

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOUD 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 et activités biologiques de quelques molécules
hétérocycliques**

Présenté par : *M^{elle} IMMOUNE LILA et M^{elle} ZEBICHE NOUARA*

Soutenu publiquement, le 14 / 07 / 2016, devant le Jury composé de :

<i>M^{me} D.MEZIANE</i>	<i>MAITRE DE CONFERENCES A</i>	<i>UMMTO</i>	<i>PRESIDENTE</i>
<i>M^{me} M.CHEBLI</i>	<i>MAITRE DE CONFERENCES A</i>	<i>UMMTO</i>	<i>PROMOTRICE</i>
<i>EPOUSE MAKHLOUFI</i>			
<i>M^{elle} S.DERMECHE</i>	<i>MAITRE ASSISTANTE A</i>	<i>UMMTO</i>	<i>CO-PROMOTRICE</i>
<i>M^{me} D. OUKACHA</i>	<i>MAITRE DE CONFERENCES B</i>	<i>UMMTO</i>	<i>EXAMINATRICE</i>
<i>EPOUSE HIKEM</i>			
<i>M^{me} K. IGHILAHRIZ</i>	<i>MAITRE ASSISTANTE A</i>	<i>UMMTO</i>	<i>EXAMINATRICE</i>

Remerciements :

Nous tenons à remercier d'abord Dieu le tous puissant et miséricordieux, de nous avoir donné la force, la patience et le courage nécessaire pour mener ce travail à terme.

Ce mémoire n'aurait pu voir le jour sans la participation de nombreuses personnes, nous allons nous essayer à trouver les mots justes pour exprimer spécifiquement nos reconnaissances à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

A notre promotrice de mémoire, Madame **CHEBLI épouse MAKHLOUFI Malika**, Maître de Conférences classe A à l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou. Vous nous avez initiés à la recherche. Votre orientation nous a été très bénéfique pour la réalisation de ce travail, Votre rigueur et façon de travailler, nous a permis d'être plus attentives et critiques vis-à-vis de notre travail. Merci pour votre patience dans la correction de ce mémoire. On espère avoir été à la hauteur de votre attente. Nous avons eu le privilège de travailler avec vous et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

A notre co-promotrice, Mademoiselle, DERMECHE Samia, Maître assistante Classe A et chercheur dans le laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, Département de Biochimie-Microbiologie à l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, nous vous remercions pour les discussions enrichissantes dans le domaine de la biologie comme vous trouvez ici toute notre gratitude pour nous avoir fournis les souches bactériennes et merci aussi, pour votre écoute et votre gentillesse.

Nous remercions vivement Madame **D. MEZIANE**, Maître de Conférences classe A à l'Université de Tizi-Ouzou, qui nous fait le grand honneur de présider le jury de soutenance. Nous tenons à remercier Madame **OUKACHA épouse HIKEM Djamila**, Maître de Conférences classe B à l'Université de Tizi-Ouzou, et Madame **IGHILAHRIZ Karima**, Maître Assistante classe A à l'Université de Tizi-Ouzou qui ont accepté de juger ce travail.

Nos remerciements vont aussi À :

Madame, Fouzia et Hassina techniciennes du laboratoire de chimie organique, pour leurs aide et leurs soutient au cours de la préparation de notre mémoire.

Madame, Beggaz Dahbia technicienne du laboratoire de chimie pharmaceutique, Merci pour votre gentillesse et votre aide dans la réalisation des de points de fusion.

Monsieur, ADKHIS Ahmed pour votre gentillesse et votre aide dans la réalisation des analyses I.R et UV/VISIBLE.

M^{elle}, SAHER Liza pour son aide dans la réalisation et l'interprétation des tests biologiques.

Sans vous le travail ne sera pas fini.

Pour finir, Nous adressons tous nos remerciements à nos familles à tous nos amis et camarades chimistes. Merci pour votre encouragement et votre soutien moral.

Dédicaces

A ceux qui nous ont tout donné sans rien en retour

A nos chers parents, pour leur amour et leurs encouragements

A nos familles

A ceux qui nous ont encouragées et soutenues dans nos

moments les plus difficiles

Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de nos

profondes reconnaissances pour tout ce que vous avez fait

pour nous.

Abréviations utilisées

AA : Acide ascorbique

Abs: Absorption.

ABTS: 2, 2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate.

A-CN: Acétonitrile

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AN: Acide Nalidixique

ARN : Acide ribonucléique.

ARN_m : Acide ribonucléique messenger.

ARN_t : Acide ribonucléique transporteur.

ATCC: American Type Culture Collection.

Aug: Augmentin

B.c: *Bacillus cereus*.

c.à.d : C'est-à-dire.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

Conv : Conventionnel.

DBU : 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène.

DMSO : Diméthyle sulfoxyde.

DO : Densité Optique.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

EC50 : La concentration efficace médiane.

E.c: *Escherichia coli*

ERO: Espèces réactives de l'oxygène.

FOX: Cefoxitine.

FRAP: Ferric reducing ability of plasma.

Glu: Glucose.

k.p: *klebsiella pneumoniae*.

IR : Infra-Rouge.

m/z : masse/charge

mm : millimètre.

mn : minute.

M .O: Micro-Ondes.

NOE : effet Overhauser nucléaire

nm : nanomètre.

Pf : Point de fusion.

Rdt : Rendement.

Rf : Rapport frontale.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

S.au : Staphylococcus aureus.

THF : Tétrahydrofurane.

µl : micro litre.

UV/vis : Ultraviolet-visible.

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.

W : Watt.

Liste des tableaux

Chapitre I	Page
------------	------

Tableau I.1 : Les génines	4
---------------------------------	---

Tableau I.2 : Les hétérosides	4
-------------------------------------	---

Tableau I.3 : Quelques coumarines complexes	5
---	---

Chapitre II

Tableau II.1 : Rendements des composés 3a et 3b obtenus dans les différents solvants et par les deux voies de chauffage.....	16
--	----

Tableau II.2: Résultats des spectres IR enregistrés	18
---	----

Tableau II.3 : Rendements du composé 4a obtenu dans les différents solvants et par les deux voies de chauffage	19
--	----

Chapitre III

Tableau III.1 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des produits 3a, 4a, 5 et 6 ainsi que les antibiotiques de référence Augmentin, acide Nalidixique et Cefoxitine	42
--	----

Tableau III.2 : Résultats des CMI du composé 3a	45
---	----

Tableau III.3: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du produit 5 et de l'acide ascorbique.....	48
--	----

