse de molécules d'intérêts biologiques : Préparation des dérivés de la 3,4-dihydropyrimidinone et de la 1,4-dihydropyrimidine par des réactions à composants multiples », thèse de doctorat en sciences, université Mentouri Constantine, Algérie, 2009, 1.
- [14] Biginelli .P : Uber aldehyduramide des acetessigathers.Chem.Ber, vol.24, 1891, 1317.
- [15] Biginelli. P : Uber aldehyduramide des acetessigathers II. Chem. Ber., vol.24,1891, 2962.
- [16] BENAZZOUZ-TOUAMI. A., «Synthèse de nouvelles séries hétérocycliques d'intérêts thérapeutiques, valorisation en UV-visible et fluorescence». «Thèse de doctorat LMD, université de Tizi-Ouzou MOULOUD MAMMARI, Algérie, 2016.
- [17] CHOUGUIAT. L., « Développement de nouvelles méthodes pour les réactions multicomposants de Hantzsch et de Biginelli : préparation des 3,4-dihydropyrimidinones et 1,4-dihydropyridines», Mémoire pour l'obtention de grade de Magistère Mentouri de Constantine, Algérie, 2010.
- [18] Pour une revue récente : Kappe, C.O.Angew.Chem.Int.Ed., 43, 2004, 6250-6284.
- [19] Pour une revue récente de synthèse d'hétérocycles sous champ micro-onde : Besson, T. ; Brain, C., in « Hétérocyclic chemistry using microwave assisted approaches, CHAP.3» Microwave Assisted Organic Synthesis ; Tiernay, J.P. ; Lidstrom, Eds., Blackwell Publishing, 2005.
- [20] CHARMOND. S., « développement d'un four micro- ondes monomode et frittage de poudres céramique et métallique ». Thèse de doctorat université de Grenoble, France, 2009, 21.
- [21] BENABDALLAH. M., « Préparation et étude de la réaction de quelques dérivés de naphthoquinones en vue de leurs applications biologiques potentielles». Thèse de doctorat en chimie université d'ABOU-BEKR BELKAID Tlemcen, Algérie, 2012, 28.
- [22] MAKHLOUFI-CHEBLI, M. « Synthèses conventionnelles et sous irradiations micro-ondes de nouvelles séries chimiques d'intérêts biologiques. Dérivés de l'acide triacétique lactone TAL et de la 4-hydroxy-coumarine». « Thèse de doctorat, université des sciences et de la technologie HOUARI BOUMEDIENE, Algérie, 2009.
- [23] Saher. L., Makhloufi-Chebli. M., Dermech. L., Boutemeur-Khedis. B., Rabia. C., Silva. M. S. A., Hamdi. M. Keggin and Dawson-type polyoxometalates as efficient catalysts for the synthesis of 3,4-dihydropyrimidinones : experimental and theoretical studies Tetrahedron Letters 57, 2016,1492–1496.

Références bibliographiques

[24] Saher. L., Makhloufi-Chebli. M., Dermeche. L., Dermeche. S., Boutemeur-Khedis. B., Rabia. C., Hamdi. M., Artur M.S. Silva, 10-(4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2H-pyran-3-yl)-3-methyl-1H, 10Hpyrano [4,3-b] chromen-1-ones from a pseudo-multicomponent reaction and evaluation of their antioxidant activity *Tetrahedron* 74, 2018, 872-879

[25] Ighilahriz-Boubchir. K., Boutemeur-Kheddis. B., Rabia. C., Makhloufi-Chebli. M., Hamdi. M. and Silva. A. M. S. Recyclable Keggin Heteropolyacids as an Environmentally Benign Catalyst for the Synthesis of New 2-Benzoylamino-N-phenyl-benzamide Derivatives under Microwave Irradiations at Solvent-Free Conditions and the Evaluation of Biological Activity Molecules, 23,2018, 8.

CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE

I. Appareillages et techniques analytiques

I.1. Point de fusion

Les points de fusion des 3,4-dihydropyrimidinones ont été mesurés à l'aide d'un appareil digital de type melting point apparatus, SMP30 au laboratoire pharmaceutique pédagogique du département de chimie, UMMTO.

I.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La pureté des 3,4-dihydropyrimidinones a été contrôlée par chromatographie sur couche mince en utilisant des plaques prêtes à l'emploi en gel de silice de type 60 **F254** à support en aluminium. Les produits sont dissous dans le méthanol et l'éluant utilisé est un mélange de dichlorométhane (chlorure de méthylène) – méthanol (2.5 ml / 6 gouttes). La révélation des produits a été effectuée en utilisant l'iode sublimé.

I.3. Spectroscopie infrarouge

Les résultats de l'I.R ont été obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre **FT-IR BRUKER TENSOR 27 IR Spectrometer**. Les nombres d'onde $\bar{\nu}$ sont donnés en cm^{-1} . La dispersion d'une petite quantité de nos produits bien séchés sans **KBr** nous a permis d'obtenir les spectres IR.

I.4. Spectrophotométrie UV-Visible

Les spectres UV-Visible ont été enregistrés en solution dans le DMSO à température ambiante du laboratoire, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de type Thermo Scientifique EVOLUTION 220 relié à un ordinateur, au laboratoire de l'UMMTO.

I.5. Micro-onde utilisé pour la synthèse

Au cours de ce travail, nous avons utilisé un four micro-ondes de cuisine modifié muni d'un réfrigérant, d'une puissance maximale de 800 W. Il est commercialisé par la société THOMSON.



Figure II.1 : Micro-onde utilisé pour la synthèse des composés 4a-n.

II. Réactifs

Les solvants utilisés : l'éthanol, méthanol, dichlorométhane, diéthylether, diméthylsulfoxyde (DMSO) sont apportés par Honeywell, BIOCHEM, SIGMA – ALDRICH respectivement.

Les réactifs utilisés : la curcumine, l'urée, thiourée, aldéhydes aromatiques : benzaldéhyde, le 4-diméthylaminobenzaldéhyde, le 4-chlorobenzaldéhyde, le 4-hydroxybenzaldéhyde, le 2-hydroxybenzaldéhyde, le 3,4-dihydroxybenzaldéhyde, le 3-nitrobenzaldéhyde sont fabriqués par SIGMA, AnalaR NORMAPUR, BIOCHEM, SIGMA – ALDRICH, ALDRICH et MERCK – Schuchardt.

Le catalyseur utilisé est le : $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$ commerciale fabriqué par SIGMA – ALDRICH.

III. Manipulations

III.1. Synthèse conventionnelle des 3,4-dihydropyrimidin(2*H*)-1-ones/thiones

Dans un ballon de 50 ml, surmonté d'un réfrigérant et muni d'une agitation magnétique sont introduits 0.74 g de curcumine (2mmol), 0.18 g d'urée / 0.23g thiourée (3 mmol), un aldéhyde aromatique (2 mmol) avec un HPA ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$ / 5% mol) comme

catalyseur, dans 2 ml d'éthanol. Le mélange est porté au reflux pendant 6 à 9 heures (tableau II.1).

A la fin de la réaction de l'eau distillée est ajoutée. Le mélange réactionnel est chauffé pour éliminer la curcumine qui n'a pas réagi et le solide formé est récupéré par filtration à chaud puis séché et lavé à l'éther diéthylique, le solide récupéré ne nécessite pas une recristallisation.

La pureté a été contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM).

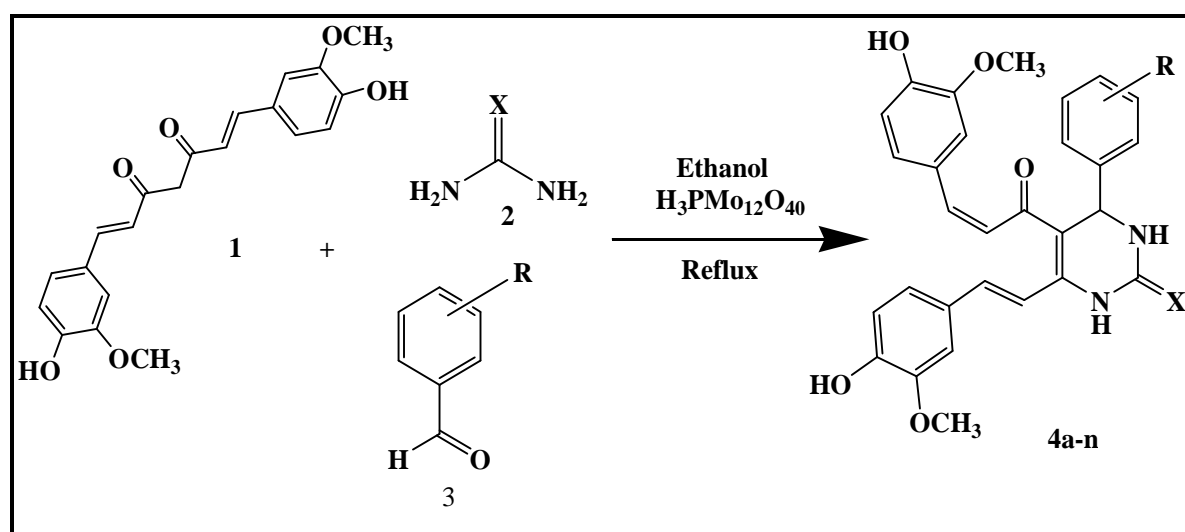


Schéma II.1 Mécanisme général de synthèse conventionnelle des 3,4-dihydropyrimidin (2H)-1-ones / thiones à partir de la curcumine.

III.2. Synthèse sous irradiations micro-ondes des 3,4-dihydropyrimidin (2H)-1-ones/ thiones

Dans un ballon de 50 ml sont introduits 0.74 g de curcumine (2mmol), 0.18 g d'urée / 0.23g thiourée (3 mmol), un aldéhyde aromatique (2 mmol) avec un HPA (H₃PMO₁₂O₄₀/ 5% mol) comme catalyseur, dans 2 ml d'éthanol. Le mélange est ensuite placé dans un micro-onde muni d'un réfrigérant à 800 W pendant un temps qui varie entre 2 min et 3 min 30 (tableau II.1).

A la fin de la réaction on rajoute de l'eau distillée froide, le solide formé est filtré à chaud puis séché et lavé à l'éther diéthylique, le solide récupéré ne nécessite pas une recristallisation. La pureté a été contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM).

Tableau II.1 : Durée des réactions effectuées

| Entrée | N° Composé | R | X | Procédé du chauffage | |
|--------|---------------|------------------------------------|---|----------------------|----------------|
| | | | | Conv (durée) | M.O (durée) |
| 1 | 4a | H | O | 9h | 2 min 30 s |
| 2 | 4b | 4-N(CH ₃) ₂ | O | 9h | 3 min |
| 3 | 4c | 4-Cl | O | 6h | 2 min 30 s |
| 4 | 4d | 2-OH | O | 9h | 2 min 30 s |
| 5 | 4e | 4-OH | O | 9h | 2 min 30 s |
| 6 | 4f | 3,4-OH | O | 9h | 2 min 30 s |
| 7 | 4g | 3-NO ₂ | O | 9h | 3 min 30 s |
| 8 | 4h | H | S | 9h | 2 min 30 s |
| 9 | 4i | 4-N(CH ₃) ₂ | S | 9h | 2 min 30 s |
| 10 | 4j | 4-Cl | S | 6h | 2 min 30 s |
| 11 | 4k | 2-OH | S | 9h | 2 min 30 s |
| 12 | 4l | 4-OH | S | 9h | 2 min 30 s |
| 13 | 4m | 3,4-OH | S | 9h | 2 min 30 s |
| 14 | 4n | 3-NO ₂ | S | 9h | 3 min 30 s |

IV. Etude de l'activité biologique des 3,4-dihydropyrimidin (2*H*)-1-ones/ thiones

IV.1. Activité antioxydante

IV.1.1. Principe

La méthode du DPPH est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH[•]. En présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPH-H.

La réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, initialement violet foncé sous sa forme libre, devient jaune pâle après transfert d'électron par des composés antioxydants.

Cette réduction qui se traduit par une diminution de l'absorbance de la solution de DPPH[•] en présence d'antioxydant est suivie par spectrophotométrie à 518 nm par rapport à un témoin d'antioxydant commercial.

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité de piéger le radical libre est généralement estimée par le pourcentage d'inhibition donné par la relation suivante :

$$(\%) \text{ d'inhibition} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100. \quad (1)$$

A₀ : Absorbance à 518 nm du standard (contient tous les éléments mais sans aucun échantillon).

A₁ : Absorbance à 518 nm de l'échantillon après une heure de temps.

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur d'IC₅₀, sachant que la IC₅₀ est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50 % de la forme réduite du radical DPPH[•].