Tableau III.4: Valeur d'IC50% du composé 5 et de l'acide ascorbique	49
---	----

Liste des figures

Chapitre I	page
Figure I.1 : Structure générale de la coumarine.....	3
Figure I.2 : structure générale des coumarines.....	4
Figure I.2: Esters de l'acide coumarine-3-carboxylique.....	11
 Chapitre III	
Figure III.1 : Structure de la vitamine E.....	36
Figure III.2 : Structure de la vitamine C.....	36
Figure III.3 : Quelques coumarines simples ou fusionnées, à activité antioxydante.....	38
Figure III.4 : Développement des souches bactérienne dans les boites de pétri après incubation pendant 24.....	40
Figure III.5 : Structure des produits testés.....	41
Figure III.6 : Effet des produits testés sur les souches bactériennes.....	43
Figure III.7: Diamètres des zones d'inhibition des produits ainsi que les antibiotiques de référence Augmentin, acide Nalidixique et Cefoxitine.....	44
Figure III.8: Densité Optique en fonction de la Concentration.....	47
Figure III.9: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de l'acide ascorbique et du produit 5.....	48
Figure III.10 : Valeur d'IC50% du composé 5 et de l'acide ascorbique.....	49

Liste des schémas

Chapitre I	Page
Schéma I.1 : La réaction de Perkin.....	9
Schéma I.2 : La réaction de Pechmann	10
Schéma I.3 : Mécanisme réactionnel de la condensation de Knoevenagel	10
Schéma I.4 : La méthode de Jones et al	11
Schéma I.5 : La méthode d'Ogawa et al.....	11
Schéma I.6 : La méthode de Jung et al	12
Chapitre II	
Schéma II.1 : Action du salicylaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine	15
Schéma II.2 : Action de 2-hydroxynaphtaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine	18
Schéma II.3 : Synthèse de dérivés chromeno[3,2-c]chromen-2,3-diones <u>5</u> et <u>6</u>	22
Schéma II.4 : Synthèse de 5-iodosalicylaldéhyde	24
Schéma II.5 : Action de 5-iodosalicylaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine	25

Sommaire

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

Chapitre I : Coumarine et applications

I. Les Composés Hétérocycliques	3
II. Les coumarines	3
II.1. Définition.....	3
II.2. Diversité structurale des coumarines	4
II.2.1. Coumarines Simples	4
II.2.1.a. Les génines	4
II.2.1.b. Les hétérosides	4
II.2.2. Les coumarines complexes	5
III. Analyse structurale des coumarines	6
III.1. Fluorescence sous la lumière U.V	6
III.2. Spectroscopie infrarouge IR.....	6
III.3. Spectroscopie ultraviolette UV	6
III.4. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN	6
III.5. La spectrométrie de masse des coumarines.....	7
IV. Propriétés physico-chimiques	7
V. Propriétés pharmacologiques des coumarines.....	7
VI. Activités biologiques et intérêts des coumarines	8
VII. Toxicité des coumarines	9
VIII- Synthèse des coumarines	9
VIII.1. La réaction de Perkin.....	9
VIII.2. La réaction de Pechmann	9
VIII.3. La réaction de Knoevenagel	10
VIII-4. Différentes méthodes de synthèse de la 4-hydroxycoumarine.....	11

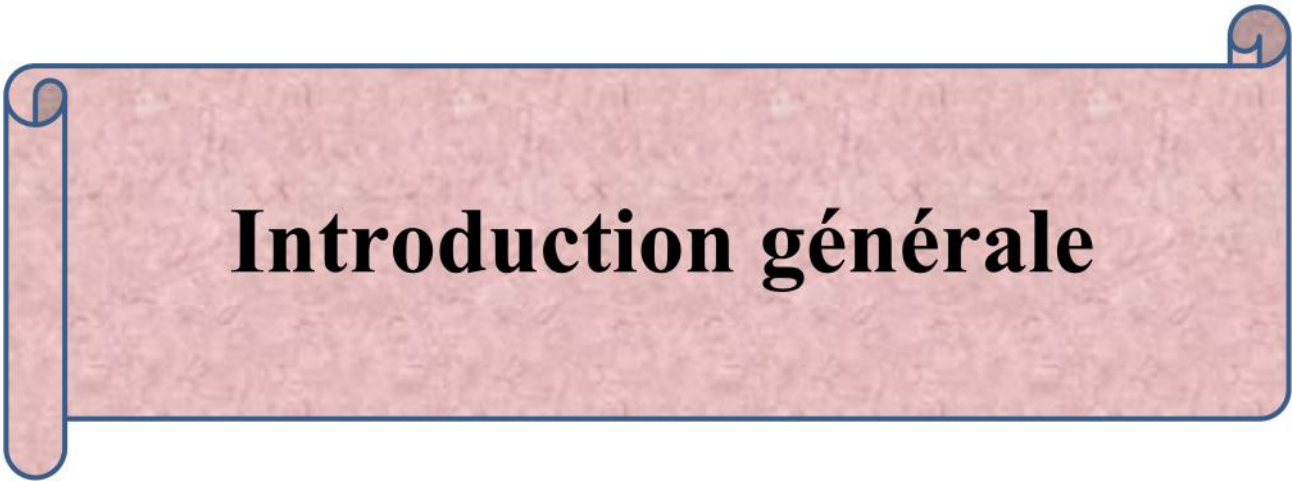
Chapitre II : Synthèse des coumarines

I. Action du salicylaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine	14
I.1. Analyse par chromatographie sur couche mince	16
I.2. Analyse par Spectroscopie UV/VIS.....	17
I.3. Analyse par Spectroscopie IR.....	17
II. Action de 2-hydroxynaphtaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine	18
II.1. Analyse par Chromatographie sur couche mince (CCM).....	19
II.2. Analyse par Spectroscopie UV/VIS	19
II.3. Analyse par Spectroscopie IR.....	19
III. Mécanisme de la réaction.....	20
IV. Synthèse de dérivés chroméno[3,2-c]chromèn-2,3-diones <u>5</u> et <u>6</u>	21
IV.1. Analyse Spectroscopie par UV/VIS.....	22
IV.2. Analyse Spectroscopie IR	22
IV.3. Analyse par spectrométrie de masse LC-MS (ESI+).....	22
IV.4. Mécanisme de la réaction.....	23
V. Action de 5-iodosalicylaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine.....	24
V.1. Synthèse de 5-iodosalicylaldéhyde	24
V.2. Analyse par spectroscopie UV/VIS	24
V.3. Analyse par spectroscopie I.R	24
V.4. Action de 5-iodosalicylaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine.....	25

V.4.1. Analyse par Chromatographie sur couche mince (CCM)	25
V.4.2. Analyse par Spectroscopie UV/VIS	25
V.4.3. Analyse par Spectroscopie IR	26
VI. Conclusion	26
Partie expérimental.....	27

Chapitre III : Activité biologique des coumarines

I. Activité antibactérienne	32
I.1.Définition de l'activité antibactérienne	32
I.2.Propriétés antimicrobiennes importantes	32
I.3.Activité antibactérienne des coumarines	33
I.4.Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne	33
I.4.a. Méthode de disques.....	33
Réalisation de l'antibiogramme	34
I.4.b. Méthode de dilutions.....	34
Détermination des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)	34
II. Activité antioxydante.....	34
II.1.Le stress oxydatif	35
II.2. Les radicaux libres.....	35
II.3.Les espèces réactives de l'oxygène	35
II.4.Les antioxydants	35
Les antioxydants endogènes.....	36
Les antioxydants naturels	36
II.5.Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	37
II.6.Activité antioxydante des coumarines	37
Partie expérimental.....	39
Conclusion générale	51
Bibliographie	53



Introduction générale

Introduction générale

Les coumarines constituent une grande classe d'hétérocycles, très répandue dans le règne végétal ou elles sont à l'origine de divers métabolites secondaires au sein de certaines plantes : *Arabidopsis thaliana*, *Salvia officinalis*, *Marila Pluricostata*... La plupart d'entre elles sont douées d'activités biologiques dues essentiellement à la présence de l'hétérocycle pyran-2-one au sein de leurs structures. Parmi ces activités on peut citer : l'activité anticoagulante, anticancéreuse, antibiotique, antibactérienne, anti-inflammatoire, analgésique, anti-HIV et photochimique, ainsi que diverses applications en agro-alimentaire, et en cosmétique.

Vu l'importance de ces dérivés, des recherches ont été effectuées afin d'élaborer des méthodes de synthèse permettant de les obtenir dans les meilleures conditions. Ces méthodes sont principalement basées sur les réactions de condensation.

Dans ce contexte, nous portons, dans notre travail, un intérêt particulier à la préparation des dérivés-coumariniques à partir de la 4-hydroxycoumarine. Les composés, ainsi synthétisés, présentent un potentiel réactionnel qu'on essaiera d'exploiter par la suite par des réactions d'iodation afin d'aboutir à de nouveaux dérivés nommés chroménylchromènes.

Le travail que nous présentons dans ce mémoire est réparti en trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique sur les dérivés de la coumarine. Un bref aperçu est donné sur les différentes classes, l'importance et les propriétés biologiques des coumarines. Nous présentons par la suite les différentes méthodes appliquées pour l'obtention des coumarines.

Dans le second chapitre, une stratégie efficace et économique est donnée pour la préparation de dérivés coumariniques, suivant la réaction de condensation type KNOENENAGEL, en utilisant la 4-hydroxycoumarine comme matière première et suivant deux modes de synthèse : chauffage conventionnel à reflux et sous irradiations des micro-ondes. Ensuite suit une réaction de cyclisation intramoléculaire pour donner les dérivés chroméno[3,2-c]chromèn-2,3-diones.

Une réaction d'iodation du salicylaldéhyde, aboutissant au composé 5-iodosalicylaldéhyde, puis sa condensation sur la 4-hydroxycoumarine a été réalisée.

Dans le troisième chapitre nous avons essayé d'évaluer l'activité biologique des différents dérivés de synthèse par l'étude de l'activité antibactérienne et antioxydante où

nous avons évalué l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé puis déterminé la CMI pour les composés qui semblent actifs et l'activité antioxydante est évaluée par la méthode de DPPH.

Enfin nous terminons ce travail par une conclusion générale récapitulative de notre travail.



Chapitre I

Coumarine et applications

Synthèse bibliographique sur les Coumarines et leurs Applications**I. Les Composés Hétérocycliques**

Un hétérocycle est une chaîne cyclique d'une molécule organique comportant un ou plusieurs atomes autres que le carbone appelé **hétéroatome**. Un composé hétérocyclique est un composé dont la molécule contient un ou plusieurs hétérocycles, éventuellement associés à des chaînes carbonées, cycliques ou acycliques.

Les hétéroatomes les plus courants sont l'oxygène, l'azote et le soufre. Il en existe d'autres, moins courants tels que le phosphore, le sélénium, l'arsenic, le bore, le bismuth, le silicium, le germanium, l'étain, le plomb, l'antimoine et le tellure. Il faut savoir que les hétérocycles les plus stables sont, comme pour les cycles carbonés, ceux qui comportent cinq ou six atomes. Mais il en existe qui n'en comportent que trois ou quatre. Nous les rencontrons surtout dans des composés naturels d'origine végétale comme les alcaloïdes [1].

II. Les coumarines**II.1. Définition**

La coumarine est une substance naturelle organique aromatique isolée de la fève tonka par Vogel en 1820. Elle fut synthétisée en 1868 par W.H. Perkin à partir de l'aldéhyde salicylique et d'un anhydride d'acide, à haute température en présence d'une base faible (CH_3COONa) [2]. Son nom vient de l'arbre sur lequel pousse la fève tonka, que l'on appelle *kumarù* en amérindien, connue dans la nomenclature internationale comme 2H-1-benzopyran-2-one qui peut être considérée en première approximation, comme une lactone de l'acide Z-2-hydroxy-cinnamique. Son odeur de foin fraîchement coupé a attiré l'attention des parfumeurs dès le XIX^e siècle.

Les coumarines existent sous plusieurs structures différentes. Elles constituent une classe importante d'agents pharmacologiques possédant une gamme de différentes activités physiologiques, elles font objet de la recherche intense dont la possibilité que cette classe de molécules pourrait être une source de médicaments pour le traitement de plusieurs maladies.

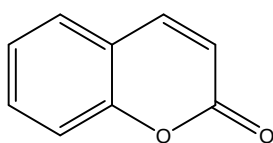


Figure I.1 : Structure générale de la coumarine

Bien que ce soit la fève tonka qui l'illustre de façon significative (1 à 3%), la coumarine est contenue dans d'autres plantes et aliments comme le mélilot, la sauge sclérée, la lavande, le miel, le thé vert, la cannelle, etc... [2]. Elle est stockée dans la plante sous la forme de glucoside de l'acide coumarinique qui se transforme en coumarine sous l'action d'enzymes ou du soleil [3]. Elles sont formées dans les feuilles et s'accumulent surtout dans les racines et les écorces, ainsi que dans les tissus âgés ou lésés [3].

II.2. Diversité structurale des coumarines

La coumarine est une famille de composés, qui se forment par une substitution sur un cycle aromatique, de ce fait et selon la nature des substitutions, on peut classer les coumarines en :

II.2.1. Coumarines simples

Les coumarines les plus répandues dans le règne végétal possèdent des Substitutions (OH ou OCH₃) en 6 et 7 [3]. Exemples :

II.2.1.a. Les génines :

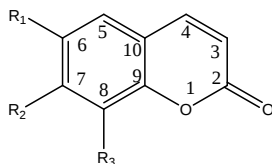


Figure I.2 : structure générale des coumarines.