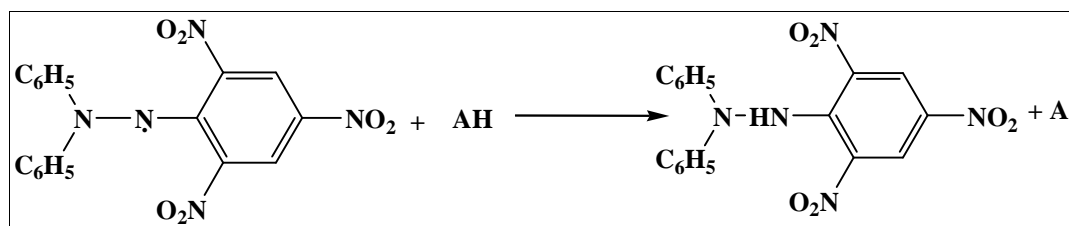


Schéma II.2 : Mécanisme général de réduction de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH).

IV.1.2. Mode opératoire

Les produits testés sont préparés à des concentrations de 10^{-1} mol/l dans le DMSO puis dilués à un demi pour avoir des concentrations de 5×10^{-2} M ; $2,5 \times 10^{-2}$ M ; $1,25 \times 10^{-2}$ M et $6,25 \times 10^{-3}$ M. Quant à la solution de DPPH[•], elle est préparée en solubilisant 20 mg de DPPH dans 500 ml d'éthanol.

Un volume de 40 μ l, de chaque échantillon de chacune des concentrations est ajouté à 2 ml d'une solution de radicaux DPPH[•] dissoute dans l'éthanol. Le mélange est secoué énergiquement et laissé pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière.

L'absorbance du DPPH[•] est déterminée par spectrophotométrie Visible à 518 nm.

Les résultats obtenus pour chaque produit testé sont comparés à ceux obtenus pour l'acide ascorbique pris comme contrôle positif.

Le blanc ou le standard est préparé à partir de 2 ml de la solution éthanolique du radical DPPH[•] et 40 µl de DMSO puis laissé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant une heure.

IV.2. Activité antifongique

IV.2.1. Levures testées

Nous avons travaillé sur deux souches de levures fournies par le laboratoire de parasitologie mycologie du CHU de Tizi-Ouzou.

- **Candida albicans** : est un champignon microscopique, habituellement inoffensif et que nous retrouvons sans effet pathologique, au niveau des voies génitales, du tube digestif, de la bouche et sur la peau. Dans certains cas, il peut devenir pathogène et provoquer une candidose, une infection fongique lorsque ce champignon atteint des organismes fragilisés dont les défenses immunitaires sont diminuées, comme chez les personnes porteuses du virus VIH ou les patients sous traitement immunosuppresseurs (dans le cadre de maladies auto-immunes, de traitements pour des cancers ou après une greffe). Généralement, les lésions causées par le candida albicans sur les muqueuses ou la peau sont sans gravité. Mais elles peuvent être plus graves lorsqu'elles atteignent les viscères digestifs ou les poumons ; dans les cas extrêmes, une septicémie à candida albicans est possible et de pronostic sévère.
- **Rhodotorula** : C'est des levures ovoïdes qui se reproduisent par bourgeonnement multilatéral. Elles sont très répandues dans la nature on les trouve au niveau du sol, dans l'eau, les aliments.
Cette levure a été retrouvée à l'origine de septicémies, de méningites, de kératites.

IV.2.2. Milieu de culture

Nous avons utilisé un milieu Sabouraud chloramphénicol, c'est un milieu couramment utilisé pour l'étude de la croissance des levures.

IV.2.3. Méthode

L'évaluation de l'activité des 3,4-dihydropyrimidin (2H)-1-ones / thiones est réalisée par la méthode de diffusion sur milieu Sabouraud chloramphénicol.

Deux inoculum ont été préparés à partir de deux cultures jeunes ; *Candida albicans* (isolé à partir de prélèvements urinaire) et *Rhodotorula* (isolé à partir des ongles contaminés) âgées de 24 heures et mises en croissance sur Sabouraud chloramphénicol en pente à 37°C. Les levures ont été prélevées à l'aide d'une pipette pasteur puis homogénéisées dans 10 ml d'eau physiologique. Nous obtenons deux suspensions troubles utilisées pour l'encensement en stries transversales à l'aide d'écouvillons sur les milieux de culture préalablement fondus, coulés et séchés dans des boîtes de pétri stériles, ensuite des disques stériles imbibés de 20 µl de chaque solution de produit à tester d'une concentration de $2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$, ont été déposés sur les milieux de cultures solides.

Les boîtes de pétri ont été ensuite mises dans un incubateur à 37°C pendant 48 heures.

IV.3. Activité antibactérienne

IV.3.1. Choix et origines des souches bactériennes testées

Le choix des bactéries a été porté sur trois souches fréquentes en pathologie humaine qui ne possèdent aucune résistance acquise.

- ✓ Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 - ✓ Bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922
- *Escherichia coli* : C'est une bactérie intestinale Gram négatif des Mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie. *E.coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire [1].
- *Pseudomonas aeruginosa* : Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de flagelles, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques [1]. Elles sont responsables de 16 % des cas de pneumonie nosocomiale, 12 % des infections urinaires [2].
- *Staphylococcus aureus* : ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880. En 1883, Ogston a créé le nom «Staphylocoque» pour décrire ces grains groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin. Ce sont des cocci Gram positif, de forme non sporulée, elles sont habituellement non capsulées ou possèdent des capsules limitées et se développent uniquement en anaérobiose [3,4].

Les *Staphylococcus aureus* sont responsables des infections postopératoires de blessures, endocardite aigue, intoxication alimentaire [4].

IV.3.2. Repiquage

Les trois souches bactériennes sont ensemencées dans un milieu usuel (gélose nutritive) et un milieu sélectif Hektoen pour *E. coli* et *Pseudomonas* (Gram négatif) et un milieu sélectif (chapman) pour le *Staphylococcus aureus* (Gram positif), ces dernières sont incubées à 37°C pendant 18h, pour obtenir des souches fraîches.

IV.3.3. Confirmation des souches bactériennes

Pour la confirmation des souches bactériennes, nous avons effectué plusieurs tests :

- Aspect macroscopique : observer la forme et la couleur des colonies.
- Aspect microscopique (état frais) : apprécier la mobilité, le type de mobilité à l'objectif 40 et la coloration de gram à l'objectif 100 avec l'huile d'immersion.
- Test de coloration de gram : apprécier la mobilité des bactéries et vérifier la coloration de gram ; les bactéries colorées en violet sont des Gram positif tandis que celles colorées en rose sont des Gram négatif
- Galerie biochimique API
- Galerie biochimique classique
- Recherche de la catalase
- Recherche d'un cytochrome oxydase
- Recherche d'une coagulase pour le *Staphylococcus aureus*.

IV.3.4. Réalisation de l'antibiogramme

IV.3.4.1. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18 h à 24h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'un écouvillon quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Ensuite bien décharger l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 % puis homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 MF ou à une DO de 0.08 à 0.10 lue à 625 nm [5].

IV.3.4.2. Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur milieu Muller-Hinton, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées en tournant la boîte à chaque fois de 60°. Tout en travaillant dans une zone d'asepsie au tour du bec bunsen.

Les disques imprégnés de 10µl de l'échantillon à tester sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

- Les échantillons à tester ont été dissous dans le DMSO à une concentration de 10^{-1} M.
- Le témoin positif représente l'antibiotique utilisé, il est choisi selon la nature de la souche bactérienne.

IV.3.4.3. Incubation

Les boîtes de pétri sont ensuite formées et mises à l'étuve à 37°C pendant 24h.

IV.3.5. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI pour un germe donné, correspond à la plus petite concentration inhibant toute croissance visible à l'œil nu [6].

L'évaluation de la CMI consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) en utilisant la technique de dilution en milieu solide [6].

Cette méthode doit être réalisée uniquement pour les souches qui ont présentées une sensibilité aux produits testés cependant pour confirmer les résultats de l'antibiogramme nous avons lancé les CMI pour tous les germes testés dans l'antibiogramme.

IV.3.5.1. Méthode

Ce test a été réalisé sur quatre produits (4b, 4j, 4k, 4l). La solution mère a été préparée à partir de 51.2 mg de chaque produit dans 10 ml de DMSO, ensuite on a procédé à une gamme de dilution en prélevant 2ml de la solution mère de concentration C_0 à laquelle on ajoute 2ml de DMSO, on obtient une solution diluée de concentration C_1 on continue les dilutions en procédant de la même manière jusqu'à l'obtention d'une concentration C_3 . ($C_3 < C_2 < C_1 < C_0$).

On prend 2ml de chaque concentration qu'on met dans des boîtes de pétri stériles ensuite on rajoute 18 ml de gélose Muller Hinton (MH) préalablement fondue au bain marie pour obtenir une épaisseur de 4mm.

Chaque boîte de pétri a été divisée en trois compartiments correspondant aux trois souches bactériennes. Ensuite on injecte 2µl de suspensions bactériennes à 5 MF au milieu de chaque compartiment.

IV.3.5.2. Incubation

Les boîtes de pétri sont mises à l'incubateur à 37°C pendant 24 heures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] PERCIVAL, SL. Microbiolog of water bornediseases. Ed. Amsterdam, Boston : Elsevier Academicn Press, 480,2004.
- [2] VAN DELDEN, C., IGLEWSKI, BH. Cell-to-cellsignalin and Pseudomonas aeruginosa infections. *Energ Infect Dis*, 4,1998, 551.
- [3] AVRIL. J. L., DABERNAT. H., DENIS. F., MONTEIL. H. Bactériologie clinique. 2^{ème} édition. Mars 1992. 9.
- [4] DWORK, MM., Falkows. *Microbes at work : From wastes to resources*. Ed. New York : springer, 2006, 1248.
- [5] Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). 7^{ème} édition. 2014.22.
- [6] HADDAD. D., Hadji. D. « Contribution à l'étude de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L ». *Projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie*. Tizi-Ouzou, Algérie, 2016, 79.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Introduction

La curcumine est une β -dicétone bis- α , β -insaturée. En tant que tel, la curcumine existe en équilibre avec son tautomère énol. Cette forme est utilisée dans la synthèse des analogues 3,4-dihydropyrimidinones de la curcumine. La forme bis-céto prédomine dans les solutions aqueuses acides et neutres [1,2]. À un pH de 3 à 7, la curcumine agit comme un donneur d'atomes H extraordinairement puissant (fig.III.1). En revanche, au-dessus de pH 8, la forme énolate de la chaîne heptadienone prédomine, et Curcumin agit principalement comme un donneur d'électrons, un mécanisme plus typique de l'activité de piégeage antioxydants phénoliques [3].

Elle est insoluble dans l'eau et l'éther de pétrole, soluble dans l'éthanol, le méthanol, l'acétone, le diéthylother, le dimethylsulfoxyde, le chloroforme et le dichlorométhane. La curcumine et ses dérivés possèdent une grande variété d'activités à savoir, antibactérien, antifongique, antiviral, anti-HIV, anti-inflammatoires, antiparkinsoniens, anti-Alzheimer, anti-angiogénèse, activité de piégeage des radicaux libres, antirhumatismaux, antipaludéens, anticancéreux, anti-protazoaires, antimutagènes, traitement des plaies, activité hépato-protectrice, l'activité anti-leishmanienne et la maladie cardiaque amyloïde [4]. Outre la curcumine, les 3,4-dihydropyrimidinones possèdent diverses propriétés pharmaceutiques telles que antibactérien, antiviral, et antioxydant [4].

Très peu de travaux ont été relevés dans la littérature qui portent sur la synthèse des DHPMs à partir de la curcumine [5,6 ,7]. Vue la valeur biologique antiviral, et antioxydant de la curcumine et des analogues de la dihydropyrimidinone, il a été décidé de synthétiser, caractériser et évaluer leur activité biologique. Cependant, des études ont montré que le curcuma présente plusieurs inconvénients en pharmacocinétique comme une faible biodisponibilité, métabolisme rapide et nécessite des dosages oraux répétitifs [8]. La curcumine est toujours un excellent composé principal pour la conception de médicaments et développement sur la base de bioactivités explicites, de non-toxicité et synthèse facile [9].

Au meilleur de nos connaissances, l'activité antibactérienne, Antifongique et antioxydante des 3,4-dihydropyrimidinones de la curcumine ne sont pas encore signalés. Dans cette étude, la synthèse et évaluation biologique des 3,4-dihydropyrimidinones de la curcumine ont été effectuées contre des souches bactériennes standard ainsi que l'activité antioxydante.