Tableau I.1 : Les génines

Coumarines	R ₁	R ₂	R ₃
Ombélliférone	H	OH	H
Esculétol	OH	OH	H
Scopolétol	OCH ₃	OH	H
Herniarine	H	OCH ₃	H
Fraxétol	OCH ₃	OH	OH

II.2.1.b. Les hétérosides :

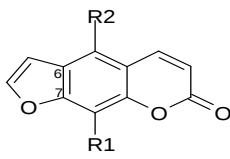
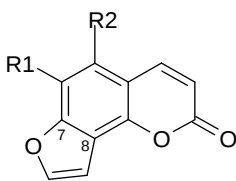
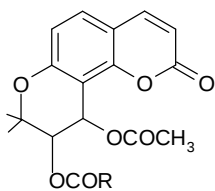
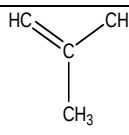
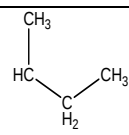
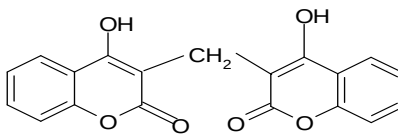
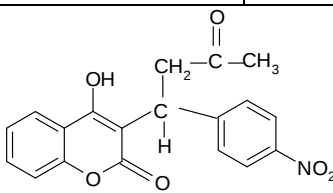
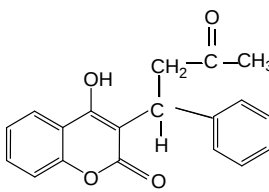
Tableau I.2 : Les hétérosides

Coumarines	R ₁	R ₂	R ₃
Esculoside (=Esculine)	O-Glu	OH	H
Cichorioside(=Cichorine)	OH	O-Glu	H
Scopoloside(=Scopoline)	OCH ₃	O-Glu	H
Fraxoside	OCH ₃	O-Glu	OH

I.2.2. Les coumarines complexes

Elles se trouvent aussi sous forme complexes, dans le tableau I.3 sont donnés quelques exemples de coumarines complexes [3].

Tableau I.3 : Quelques coumarines complexes

Coumarines	Dérivé	R ₁	R ₂	Nom
Furocoumarines ou furanocoumarines	6,7-furocoumarines (linéaires) 	H	H	Psoralène
		H	OCH ₃	Bergaptène
		OCH ₃	H	Xanthotoxine
		OCH ₂ -CH=(CH ₃) ₂	H	Impératorine
	7,8-furocoumarines (angulaires) 	H	H	Angélicine
		OCH ₃	OCH ₃	Pimpinelline
pyrannocoumarines 	R= 		Samidine	
	R= 		Visnadine	
Antivitamines K	 Le Dicoumarol  Acénocoumarol SINTROM^R  la Warfarine			

III. Analyse structurale des coumarines

III.1. Fluorescence sous la lumière U.V

Les coumarines sont caractérisées par une fluorescence à l'U.V à 366 nm [4, 5, 6, 7, 8]. Cette fluorescence est en général :

- Bleue pour les coumarines hydroxylées en 7 (Umbélliférone).
- Pourpre pour les coumarines prénylées.
- Jaune pour les furanocoumarines [7].

Cette fluorescence est intensifiée en chromatogramme par les vapeurs de NH_3 observée sous la lumière UV, par pulvérisation du chromatogramme par le réactif de Borntrager ou l'acétate de plomb [5, 6, 7].

III.2. Spectroscopie infrarouge IR

Cette technique fournit des informations sur les groupements fonctionnels d'une molécule. Pour les coumarines :

- L'absorption $\text{C}=\text{O}$ de la lactone conjuguée apparaît pratiquement dans la région ($1550\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$) [9,10].
- L'absorption OH du phénol est observée à 3550 cm^{-1} [11].

III.3. Spectroscopie ultraviolette UV

Les coumarines ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants, profondément modifié en milieu alcalin : KOH , NaOH , NaOCH_3 et en présence d' AlCl_3 .

AlCl_3 forme un complexe avec les hydroxyles portés par des carbones adjacents, ce qui induit un déplacement bathochrome [8].

Pour la coumarine, les absorptions maximales sont présentées dans deux bandes en 276 nm et 311 nm. La présence des substituants alkylés induit par des modifications des valeurs de la bande en 311nm vers 325 nm [12,13]. Selon la position de $-\text{OH}$, le déplacement est plus au moins fort [8].

III.4. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN

L'allure des spectres RMN ^1H des coumarines est caractéristique, les protons oléfiniques H-3 et H-4 apparaissent respectivement sous forme d'un doublet à : δ (ppm)

[6,10 – 6,40] et les protons aromatiques apparaissent sous forme d'un multiplet à : δ (ppm) [7,50 – 7,90] pour les coumarines simples [14-18].

III.5. La spectrométrie de masse des coumarines

Les composés hétérocycliques fortement insaturés tels que les « coumarines », et mêmes les ions qui sont formés par fragmentation α au niveau d'un groupement carbonyle, ont la propriété de pouvoir perdre un groupement CO ($M^+ - 28$). S'il y a plusieurs groupements CO dans une molécule, ils peuvent être éliminés les uns après les autres [6, 15,9].

IV. Propriétés physico-chimiques

- Les coumarines sont des solides cristallisés blancs ou jaunâtres de saveur généralement amère ; certaines sont sublimables.
- Les hétérosides sont assez solubles dans l'eau et solubles dans l'alcool.
- Les génines sont solubles dans l'alcool et les solvants organiques
- Les coumarines hydroxylées possèdent une intense fluorescence bleue en lumière ultraviolette. Leur spectre U.V est également caractéristique et sert à leur identification.
- Les propriétés chimiques sont principalement dues à la fonction lactone insaturée, notamment l'ouverture de l'anneau lactonique en milieu alcalin.
- Avec les sels de plomb, on obtient des combinaisons insolubles [19].

V. Propriétés pharmacologiques des coumarines

Différentes propriétés pharmacologiques ont été attribuées aux coumarines naturelles, notamment des effets vasoprotecteurs, antioédémateux, antioxydants, anti-inflammatoires, antimicrobiens, cytotoxiques, ... L'extrait de mélilot et l'esculoside peuvent être utilisés dans le traitement du lymphoedème postmastectomie ou dans l'insuffisance veinolymphatique. Mais l'intérêt thérapeutique des drogues contenant des coumarines et des dérivés coumariniques isolés est relativement limité [20,21].

Par contre, des dérivés synthétiques de la 4-hydroxycoumarine sont utilisés en thérapeutique comme **anticoagulants oraux**, trois produits étant commercialisés actuellement, à savoir la warfarine (Marevan®), l'acénocoumarol (Sintrom®) et la phenprocoumone (Marcoumar®). Ces molécules présentent une analogie structurale avec

la vitamine K et agissent en tant qu'inhibiteurs de la vitamine K époxyde réductase au sein de la cascade de coagulation.

VI. Activités biologiques et intérêts des coumarines

Les coumarines manifestent diverses activités biologiques, qui varient selon la substitution sur le cycle benzopyrone [22-25] : anti-agrégant plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulant, anti tumorale, diurétiques, antimicrobien, antivirale et analgésique [26-32]. Elles sont indiquées dans le cas de lymphœdème du membre supérieure après traitement radiochirurgical du cancer du sein.

O'Neal et son équipe ont montré l'efficacité des coumarines pour bloquer le cancer induit chimiquement par les radiations ultraviolettes [33]. Ces molécules sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxyde et peroxydes [34,35].

Les coumarines se révèlent être des composés thérapeutiques promoteurs dans l'amélioration du système immunitaire (action immunostimulante) : l'administration de la coumarine et de l'umbelliférone par des malades atteints de cancers a raison de 100 mg par jour a provoqué une augmentation des lymphocytes T Helper dans la circulation sanguine [32,36].

Une activité antifongique significative a également été rapportée pour certaines coumarines. Dans leurs études in vitro, Degre et son équipe ont montré que les coumarines paralysent la croissance de *Saccharomyces servisiae*. Pour l'activité antibactérienne, les coumarines sont efficaces contre les bactéries à Gram positif [30, 37, 38].

Après stimulation par des rayonnements ultra-violetts de grande longueur d'onde (365 nm), certaines furanocoumarines ont la propriété de stimuler fortement la synthèse de mélanine par les mélanocytes cutanées, à travers une augmentation de leur activité mitotique. Cette propriété a été exploitée par les égyptiens pour le traitement de la dépigmentation [36]. Par ailleurs, des chercheurs espagnols ont évalué l'activité anti-VIH de onze composés dérivés de la 4-phénylcoumarine isolés de l'espèce *Marila pluricostata* [39].

Il convient d'ajouter que les furanocoumarines sont impliquées dans bien d'autres mécanismes biologiques que nous ne pouvons décrire ici, mais qui constituent des pistes de recherches pour le traitement de maladies comme la sclérose en plaque et la dépression [40].

VII. Toxicité des coumarines :

La coumarine n'est pas toxique en soi, elle peut être convertie par les champignons, en une toxine le dicoumarol qui est typiquement présent dans le foin moisi ; chez le bétail, le dicoumarol provoque des hémorragies fatales en inhibant la vitamine K qui est un facteur de coagulation du sang [41, 42, 30].

Chez l'être humain la consommation des espèces végétales qui renferment des furanocoumarines linéaires ou angulaires provoque, s'il est accompagné d'une exposition à la lumière solaire, une dermatite phototoxique d'intensité variable allant du simple érythème jusqu'à l'apparition de bulles et de vésicules au niveau des zones exposées, quelques jours après le contact, les zones touchées présentent une hyperpigmentation [8]. Les furanocoumarines linéaires peuvent être le support de cycloaddition avec les bases pyrimidiques de l'ADN ou de l'ARN, la duplication des brins est alors bloquée ainsi que la traduction des ARN. Cette propriété est souvent invoquée pour expliquer les caractères mutagènes et carcinogènes de ces molécules [8].

VIII. Synthèse des coumarines :

VIII.1. La réaction de Perkin

La réaction de Perkin (schéma I.1) correspond à une condensation aldolique de l'anhydride acétique avec le salicylaldéhyde (ortho-hydroxybenzaldéhyde) en présence d'un sel alcalin de l'acide acétique [43].

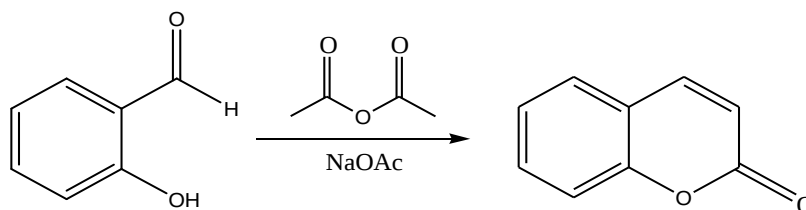


Schéma I.1 : La réaction de Perkin

VIII.2. La réaction de Pechmann :

La réaction de Pechmann (schéma I.2) consiste en une condensation d'un phénol avec un cétoester en milieu acide. Le mécanisme réactionnel implique une transestérification suivie d'une cyclisation en présence d' AlCl_3 (Friedel-Crafts) et d'une déshydratation [44].

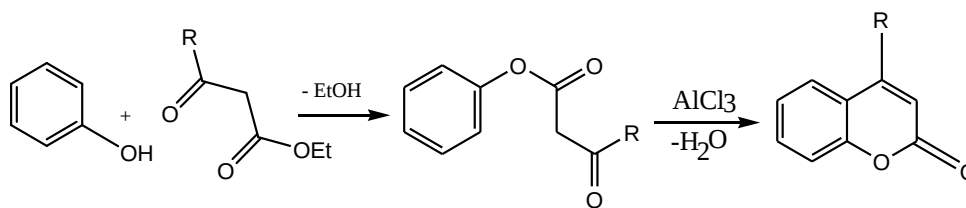


Schéma I.2 : La réaction de Pechmann

VIII.3. La réaction de Knoevenagel

La réaction (ou condensation) de KNOEVENAGEL est une réaction apparentée à la condensation aldolique, faisant intervenir un aldéhyde et un composé à méthylène actif, comme par exemple l'acide malonique ou un ester de l'acide malonique, avec une base faible comme catalyseur [45]. Cette réaction conduit à la formation de produits, insaturés par déshydratation intramoléculaire. Avec l'acide malonique comme réactif à méthylène actif, le bilan de la réaction se présente comme suit (schéma I.3). Afin d'illustrer le mécanisme réactionnel de la condensation de KNOEVENAGEL, nous avons choisi la réaction entre le salicylaldéhyde et le malonate de diéthyle en présence de pipéridine. Cet exemple nous permet en même temps de faire la transition vers l'obtention des coumarines.