II. Synthèse des 3,4-dihydropyrimidin (2H)-1-ones / thiones à partir de la curcumine

La réaction multicomposants (one pot) d'un équivalent de la curcumine, un aldéhyde aromatique (1 équivalent) et l'urée / thiourée (1 équivalent) en présence de 5mol % d'un hétéropolyacide de type Keggin $H_3PMo_{12}O_{40}$ comme catalyseur et dans un minimum de solvant (2 ml d'éthanol) est portée au chauffage conventionnel dans un premier temps, et sous irradiation par micro-ondes dans un deuxième temps. Par les deux modes de chauffage, la réaction a conduit à la formation des 3,4-dihydropyrimidin (2H)-1-ones / thiones, avec de très bons rendements (schéma III.1, tableau III.1). Leur pureté est confirmée par CCM et leurs structures sont identifiées par différentes techniques d'analyses ; spectrophotométrie UV-Visible et infrarouge IR et comparées à celles reportées dans la littérature.

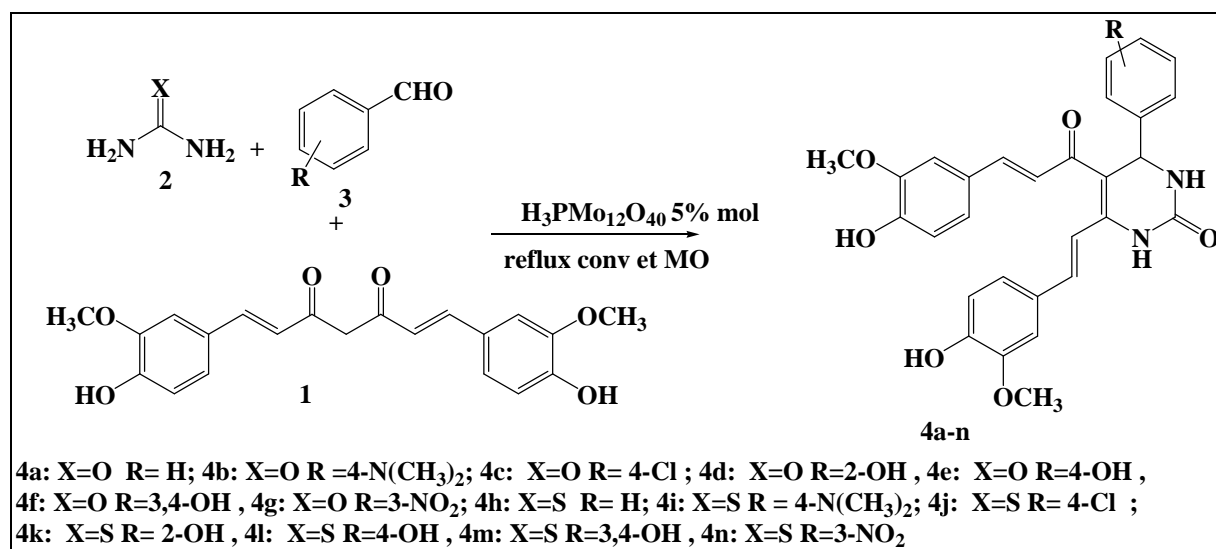


Schéma III. 1 Synthèse des DHPMs à partir de la curcumine

Les propriétés physico-chimiques de ces produits sont données dans le tableau 3.1 ci-dessous.

Tableau III.1 : Résultats et propriétés physico-chimiques des DHPMs obtenus

| Composé | Aspect | Rdt | | Rdt litt [réf] | Pf °C | Pf litt °C [réf] |
|---------|----------------------|------|----|-------------------|-------|---------------------|
| | | Conv | MO | | | |
| 4a | P. marron foncé | 90 | 87 | 79 [6] | 203 | 206 [5] |
| 4b | P. cris noire | 80 | 93 | - | 194 | - |
| 4c | P. cris grenat | 79 | 96 | 94 [5] | 194 | 202 [5] |
| 4d | P. cris rouge brique | 83 | 97 | 96 [5] | 146 | 150 [1] |
| 4 e | P. cris noire | 44 | 96 | 95 [5] | 145 | 151 [1] |
| 4f | P. cris noire | 81 | 96 | - | 220 | - |
| 4g | P. cris marron | 88 | 98 | - | 157 | - |
| 4h | P. cris marron foncé | 85 | 95 | 95 [5] | 194 | 217 [1] |
| 4i | P. cris noire | 98 | 97 | - | 195 | - |
| 4j | P. marron foncé | 80 | 96 | 96 [5] | 197 | 202 [5] |
| 4k | P. cris noire | 98 | 94 | 95 [1] | 243 | 262 [1] |
| 4l | P. marron foncé | 93 | 95 | 93 [1] | 261 | 263 [1] |
| 4m | P. cris noire | 92 | 98 | - | 212 | - |
| 4n | P. cris noire | 95 | 97 | - | 206 | - |

D'après les résultats représentés dans le tableau III.1 ci-dessus, nous remarquons que d'excellents rendements (92-97%) sont obtenus avec la synthèse sous irradiations micro-ondes.

III. Mécanisme de la réaction

Dans cette réaction en présence de catalyseur, initialement l'urée réagit avec l'aldéhyde aromatique pour former la base de Schiff (schéma III.2), qui réagit avec la curcumine pour former des produits ciblés (4a-n). Dans la présente réaction, la curcumine est utilisée comme fragment dicarbone au lieu des fractions dicarboxyliques traditionnelles telles que l'acétylacétone et l'acétoacétate d'éthyle.

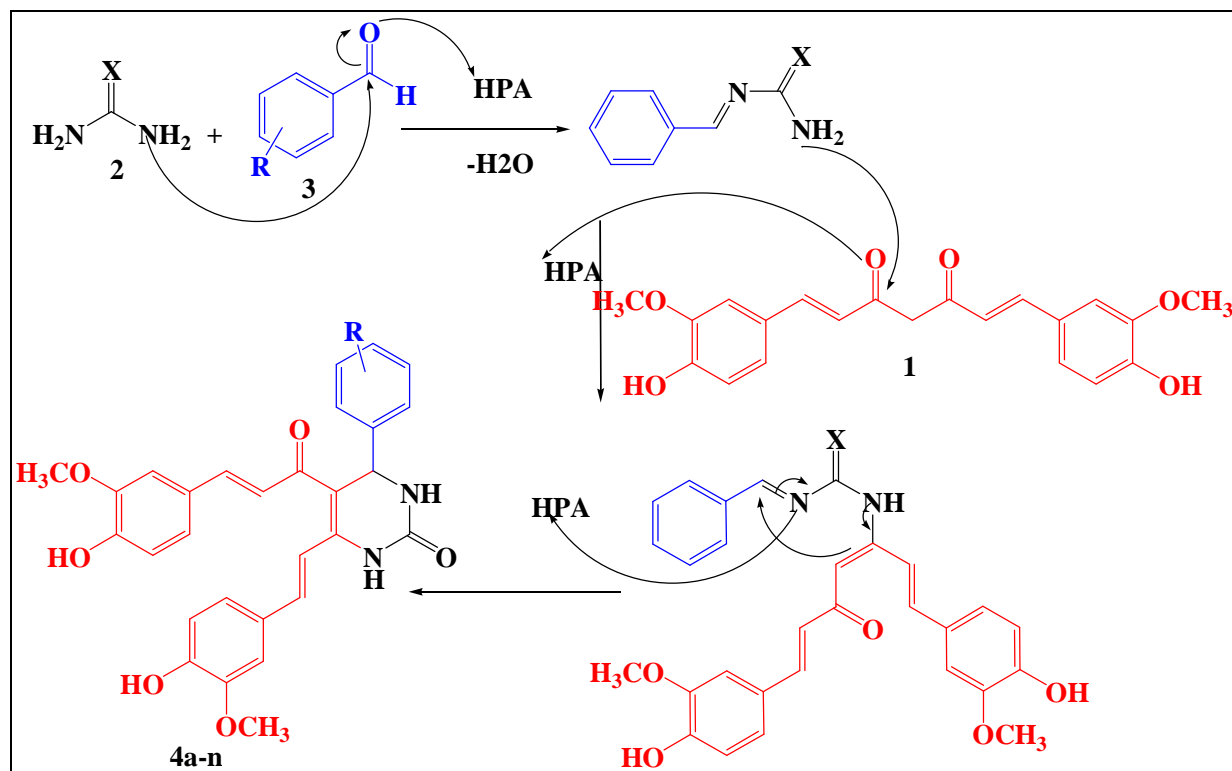


Schéma III.2. Mécanisme de synthèse des DHPMs à partir de la curcumine

IV. Résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) des composés 3,4-dihydropyrimidin (2*H*)-1-ones / thiones en utilisant un éluant constitué d'un mélange de solvants dichlorométhane-méthanol (2.5 ml / 6 gouttes) a révélé la présence d'une seule tache pour tous les produits 4a-n avec des R_f représentés dans le tableau III.2 ci-dessous.

Tableau III.2 : Rapports frontaux des différents produits

| Composé | R _f | Composé | R _f |
|---------|----------------|---------|----------------|
| 4a | 0,33 | 4h | 0,58 |
| 4b | 0,30 | 4i | 0,47 |
| 4c | 0,31 | 4j | 0,29 |
| 4d | 0,43 | 4k | 0,32 |
| 4e | 0,44 | 4l | 0,44 |
| 4f | 0,65 | 4m | 0,43 |
| 4g | 0,42 | 4n | 0,42 |

V. Analyse par spectrophotométrie UV-Visible

Les spectres d'absorptions UV-Visible des composés **4a-n** et de la curcumine sont réalisés dans le DMSO. **4a-n** montrent trois bandes d'absorption contrairement à la curcumine qui ne montre qu'une seule bande à 437 nm. Le noyau DHPM absorbe aux environ 270-272 nm [9]. Les valeurs des longueurs d'ondes d'absorption sont rapportées dans le tableau III.3.

Les spectres de l'analyse par spectrophotométrie UV-Visible des composés 4a-n et de la curcumine sont donnés dans les figures III.2 jusqu'à III.16.

Tableau III.3 : Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible des composés 4a-n [10].

| Composé | λ abs (nm) | Composé | λ abs (nm) |
|-----------|---------------------|---------|---------------------|
| Curcumine | 437 π - π^* | 4g | 272 π - π^* |
| 4a | 272 π - π^* | | 368 π - π^* |
| | 365 π - π^* | | 436 π - π^* |
| 4b | 270 π - π^* | 4h | 272 π - π^* |
| | 347 π - π^* | | 365 π - π^* |
| | 426 π - π^* | 4i | 271 π - π^* |
| 4c | 270 π - π^* | | 348 π - π^* |
| | 369 π - π^* | | 398 π - π^* |
| | 428 π - π^* | 4j | 272 π - π^* |
| 4d | 271 π - π^* | | 370 π - π^* |
| | 363 π - π^* | 4k | 272 π - π^* |
| | 427 π - π^* | | 374 π - π^* |
| 4e | 278 π - π^* | | 428 π - π^* |
| | 349 π - π^* | 4l | 277 π - π^* |
| | 428 π - π^* | | 370 π - π^* |
| 4f | 270 π - π^* | 4m | 269 π - π^* |
| | 363 π - π^* | | 379 π - π^* |
| | 429 π - π^* | 4n | 272 π - π^* |
| | | | 331 π - π^* |
| | | | 373 π - π^* |

VI. Analyse par spectroscopie IR

Les spectres infrarouge sont représentés en annexes figures III.17 jusqu'à III.31.

L'analyse par spectroscopie IR confirme l'obtention des composés **4a-n** par apparition des bandes caractéristiques de la 3,4-dihydropyrimidin (2*H*)-1-one / thione aux environs de 3200 cm^{-1} (-NH) et 1500-1600 cm^{-1} (C=O) et la bande caractéristique du groupement (R). Les principales bandes obtenues sont données dans le tableau III.4.