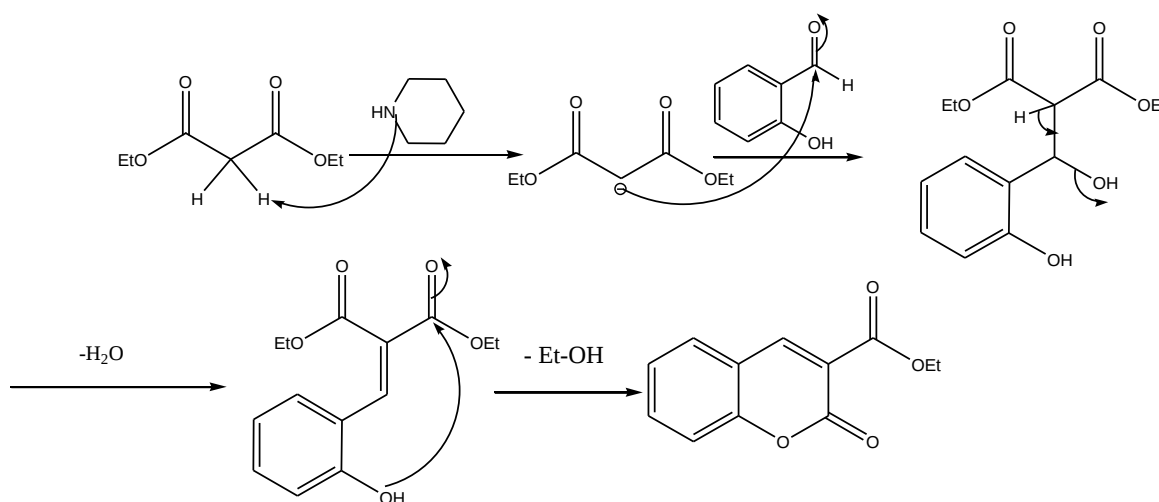


Schéma I.3 : Mécanisme réactionnel de la condensation de Knoevenagel

La condensation de Knoevenagel entre le salicylaldéhyde et un ester de l'acide malonique est largement utilisée pour synthétiser des esters de l'acide coumarine-3-carboxylique (figure I.2) [46].

La majorité des dérivés coumariniques développés au sein du Laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Liège par le passé sont obtenus par des réactions de ce genre [47-50].

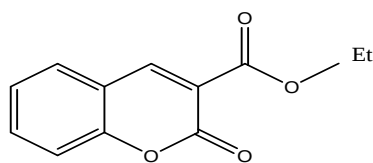


Figure I.3: Esters de l'acide coumarine-3-carboxylique

VIII.4. Différentes méthodes de synthèse de la 4-hydroxy-coumarine

La 4-hydroxycoumarine est préparée par plusieurs méthodes à partir des dérivés phénoliques, par exemple :

- La méthode de Jones et *al* appliquée au 2-hydroxyacétophénone permet d'obtenir la 4-hydroxycoumarine en présence de carbonate de diéthyle et l'hydrure de sodium en « one pot ». La réaction est chauffée à reflux dans le toluène pendant quelques heures (Schéma I.4) [51].

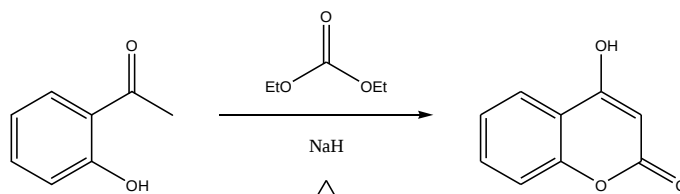


Schéma I.4

- La méthode d'Ogawa et *al* [52] utilise la 2-hydroxyacétophénone comme produit de départ en la faisant réagir avec du monoxyde de carbone, 1,5-diazabicyclo [5.4.0] undéc-5-ène (DBU) et du sélénium comme catalyseur dans du THF à reflux pendant 30 heures (Schéma I.5).

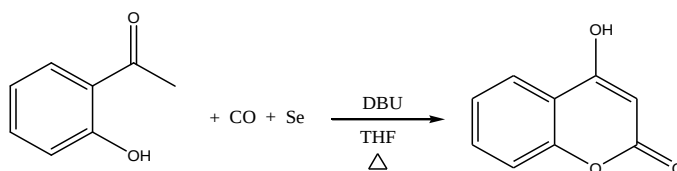


Schéma I.5

- La méthode de Jung et *al* [53] consiste à préparer d'abord soit la 3-acétyl-4-hydroxycoumarine, soit le 2,4-dioxochromane-3-carboxylate d'éthyle par cyclisation en deux ou trois étapes. La 4-hydroxy-coumarine est obtenue par hydrolyse en milieu acide (Schéma I.6).

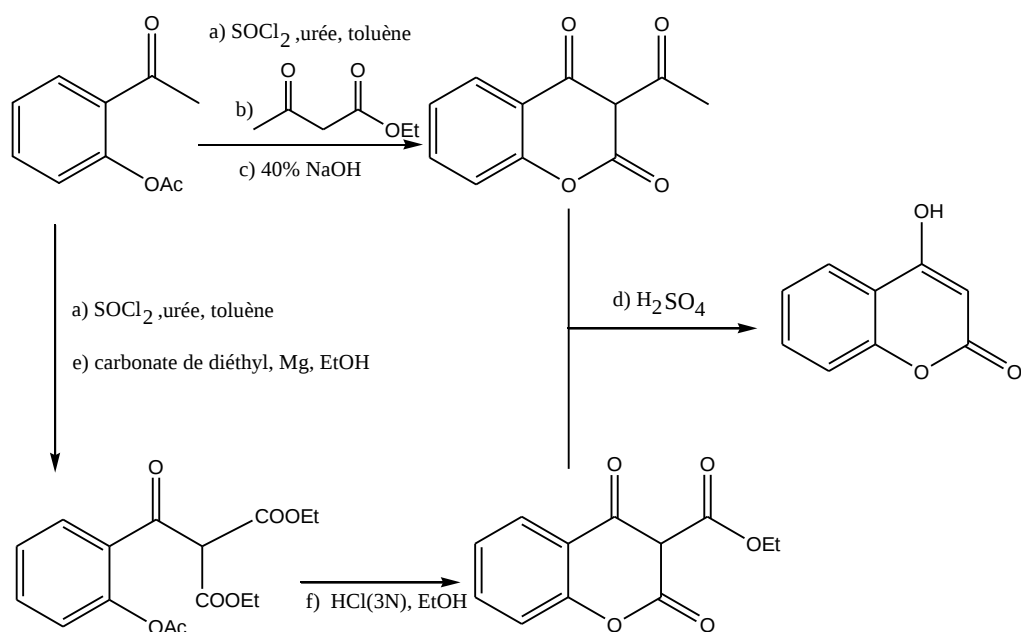


Schéma I.6



Chapitre II

Synthèse des coumarines

Synthèse par voie conventionnelle et sous irradiation micro-ondes de dérivés coumariniques. Synthèse de nouveaux chroménylchromènes par réaction d'iodation.

Les coumarines occupent une importante classe des produits naturels et synthétiques qui manifestent des propriétés variées. Elles ont une activité comme drogues et elles sont utilisées comme marqueurs fluorescents en biochimie. Leur application dans de nombreux domaines de la médecine humaine, animale et photochimie a permis le développement d'une recherche intense de nouvelles molécules contenant comme noyau de base la coumarine dans leur structure.

Les coumarines et leurs dérivés sont caractérisés par une excellente réactivité chimique et différentes bioactivités [54,55]. Leur potentiel biologique remarquable est la raison qui pousse les chercheurs à synthétiser de nombreux produits, convenables pour les applications de la thérapie moderne.