Tableau III.4 : Résultats de spectroscopie IR des composés 4a-n

| Composé | Nombre d'onde cm^{-1} | Nombre d'onde cm^{-1} littérature |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Curcumine | 3508 (OH) ; 3274 (-NH) ; 2944 (-CH) ; 1611 (C=O) ; 1508 (C=C) ; 1268 (-C-O Aryl) | |
| 4a | 3506 (OH) ; 3364 (-N-H) ; 2941 (-CH) ; 1596 (C=O), 1509 (C=C), 1269(-C-O Aryl) | 3500, 3213, 2937, 1593, 1514, 1435, 1276, 1031, 962 |
| 4b | 3494 (OH) ; 3405 (-N-H) ; 2934 (-CH) ; 1587 (C=O), 1507 (C=C), 1261 (-C-O Aryl) | [4] |
| 4c | 3471(OH) ; 3368(-NH) ; 2940 (-CH) ; 1583 (C=O) ; 1507 (C=C) ; 1265 (-C-O Aryl) | |
| 4d | 3462(OH) ;3359(-NH) ;2961(-CH) ;1587 (C=O) ; 1507 (C=C) ; 1261 (-C-O Aryl) | |
| 4e | 3488 (OH) ; 3358 (-N-H) ; 2940 (-CH) ; 1587 (C=O) ; 1507 (C=C) ;1268 (C-O Aryl) | |
| 4f | 3465(OH) ;3358(-NH) ;2934(-CH) ;1573 (C=O) ; 1500 (C=C) ; 1268 (-C-O Aryl) | |
| 4g | 3664(OH) ;3365(-N-H) ;2980(-CH) ; 1587(C=O) ;1513(C=C) ;1255(-C-O Aryl) | |
| 4h | 3517(OH) ;3345(N-H) ;2934(-CH) ;1579 (C=O) ; 1513 (C=C) ; 1268 (-C-O Aryl) | |
| 4i | 3611(OH) ;3345(-N-H),2940(-C-H) ;1587 (C=O) ; 1507 (C=C) ; 1261 (-C-O Aryl) | |
| 4j | 3504(OH) ; 3352 (-N-H) ;2927 (-CH) ; 1579 (C=O) ;1507 (C=C) ; 1261(-C-O Aryl) | |

| | | |
|----|----------------------------------------------------------------------------------|--|
| 4k | 3604 (OH) ; 3339 (-NH) ; 2940 (-CH) ; 1579 (C=O) ; 1513 (C=C) ; 1261 (-C-O Aryl) | |
| 4l | 3506 (OH) ; 3372 (-NH) ; 1579 (C=O) ; 1507 (C=C) ; 1261 (-C-O Aryl) | |
| 4m | 3505(OH) ; 3332(-NH) ; 1573 (C=O) ; 1513 (C=C) ; 1268 (-C-O Aryl) | |
| 4n | 3664 (OH) ; 3339 (NH) ; 2974 (-CH) ; 1573 (C=O) ; 1507 (C=C) ; 1255(-C-O Aryl) | |

VII. Résultats de l'activité antioxydante

A notre connaissance, l'activité antioxydante des 3,4-dihydroprimidin (2H)-1-ones / thiones 4 a été réalisée que pour très peu de composés dans la littérature.

Il nous a paru donc intéressant d'augmenter la série des produits 4 et cibler des substituants donneur de radicaux H[•] et rechercher ceux possédant l'activité antioxydante la plus élevée et la comparer à l'acide ascorbique ou vitamine C, composé naturel connu pour son pouvoir antioxydant très élevé. Ceci aura pour avantage de les valoriser.

Les résultats obtenus par ce test sont indiqués dans les figures III.32 et III.33, qui représentent la Densité Optique des produits testés et celle de l'acide ascorbique (référence), en fonction de la concentration. Ces figures montrent que la Densité Optique du DPPH[•] diminue avec l'augmentation de la concentration du produit testé et que cette observation est beaucoup plus importante pour le composé 4m. Ceci pourrait avoir un lien avec la présence de plusieurs groupements hydroxyles sur le composé. La bande d'absorption du DPPH[•] disparaît complètement pour la majorité des composés 4, pour les concentrations inférieures à $2,5 \times 10^{-2}$ M.

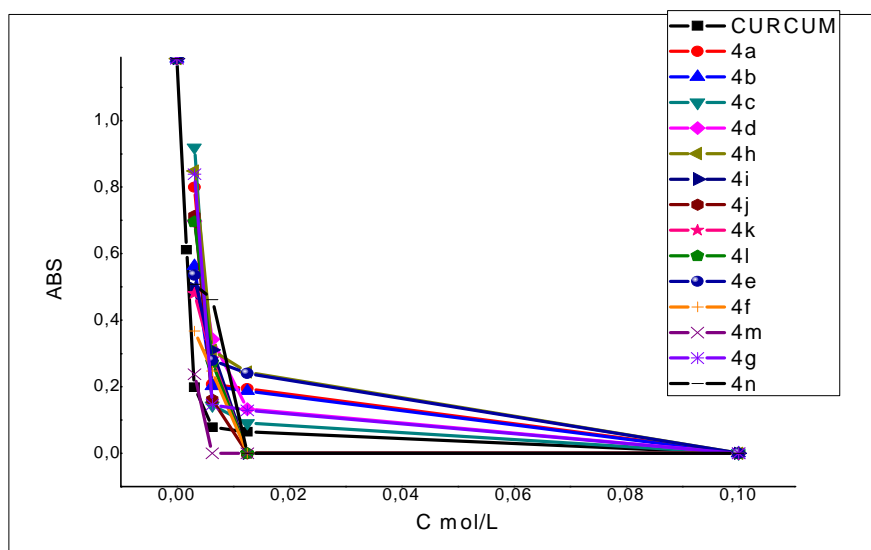


Figure III.32 : Densité Optique en fonction de la concentration des composés 4a-n

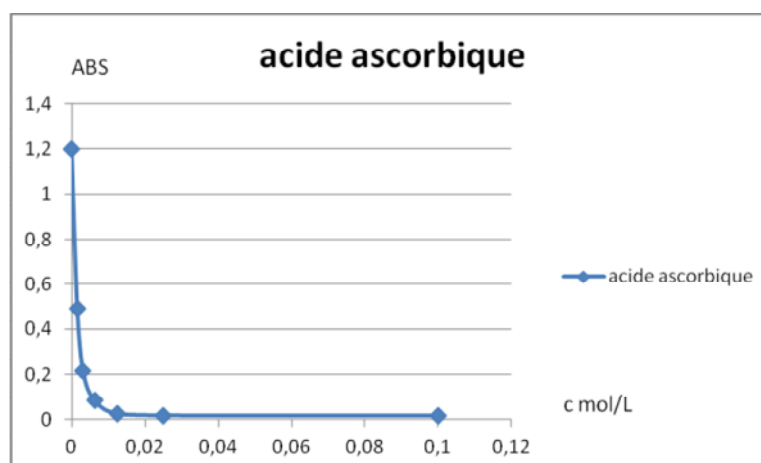


Figure III.33 : Densité Optique en fonction de la concentration de l'acide ascorbique

Les pourcentages de capture du radical DPPH[•] (%CR) ou les pourcentages d'inhibition sont calculés par la relation (1) (voir chapitre 1).

D'après les résultats, les composés 4a-n montrent une très bonne activité antioxydante. En effet, leur pourcentage d'inhibition est de presque 100 % pour tous ces produits, pour les concentrations 10^{-1} M, 5×10^{-2} M, $2,5 \times 10^{-2}$ M. Par ailleurs le pourcentage d'inhibitions des composés 4f, 4i, 4j, 4l, 4m, 4n restent ~ 100 % pour une concentration de $1,25 \times 10^{-2}$ M et ils présentent une activité plus importante que la curcumine, contrairement aux pourcentages d'inhibition des autres produits qui décroissent à partir de cette concentration et dont l'activité est inférieur à celle de la curcumine.

D'après les résultats trouvés dans la littérature [6] les six produits, **4a**, **4d**, **4e**, **4h**, **4k**, **4l** ont démontré une activité supérieure à celle de l'acide ascorbique. Ce qui est en concordance avec nos résultats, notamment avec les produits dihydropyrimidine-thiones.

Les figures III. 34 à 47 représentent le % CR en fonction de la [C] pour les différents produits testés et de l'acide ascorbique.

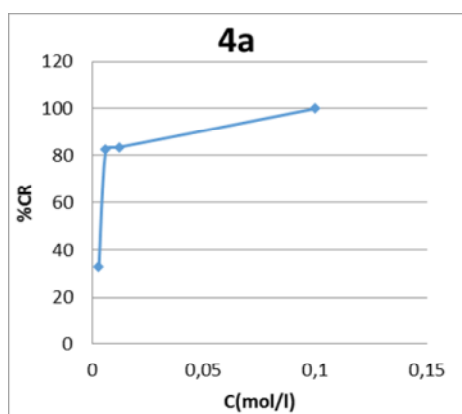


Figure III.34 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH' du composé 4a

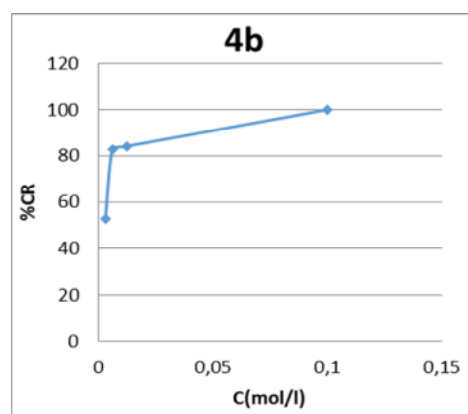


Figure III.35 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH' du composé 4b

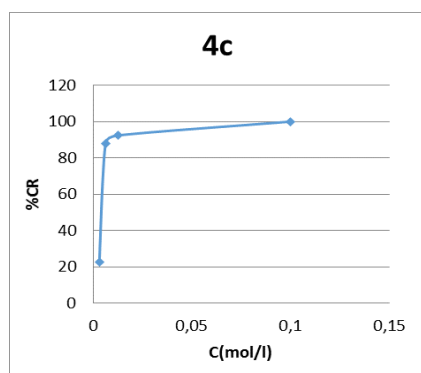


Figure III.36 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH' Du composé 4c

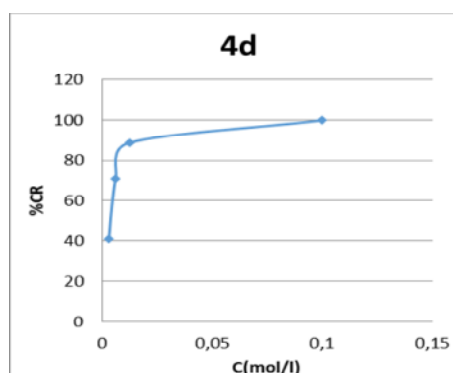


Figure III.37 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH' du composé 4d

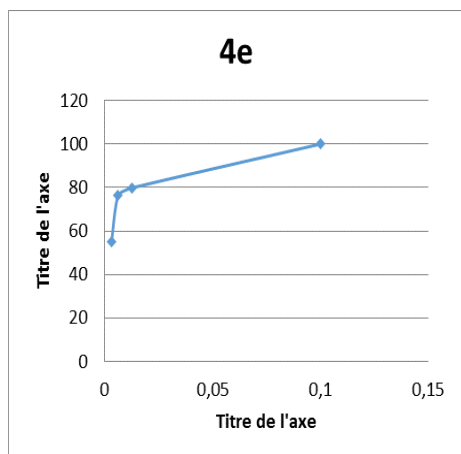


Figure III.38 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH' du composé 4e

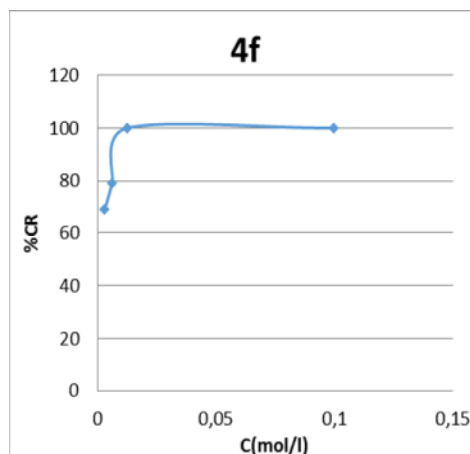


Figure III.39 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH' du composé 4f

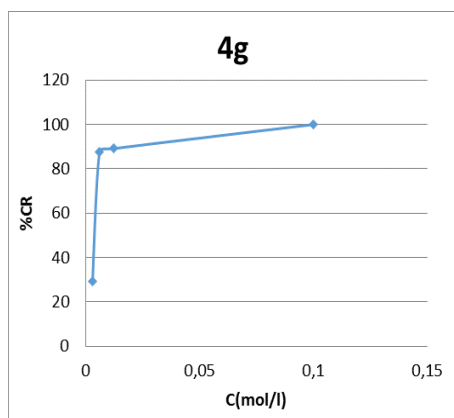


Figure III.40 : Pourcentage d'inhibition du radical Libre DPPH' du composé 4g

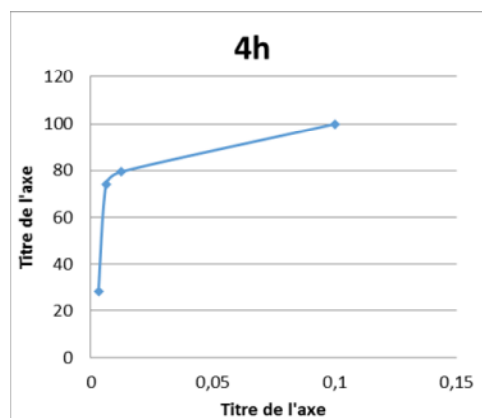


Figure III.41 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH' du composé 4h

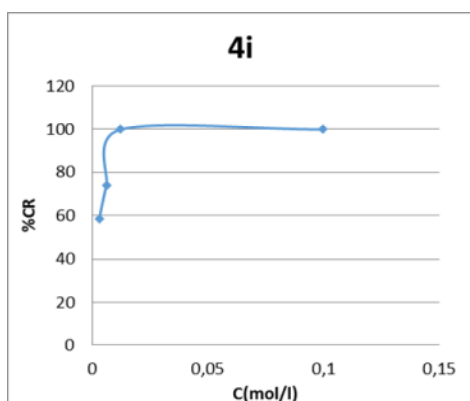


Figure III.42 : Pourcentage d'inhibition du radical d'inhibition libre DPPH' du composé 4i composé 4j

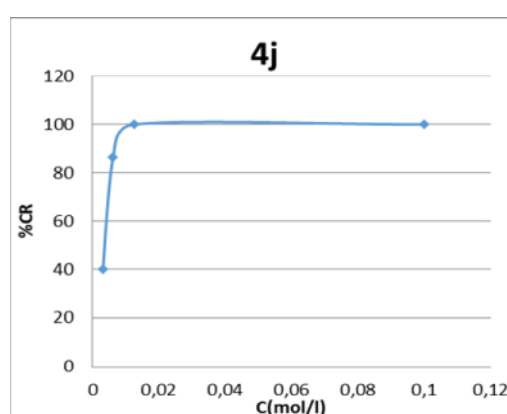


Figure III.43 : Pourcentage du radical libre DPPH' du

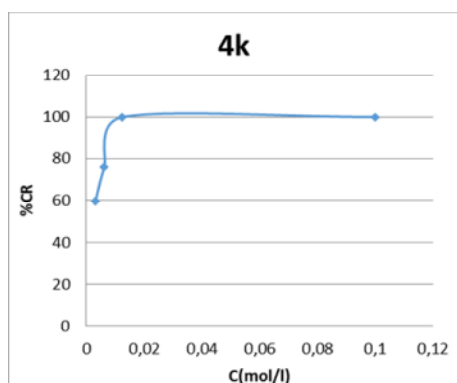


Figure III. 44 : Pourcentage d'inhibition
Du radical libre DPPH' du composé 4k

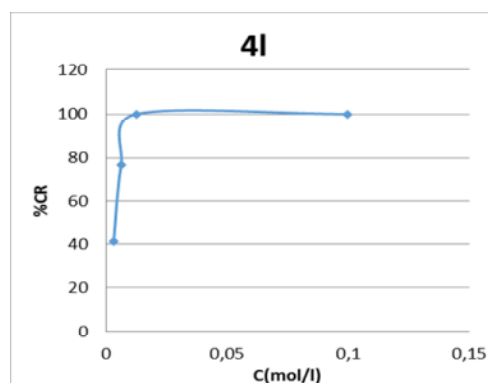


Figure III .45: Pourcentage d'inhibition libre
du radical libre DPPH' du composé 4l

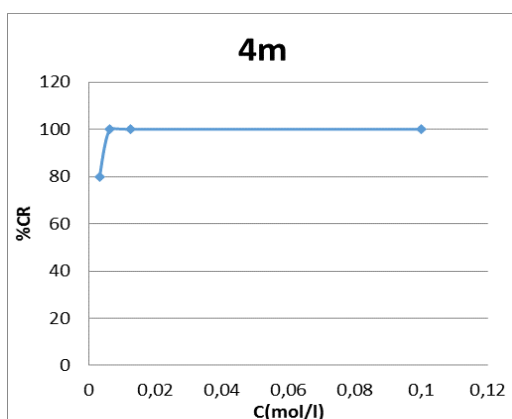


Figure III.46 : Pourcentage d'inhibition
du radical libre DPPH' du composé 4m

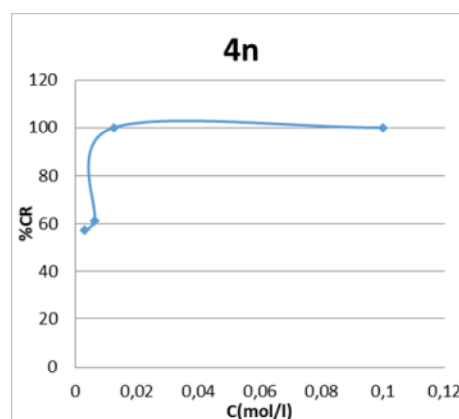


Figure III .47 : Pourcentage d'inhibition
du radical libre DPPH' du composé 4n

VIII. Détermination de la CE50 ou IC50

La concentration efficace (CE50) est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur de CE50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. La concentration inhibitrice minimale (50) est estimée par extrapolation à % CR= 50% en traçant la courbe % CR en fonction de la concentration ou bien en utilisant la formule de la droite % CR en fonction de la [C], $y = a [C] + b$, où **a** est la pente de cette droite. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.5 et illustrés dans la figure III.48.

Tableau III. 5 : Les valeurs des IC50 % des composés 4a-n et de l'acide ascorbique

| Produit | IC 50 % (mol/l) | IC 50 % (mg/ml) |
|---------|-------------------------|-----------------|
| 4a | $4,2 \times 10^{-3}$ | 2,0937 |
| 4b | $2,7 \times 10^{-3}$ | 1,4623 |
| 4c | $4,2 \times 10^{-3}$ | 2,2385 |
| 4d | $3,9 \times 10^{-3}$ | 2,0067 |
| 4 e | $2,9 \times 10^{-3}$ | 1,4921 |
| 4f | $< 3.13 \times 10^{-3}$ | < 1.6605 |
| 4g | $4,2 \times 10^{-3}$ | 2,2828 |
| 4h | $4,6 \times 10^{-3}$ | 2,3672 |
| 4i | $2,1 \times 10^{-3}$ | 1,1711 |
| 4j | $3,6 \times 10^{-3}$ | 1,9765 |
| 4k | $2,1 \times 10^{-3}$ | 1,1142 |
| 4l | $3,8 \times 10^{-3}$ | 2,0162 |
| 4m | $< 3.13 \times 10^{-3}$ | < 1.7108 |
| 4n | $2,3 \times 10^{-3}$ | 1,2871 |
| AA | $< 3,4 \times 10^{-3}$ | $< 0,5988$ |

Le pourcentage d'inhibition des deux produits 4m et 4f pour la concentration la plus faible dépasse les 50 % (80 %, 70 % respectivement, cela est dû à la présence des deux groupes hydroxyles sur le noyau aromatique en position 4 de la dihydropyrimidinone et de la DHPM-thione en plus de ceux provenant de la molécule curcumine.

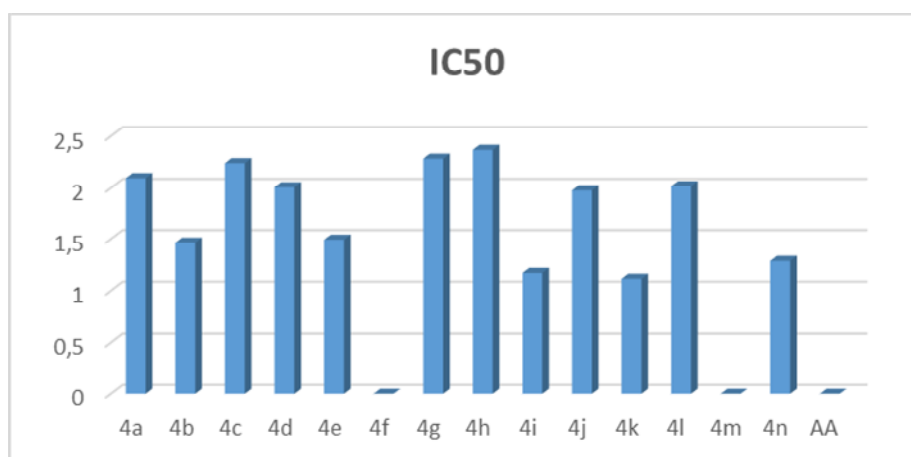


Figure III.48 : Valeur d'IC50 des composés 4a-n et de l'acide ascorbique (AA)

IX. Activité antibactérienne

La lecture des antibiogrammes se fait en mesurant les diamètres des halos d'inhibition autour des disques à l'aide d'un pied à coulisse. La sensibilité aux différents produits est classée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit :

- Non sensible (-) pour le diamètre moins de 8mm [11].
- Sensible (+) pour un diamètre entre 9 à 14 mm [11].
- Très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15 à 19 mm [11].
- Extrêmement sensible (+ + +) pour un diamètre supérieur à 20 mm [11].

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau III.6, les figures III. 49 – 3. 51

Tableau 3.6 : Diamètre des zones d'inhibition en mm

| | | Diamètre des zones d'inhibition en mm | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----------------------|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------------|
| CP | Souches bactériennes | 4a | 4b | 4c | 4d | 4e | 4f | 4g | 4h | 4i | 4j | 4k | 4l | 4m | 4n | ATB |
| | S.aureus | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | Rif 5 20 +++ |
| | E.Coli | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | Cot 25 25 +++ |
| | Pseudomonas | 12 | 12 | 12 | 13 | 10 | 11 | 6 | 11 | 11 | 14 | 13 | 11 | 13 | 6 | CL 25 30 +++ |
| | | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | |

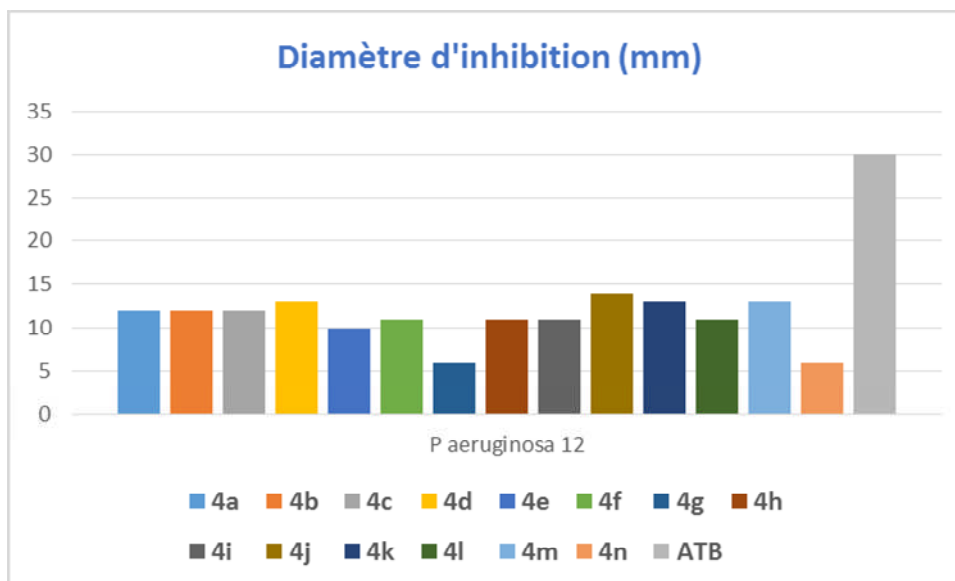


Figure III.49 : Diamètre des zones d'inhibition des composés 4a-n

D'après les résultats de l'étude *in vitro* obtenus, les souches bactériennes se comportent différemment vis-à-vis des produits testés. En effet, les bactéries *Escherichia Coli* et *s. Aureus* se sont révélées résistantes. Par contre la bactérie *Pseudomonas Aeruginosase* s'est avéré être sensible à la majorité des produits testés mis à part deux produits 4g et 4n auxquels elle s'est montrée résistante.

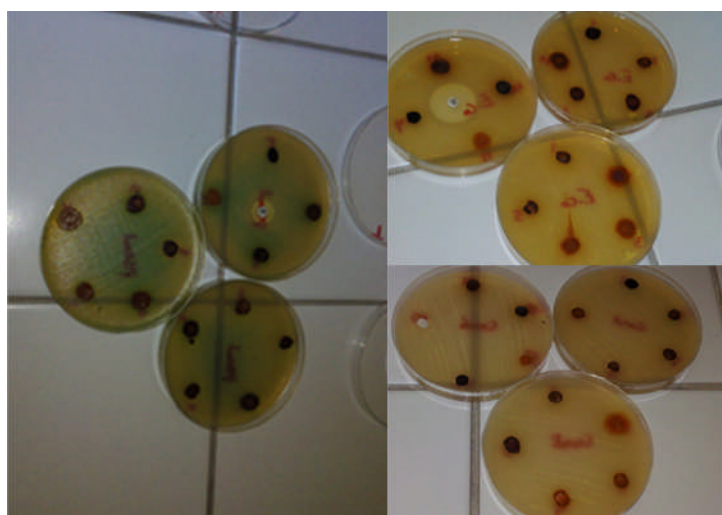


Figure III. 50 : Diamètre de zones d'inhibition des composés 4a-n réalisé au laboratoire

IX.1. Résultats de la concentration minimale inhibitrice

Nous avons déterminé les valeurs de CMI des produits **4b**, **4j**, **4l**, **4k** pour les trois souches bactériennes, par la méthode de dilution en milieu liquide, la lecture s'effectue à l'œil nu et les résultats sont rapportés dans le tableau III.7 suivant

Tableau III.7 : Résultats de la concentration minimale inhibitrice

| Souches bactériennes | 4b | 4j | 4l | 4k |
|---------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| <i>Pseudomonas Aeruginosase</i> | C ₁ | C ₂ | C ₂ | C ₂ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | > C ₀ | >C ₀ | >C ₀ | >C ₀ |
| <i>Escherichia coli</i> | >C ₀ | > C ₀ | >C ₀ | >C ₀ |

Les deux bactéries *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ne possèdent aucune concentration minimale inhibitrice.