Un grand nombre de dérivés de synthèse ont montré une activité pharmacologique, et beaucoup d'entre eux sont appliqués en thérapie comme anticoagulants [56], agents antibactériens [57] et antifongiques [58].

L'intérêt des coumarines a récemment augmenté significativement parce qu'il a été constaté qu'elles réduisent l'activité du VIH [59,60]. En outre, les dérivés de la coumarine ont montré une activité cytostatique et peuvent donc être considérés comme des candidats potentiels pour le traitement anticancéreux [61].

Récemment, les dérivés de la coumarine de type dimère et tétramère ont été signalés à posséder l'activité inhibitrice de l'intégrase du VIH-1. Ces faits ont exhorté les recherches à effectuer la synthèse de dérivés de la coumarine et d'étudier leur activité biologique.

La condensation des 2-hydroxyarylaldehydes vis-à-vis de la 4-hydroxycoumarine a fait l'objet de nombreux travaux dans la littérature [62-64]. Ces auteurs montrent que la 4-hydroxycoumarine réagit avec les aldéhydes aromatiques α -hydroxylés par condensation de type Knoevenagel suivi d'une translactonisation

intramoléculaire par ouverture du cycle coumarinique ensuite recyclisation pour donner d'autres coumarines. Nous avons repris ces réactions par deux modes de synthèse, chauffage conventionnel à reflux et sous irradiations des micro-ondes et dans trois solvants différents, dans le but d'une part de chercher le solvant et l'amine qui conviennent à la meilleure optimisation du rendement et une séparation facile du produit de la réaction, confirmer la structure du produit qui se forme dans un solvant apolaire aprotique (toluène) en présence d'une amine tertiaire et dans un solvant polaire protique (éthanol, méthanol) et d'autre part mener la réaction sous irradiation micro-ondes dans les conditions développées dans notre laboratoire et qui se sont révélées, dans le cas des réactions de condensation, comme méthode simple, efficace et rapide et comparer le temps du déroulement de la réaction et le rendement du produit obtenu dans les différents milieux et par les deux modes de chauffage.

I. Action du salicylaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine

La condensation du salicylaldéhyde **2a** sur la 4-hydroxycoumarine **1** décrite dans la littérature par W.R. Sullivan [62] au reflux de l'éthanol, montre que cette dernière conduit à la formation du produit **A**, dont il donne seulement l'analyse élémentaire et les résultats sont aussi comparables avec la structure **3a**.

Cette réaction a été reprise en 1984 par P. de March et all [65] en réalisant la spectrométrie de masse, la spectroscopie RMN du proton et du carbone-13, ce dernier exclu la structure **A** par apparition des pics caractéristiques de la structure **3a** et en 1987 J. Cervello et all [66], en réalisant le spectre RMN du proton et du carbone-13 ainsi que l'effet NOE montre que le produit de la réaction est **3a** et que le composé **A** n'est qu'un intermédiaire.

Plus récemment, cette réaction a été reprise par M. Makhoulfi et all [67] en utilisant deux modes de chauffage : au reflux conventionnel du toluène et en présence d'un catalyseur basique, la triéthylamine et sous irradiation dans un four à micro-onde sans solvant en présence de KF supporté sur l'alumine à 10% où les auteurs ont confirmé la formation du composé **3a**.

En 2014, dans le cadre d'une préparation d'un mémoire de master II, cette réaction a été reprise par H. Ayache et L. Saidi [68] au reflux conventionnel pendant 1h et 30 mn et dans deux solvants de polarités différentes, dans l'éthanol sans catalyseur et dans

le toluène en présence de la triéthylamine. Ces auteurs ont montré que la réaction après 90 mn aboutie à la formation de deux composés **3a** et **3b**.

Nous avons entrepris cette réaction dans trois solvants différents, au reflux de l'éthanol et du méthanol pendant 20 mn uniquement et dans le toluène pendant 30mn. La réaction a été menée en présence d'un catalyseur basique la triméthylamine dans chaque cas. Deux produits sont obtenus dans le toluène **3a** et **3b** et un seul produit **3a** dans les deux autres solvants éthanol et méthanol après une filtration à froid et un lavage avec le solvant de la réaction froid dans chaque cas. La même réaction a été réalisée sous irradiation dans un four à micro-onde de cuisine modifié équipé d'un réfrigérant à reflux pendant 3 cycles de 5 mn et à une puissance de 180W avec une même quantité de solvant (éthanol /méthanol) et à 180W pendant 5mn puis 3 cycles de 3mn à 450W dans le cas de toluène. La réaction est reprise ensuite avec un minimum de toluène (5ml) et sans solvant à 180W pendant 15mn. Ces différentes méthodes aboutissent à la formation d'un même produit confirmé par comparaison de leurs points de fusion et leurs Rf.

Nous avons réalisé ces trois méthodes dans le but de comparer nos résultats avec ceux enregistrés dans la littérature (nature des produits formés, durée de la réaction et rendements).

Une étude spectroscopique est réalisée pour ces produits afin de confirmer leurs structures exactes. Les résultats des composés obtenus et des rendements sont reportés dans le tableau II.1.

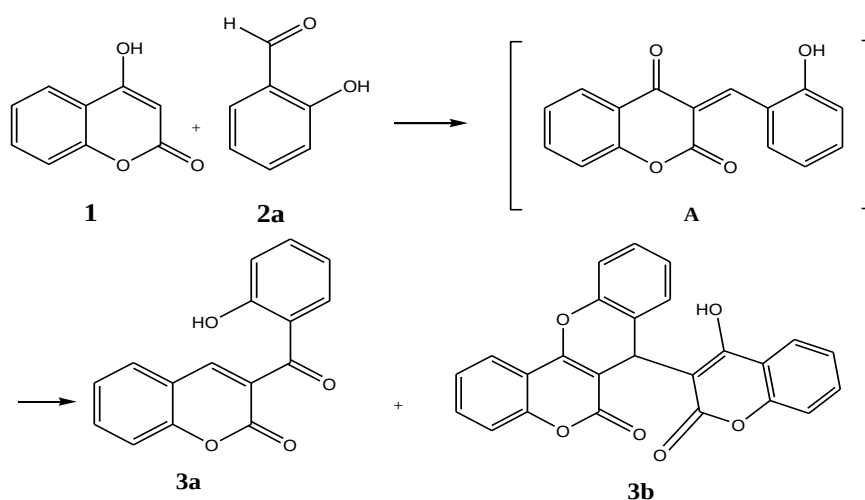


Schéma II.1

Tableau II.1 : Rendements des composés 3a et 3b obtenus dans les différents solvants et par les deux voies de chauffage

Composé	Ethanol Rdt %		Méthanol Rdt %		Toluène Rdt %		Sans solvant Rdt %	Minimum toluène Rdt %
Les conditions	Reflux (20mn)	M.O 180 W (15mn)	Reflux (20mn)	M.O 100 W (1mn) (3min) à 300w	Reflux (30mn)	M.O 180 W (5mn) puis (15min) à 450w	M.O 180 W (15mn)	M.O 180 W (15mn)
3a	53.38	53.38	78.57	76.31	12.78	30.83	75.19	38.66
3b	-	-	-	-	5.61	28.29	-	-

Un meilleur rendement de **78.57%** est obtenu pour le composé **3a** dans le méthanol au reflux conventionnel.