4b : C₀ = 9,46 × 10⁻³ M, C₁ = 4,73 × 10⁻³ M, C₂ = 2,37 × 10⁻³ M, C₃ = 1.19 × 10⁻³ M

4j : C₀ = 9,32 × 10⁻³ M, C₁ = 4,66 × 10⁻³ M, C₂ = 2,33 × 10⁻³ M, C₃ = 1.17 × 10⁻³ M

4k : C₀ = 9,66 × 10⁻³ M, C₁ = 4,83 × 10⁻³ M, C₂ = 2,42 × 10⁻³ M, C₃ = 1,21 × 10⁻³ M

4l : C₀ = 9,66 × 10⁻³ M, C₁ = 4,83 × 10⁻³ M, C₂ = 2,42 × 10⁻³ M, C₃ = 1,21 × 10⁻³ M

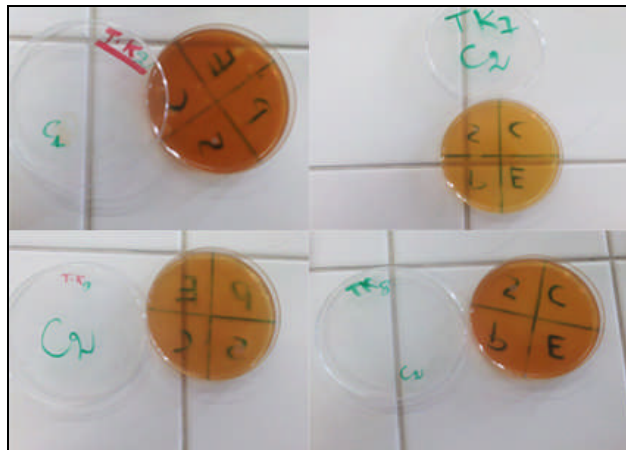


Figure III. 51 : Résultats de la concentration minimale inhibitrice

X. Activité antifongique

D'après les résultats de l'étude in- vitro, les deux levures (*Candida albicans*, *Rhodotorula*) choisies se sont avérées résistantes vis –à-vis de toute la série de produits testés (figure III.52).



Figure III. 52 : Résultats de l'activité antifongique

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] Elcin E. O., Sevim R., Fatma K., Nathaly S. and Anatholy S. D. : 1,3,4-Thiadiazole derivatives, Synthesis, structure elucidation, and Structure-Antituberculosis activity relationship investigation; *J. Med. Chem.* 47,2004, 6760-6767.
- [2] Wang Y.J., Pan M.H, Cheng A.L: Stability of Curcumin in buffer solution and characterization of its degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.*15, 1997, 1867-1876.
- [3] Jovanovic S.V., Steenken S, Boone C.W: H-Atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of Curcumin; *J. Am. Chem. Soc.*121, 1999, 9677-9681.
- [4] Lal J., Gupta S.K., Thavaselvam D. and Agarwal D.D.: Design, synthesis, synergistic antimicrobial activity and cytotoxicity of 4-aryl substituted 3,4-dihydropyrimidinones of Curcumin. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22, 2012, 2872-2876.
- [5] JAGGI. L., GUPTA. S. K., THAVASELVAM. D., AGARWAL. D.D. Design synthesis, synergistic antimicrobial activity and cytotoxicity of 4-aryl substituted 3,4-dihydropyrimidinones of curcumin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry letters*, 22, 2012, 2872-2876.
- [6] RAMDAYAL. S., SURENDER. S.J., SABINA.Y., SANDEEP.B., HABIBULLAH. K., MOHAMED. J. A. Simple, efficient, and improved synthesis of Biginelli-type compounds of curcumin as anticancer agents. *Med Chem Res*, 24, 2015, 636-644.
- [7] CHOI. Y. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis form several regions of korea. *J. Dent. Hyg. Sci*, 39, 2016,756.
- [8] Lin, L.; Shi, Q.; Su, C. Y.; Shih, C. C.; Lee, K. H. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 2006, 2527.
- [9] Park, B. S.; Kim, J. G.; Kim, M. R.; Lee, S. E.; Takeoka, G. R.; Oh, K. B.; Kim, J. H. J. *Agric. Food Chem.* 53,2005, 9005.
- [10] SILVERSTEIN. R.M., CLAYTON BASSLER. G., MORRILL.T.C. Spectrometric identification of organic compounds. Fifth edition. JOHN WILEY & SONS, INC.1991.
- [11] AVRIL. J. L., DABERNAT. H., DENIS. F., MONTEIL. H. *Bactériologie clinique*. 2^{ème} édition. Mars 1992.9.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans le cadre de ce mémoire nous avons pu synthétiser des molécules 3,4-dihydropyrimidin (2H)-1-ones/thiones à partir de la curcumine par deux techniques ; reflux conventionnel de l'éthanol (minimum de solvant) en présence d'un acide fort et sous irradiations micro-ondes avec de bon rendements. Les produits obtenus sous forme de poudres simples ou cristallines ont été sujets d'études spectroscopiques UV-Visible et IR afin d'être caractérisés.

L'étude par spectrophotométrie UV-Visible a permis de confirmer l'obtention du produit et l'absence d'impuretés et de déterminer le type de liaison.

La spectroscopie IR permet quant à elle d'identifier les groupements fonctionnels présents dans les produits et le mode de vibration des liaisons chimiques ; en effet chaque bande est associée à une liaison simple ou multiple entre deux atomes. Les principales bandes des produits révélées par les spectres sont celles des groupements O-H, N-H et C=O Aryl.

L'activité antioxydante des composés 4a-n a été évaluée par la méthode de DPPH[•]. Cette dernière a montré que tous les composés possèdent une activité antioxydante et que certains d'entre eux notamment les produits 4f, 4i-j, 4l-n sont plus antioxydant que la curcumine. Cependant le composé 4m montre l'activité antioxydante la plus grande. Cela est dû à la présence de deux groupement OH en position méta et para du noyau aromatique.

L'activité antibactérienne vis-à-vis de germes pathologiques pour l'homme, a été évaluée *in vitro* pour les quatorze produits et comparée à celle des antibiotiques. Elle a été déterminée sur trois souches bactériennes par la méthode de diffusion de disques. Les produits 4a-f, 4h-m ont révélés une activité antibactérienne vis-à-vis de *Pseudomonas Aeruginosase*. Entre temps les deux autres souches se sont révélées résistantes vis-à-vis de tous les composés testés. La CMI a été évalué par la méthode de dilutions en milieu solide pour quatre produits 4b, 4j-l parmi ceux qui ont exhibé une activité antibactérienne.

Concernant l'activité antifongique elle a été déterminée par la méthode de diffusion de disque sur deux souches de levure qui se sont révélées résistantes à l'égard de tous les produits testés.

Perspectives

Afin d'approfondir les aspects entrevus dans ce travail, un certains nombres de perspectives peuvent être envisagés :

- Mener une étude plus approfondie avec d'autres techniques d'analyse spectroscopiques notamment la résonance magnétique nucléaire (RMN) de ^1H et ^{13}C , la spectroscopie de masse et l'analyse élémentaire.
- Elargir la gamme de souches bactériennes et la gamme de levures testées.
- Identification des composés responsable de l'activité antibactérienne et l'élaboration de la relation structure activité.
- Etude de nouvelles activités biologiques des 3,4-dihydropyrimidin (*1H*)- 2- ones / thiones synthétisés plus précisément l'activité anti-inflammatoire et anti-cancéreuse.

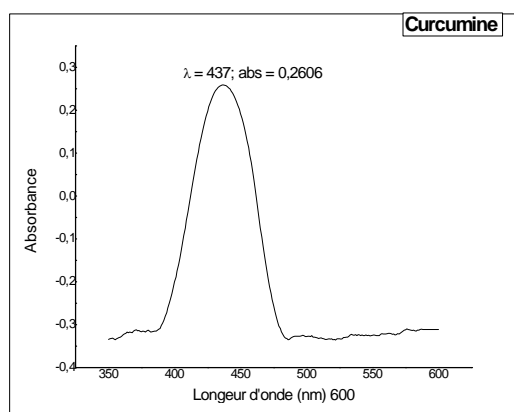


Figure 3.2 : Spectre UV-Visible de la curcumine dans du DMSO

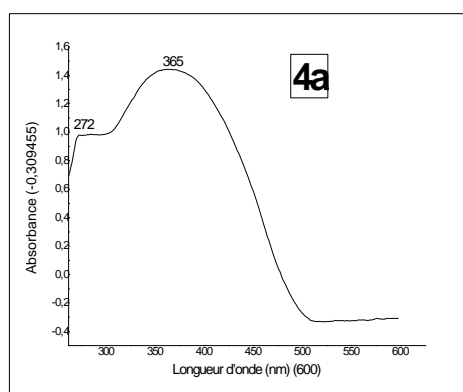


Figure 3.3 : Spectre UV-Visible du composé 4a dans le DMSO

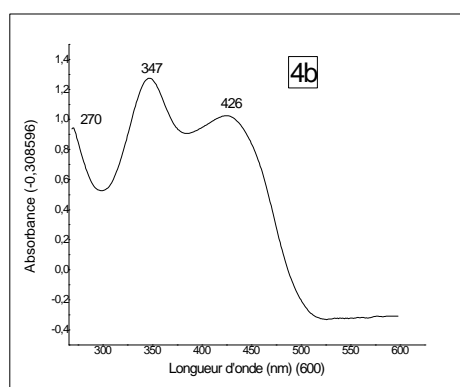


Figure 3.4 : Spectre UV-Visible du composé 4b dans le DMSO

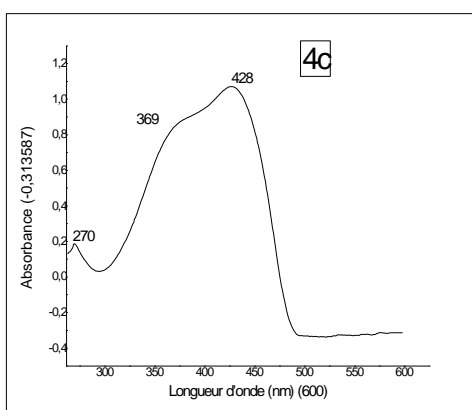


Figure 3.5 : Spectre UV-Visible du composé 4c dans le DMSO

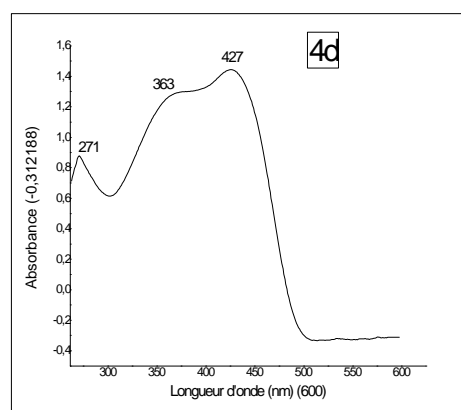


Figure 3.6 : Spectre UV-Visible du composé 4d dans le DMSO

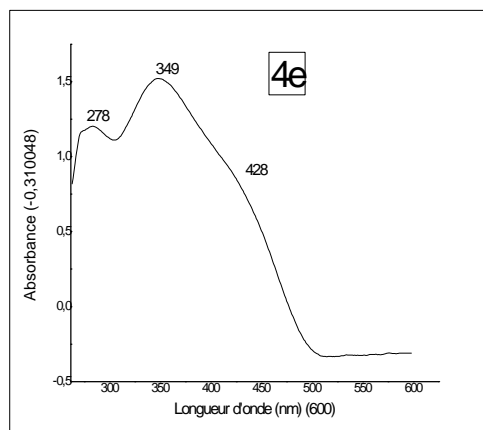


Figure 3.7 : Spectre UV-Visible du composé 4e dans le DMSO

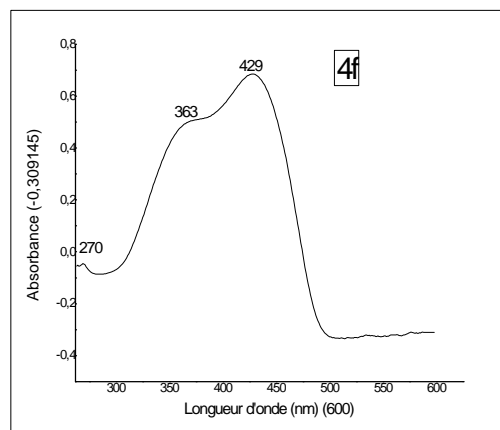


Figure 3.8 : Spectre UV-Visible du composé 4f dans le DMSO

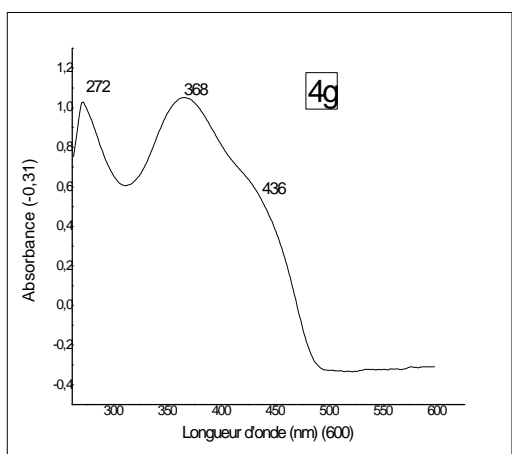


Figure 3.9 : Spectre UV-Visible du composé 4g dans le DMSO

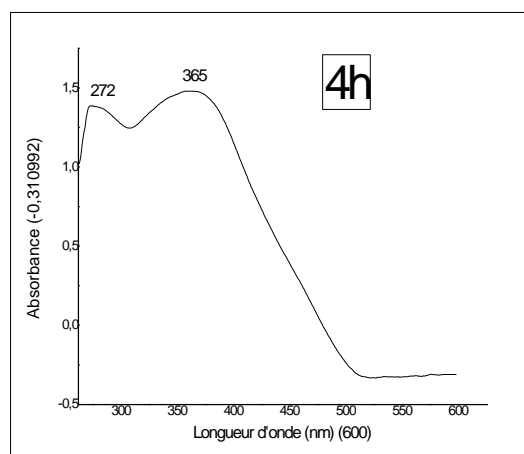


Figure 3.10 : Spectre UV-Visible du composé 4h dans le DMSO

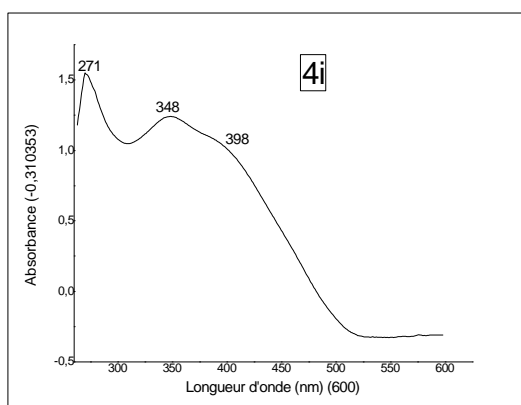


Figure 3.11 : Spectre UV-Visible du composé 4i dans le DMSO

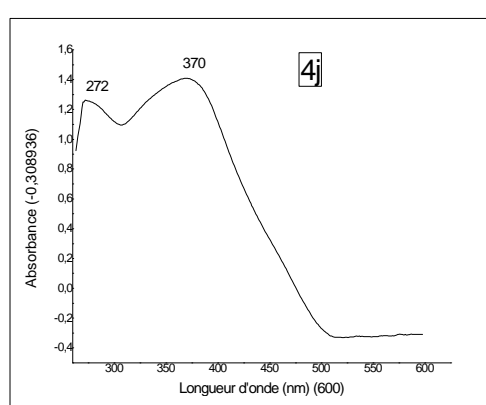


Figure 3.12 : Spectre UV-Visible du composé 4j dans le DMSO

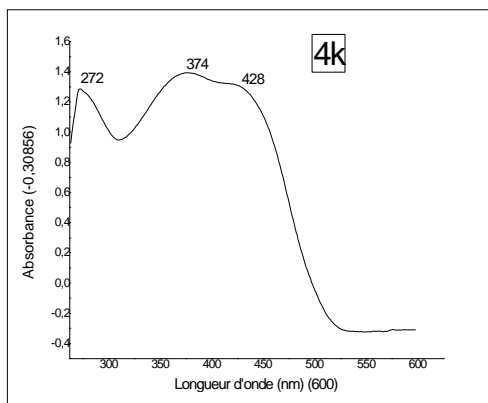


Figure 3.13 : Spectre UV-Visible du composé 4k dans le DMSO

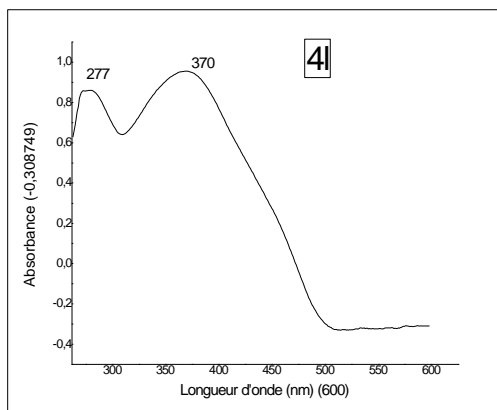


Figure 3.14 : Spectre UV-Visible du composé 4l dans le DMSO

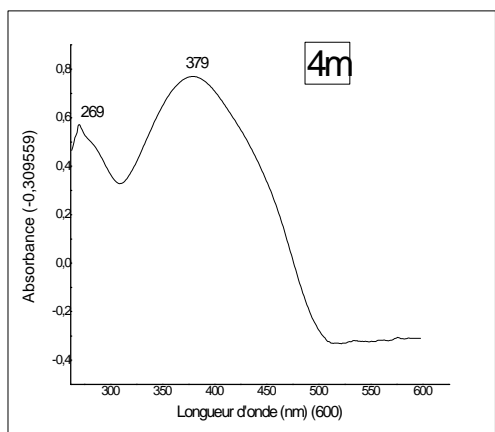


Figure 3.15 : Spectre UV-Visible du composé 4m dans le DMSO

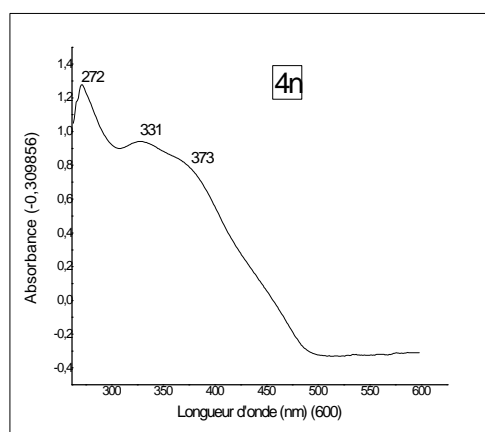


Figure 3.16 : Spectre UV-Visible du composé 4n dans le DMSO

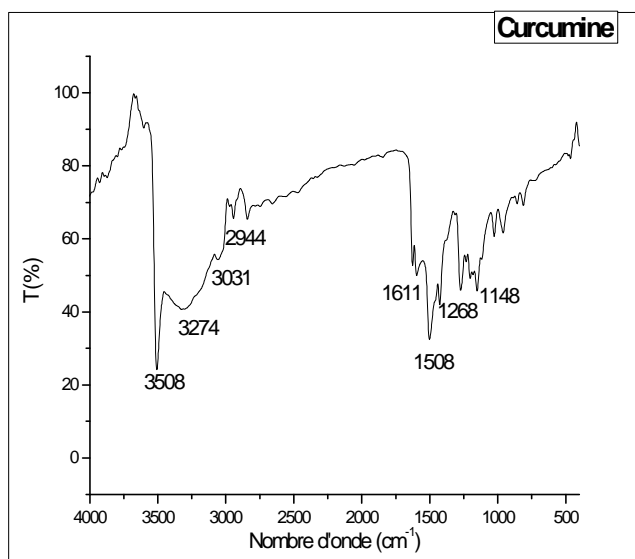


Figure 3.17 : Spectre IR de la curcumine

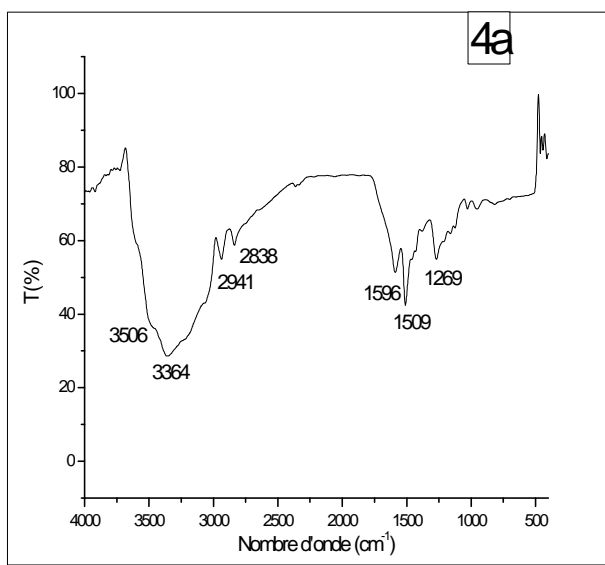


Figure 3.18 : Spectre IR du composé 4 a

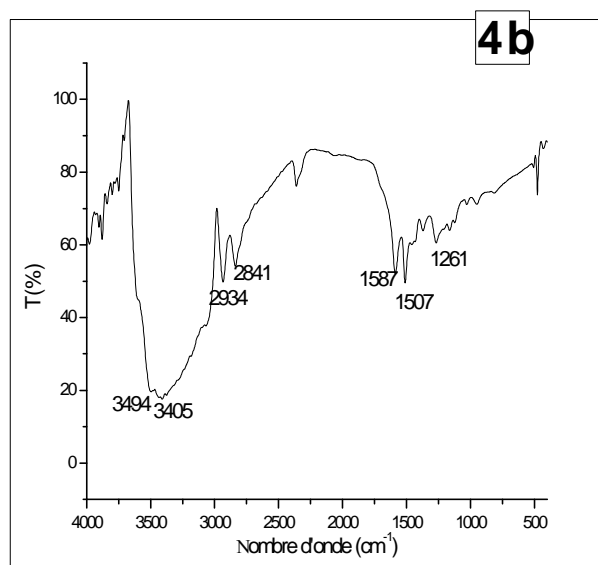


Figure 3.19 : Spectre IR du composé 4 b

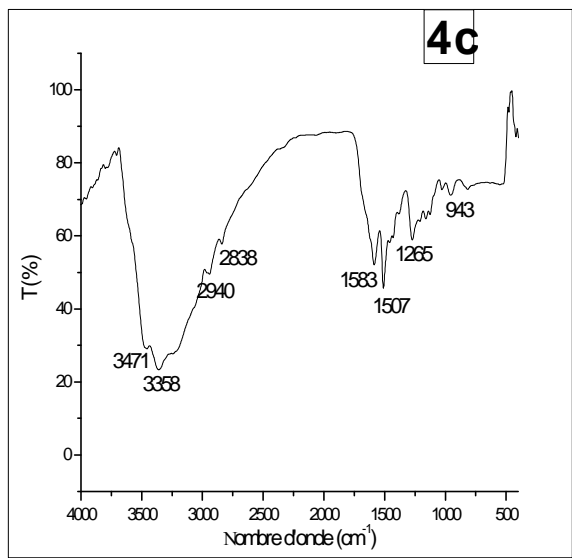


Figure 3.20 : Spectre IR du composé 4c

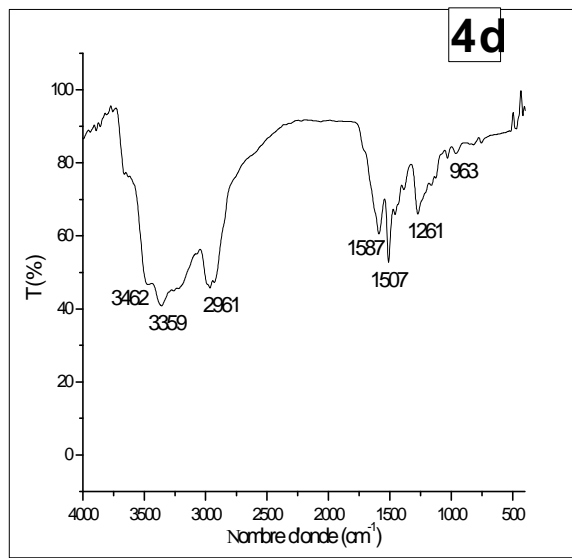


Figure 3.21 : Spectre IR du composé 4 d

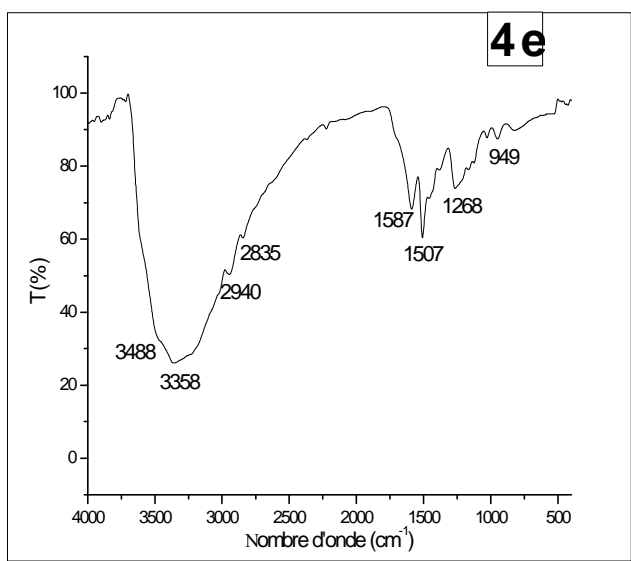


Figure 3.22 : Spectre IR du composé 4 e

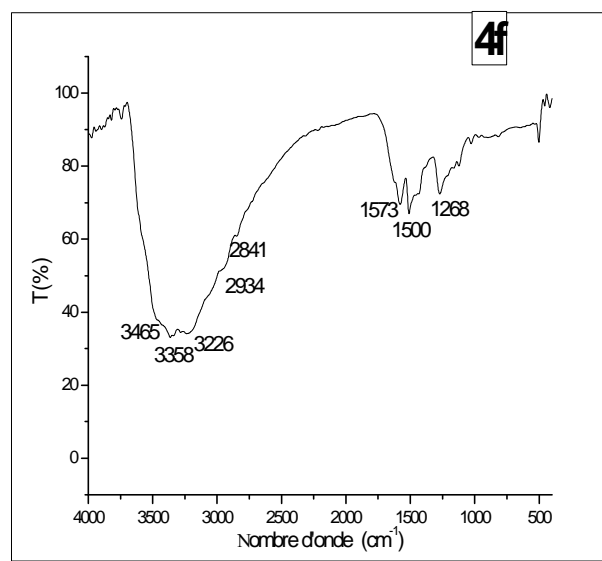


Figure 3.23 : Spectre IR du composé 4 f

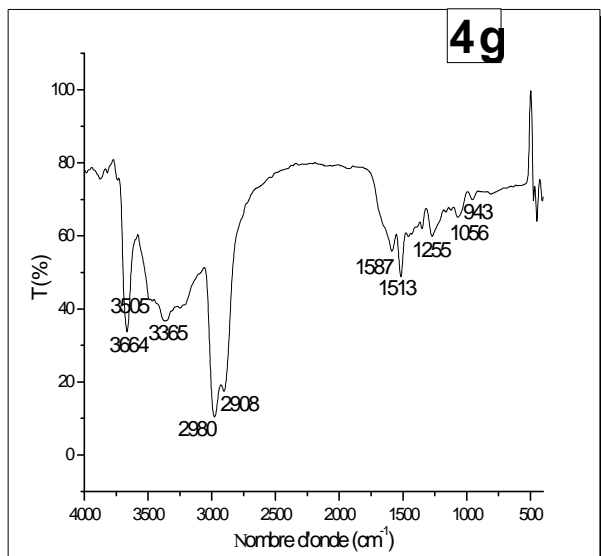


Figure 3.24 : Spectre IR du composé 4 g

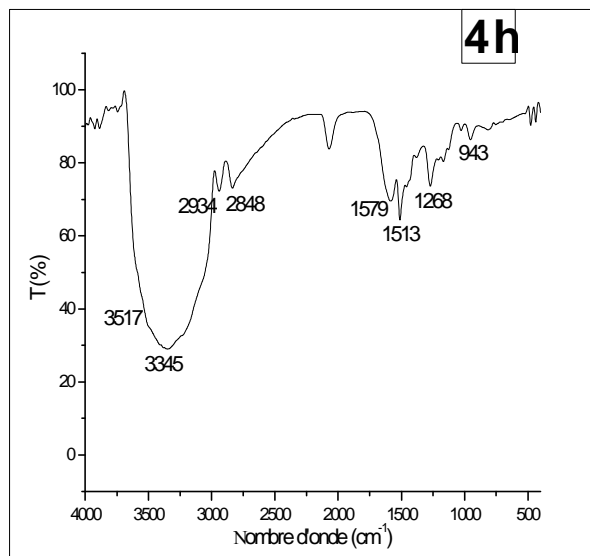


Figure 3.25 : Spectre IR du composé 4 h

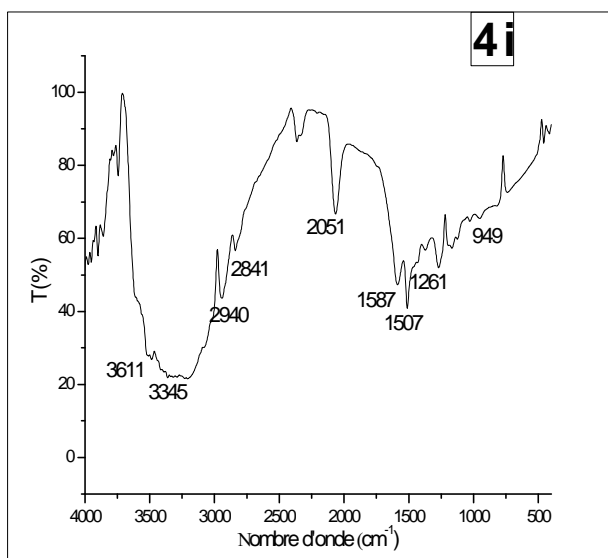


Figure 3.26 : Spectre IR du composé 4i

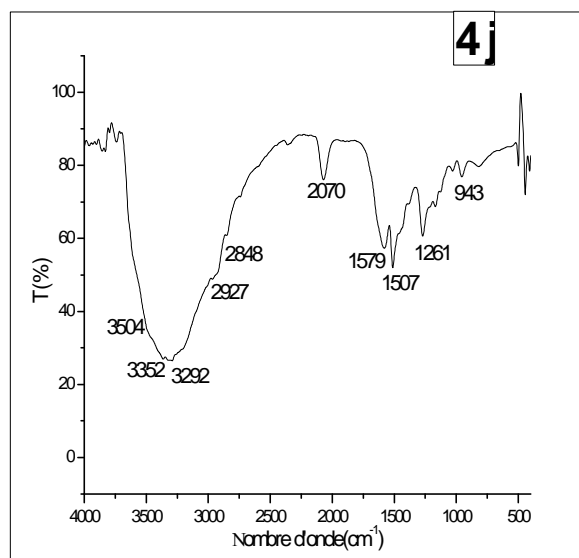


Figure 3.27 : Spectre IR du composé 4 j

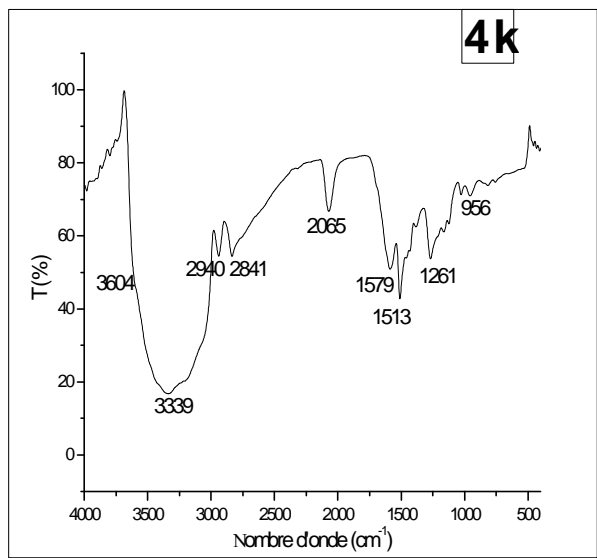


Figure 3.28 : Spectre IR du composé 4k

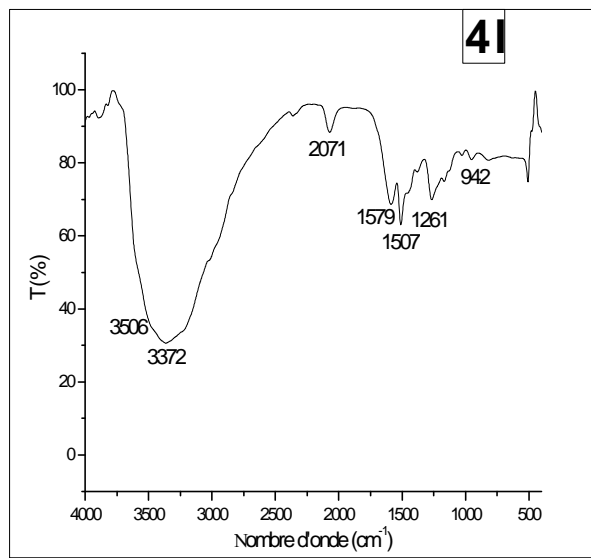


Figure 3.29 : Spectre IR du composé 4l

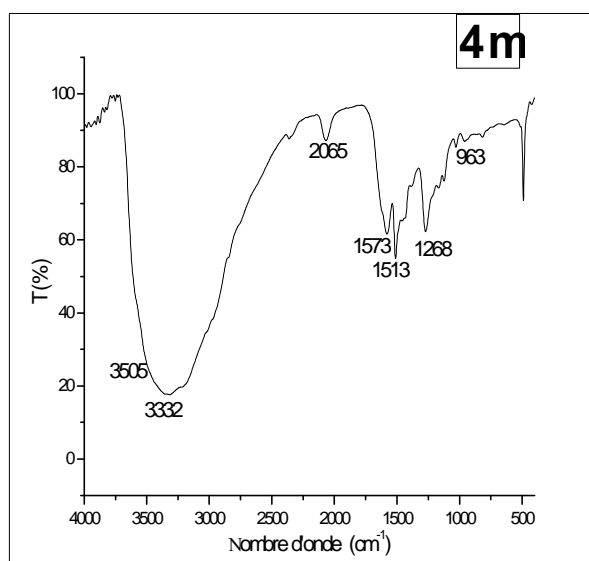


Figure 3.30 : Spectre IR du composé 4m

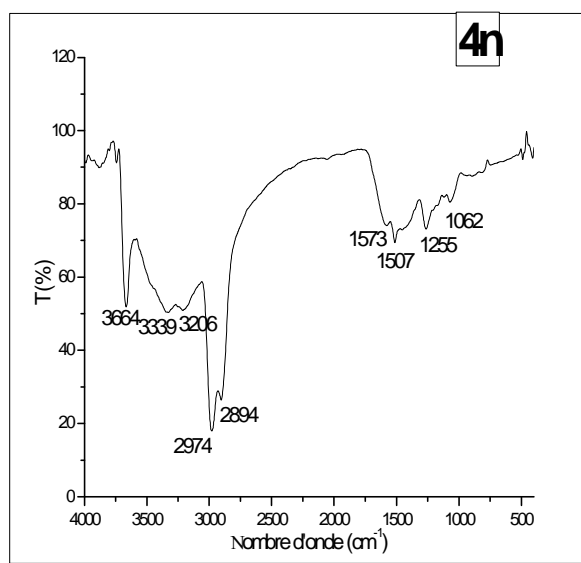


Figure 3.31 : Spectre IR du composé 4n

ANNEXES

Résumé

Ce mémoire porte sur la synthèse de molécules hétérocycliques 3,4-dihydropyrimidin (1*H*)-2-ones / thiones par la réaction de Biginelli en substituant l'acétoacétate d'éthyle par la curcumine et en faisant varier l'aldéhyde aromatique en présence d'urée/thiourée sous catalyse d'un HPA ($H_3PMo_{12}O_{40}$) et dans un minimum de solvant par reflux conventionnel et sous irradiations micro-ondes. Ces composés sont caractérisés par les techniques spectroscopiques UV-Visible et IR. L'évaluation de leurs activités biologiques ; antioxydante et antimicrobienne a été discutée.

Mots clés : Curcumine, UV-Visible, IR, 3,4-dihydropyrimidin (1*H*)-2-ones / thiones, activité antioxydante, activité antimicrobienne, réaction de Biginelli.

Abstract

This work concerns the synthesis of 3,4-dihydropyrimidin (1*H*)-2-ones / thiones heterocyclic molecules by Biginelli reaction by substituting ethyl acetoacetate with curcumin and varying aromatic aldehyde in the presence of urea/thiourea under HPA ($H_3PMo_{12}O_{40}$) catalysis with minimum solvent using conventional reflux and under microwave irradiations. These products are characterized by technical spectroscopic UV-Visible, IR. Evaluation of their biological activities ; antioxidant and antimicrobial was also discussed.

Keywords: Curcumin, UV-Visible, IR, 3,4-dihydropyrimidine (1*H*)-2-ones/thiones, antioxidant activity, antimicrobial activity, Biginelli reaction.