La pureté des produits est confirmée par la chromatographie sur couche mince (CCM).

Une étude spectroscopique en IR et UV /Visible est faite pour ces produits à fin de déterminer leurs structures exactes.

1.1. Analyse par chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. La phase stationnaire est constituée d'une couche mince et uniforme de 0,25mm d'épaisseur, d'une substance séchée et finement pulvérisée, appliquée sur un support approprié ; dans notre cas, nous avons utilisé des plaques de gel de silice 60 F254 (phase normale) prêtent à l'emploi à support en aluminium, La phase mobile ou éluant (généralement un mélange binaire ou ternaire de solvant) migre à la surface de la plaque par capillarité.

L'étude en chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée dans un éluant constitué d'un mélange de solvants chloroforme-méthanol. Nous avons

obtenus une seule tache différente de celle du produit de départ dont le R_f obtenu est donnée par la relation suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance parcourue par l'éluant}}$$

Les produits obtenus que ce soit dans l'éthanol, dans le méthanol ou dans le toluène présentent le même R_f et sont différents de celui du produit de départ la 4-hydroxycoumarine.

$$R_f (3a) = 0.90$$

$$R_f (3b) = 0.76$$

I.2. Analyse par spectroscopie UV/vis

La spectrophotométrie UV-visible est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique et la longueur d'onde d'absorption maximale d'une substance chimique donnée, généralement en solution.

Le spectre d'absorption du composé **3a** réalisé juste après dissolution dans le chloroforme montre une longueur d'onde d'absorption à $\lambda_{\text{abs}} = 342 \text{ nm}$ correspondant au groupement C=O de la coumarine qui apparait habituellement entre **300** et **400 nm**.

I.3. Analyse par spectroscopie IR

La spectroscopie infrarouge est une classe de spectroscopie qui traite dans la région infrarouge du spectre électromagnétique. Elle recouvre une large gamme de techniques, la plus commune étant un type de spectroscopie d'absorption, elle peut être employée pour l'identification de composés ou pour déterminer la composition d'un échantillon. Une table de corrélation de spectroscopie infrarouge présente dans la littérature scientifique est utilisée pour déterminer les bandes caractéristiques.

Les spectres IR sont réalisés dans un appareil de type BRUKER de marque TENSOR 27 IR spectrometer et sans utilisation de KBr.

Les bandes principales enregistrées pour **3a** et **3b** sont données dans le tableau II.2 suivant :

Tableau II.2: Résultats des spectres IR enregistrés

N° du composé	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)
3a	3403 (OH associé), 1716 (O=C-O)
3b	1750 (C=O), 3620-3650 une bande variable et fine (OH libre), 1715 (O=C-O).

II. Action de 2-hydroxynaphtaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine

L'action du 2-hydroxynaphtaldéhyde **2b** vis-à-vis de la 4-hydroxycoumarine **1** est décrite dans la littérature par la méthode de chauffage au reflux conventionnel et sous irradiation micro-ondes dans le toluène et en présence de la triéthylamine et sans solvant en présence de KF-Al₂O₃ 10% [69]. Ces auteurs ont montré que la réaction conduit à la formation du composé **4a** en passant par l'intermédiaire **B** qui n'est pas isolé.

Nous avons repris cette réaction dans les mêmes conditions que celles citées précédemment. Contrairement au cas du salicylaldéhyde, avec le 2-hydroxy naphthaldéhyde nous avons séparé dans les trois solvants et par les deux modes de chauffage un seul produit **4a**. Les résultats des rendements sont reportés dans le tableau II.3.

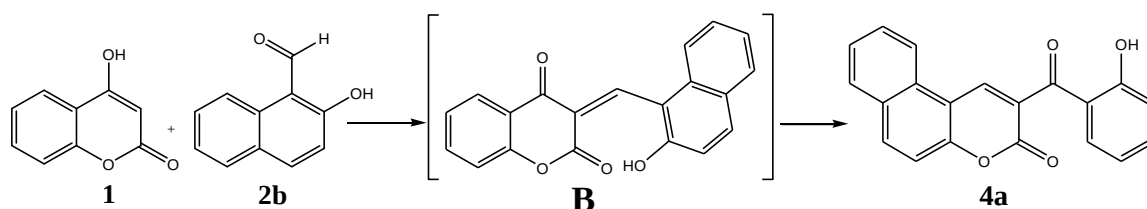


Schéma II.2

Tableau II.3: Rendements du composé 4a obtenu dans les différents solvants et par les deux voies de chauffage.

Composé	Ethanol Rdt %		Méthanol Rdt %		Toluène Rdt %		Sans solvant Rdt %	Minimum toluène Rdt %
Les conditions	Reflux 20mn	M.O 180 W (15mn)	Reflux 20mn	M.O 100 W (1mn) Puis 300W (3min)	Reflux 30mn	M.O 180 W (5mn) Puis (15min) à 450w	M.O 180W (15min)	M.O 180 W (5mn) Puis (15min) à 450w
4a	20.66	22.66	46.00	48.66	22.66	42.00	34.66	38.66

II.1. Analyse par Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse par CCM du composé **4a** donne une seule tache avec un rapport frontal différent de celui de la 4-hydroxycoumarine.

$$R_f (4a) = 0.80$$

II.2. Analyse par spectroscopie UV/vis:

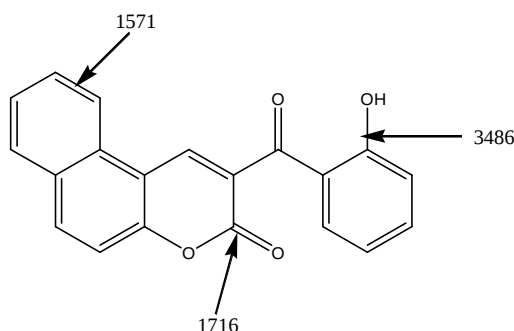
Les spectres d'absorptions ont été réalisés juste après dissolution dans le DMSO pour le composé présenté si dessous.

Le spectre UV/vis du composé **4a** montre une longueur d'onde d'absorption à $\lambda_{abs} = 375$ nm correspondant au groupement C=O de la coumarine qui apparait habituellement entre 300 et 400 nm.

II.3. Analyse par spectroscopie IR :

Les bandes principales obtenues pour le composé **4a** sont :

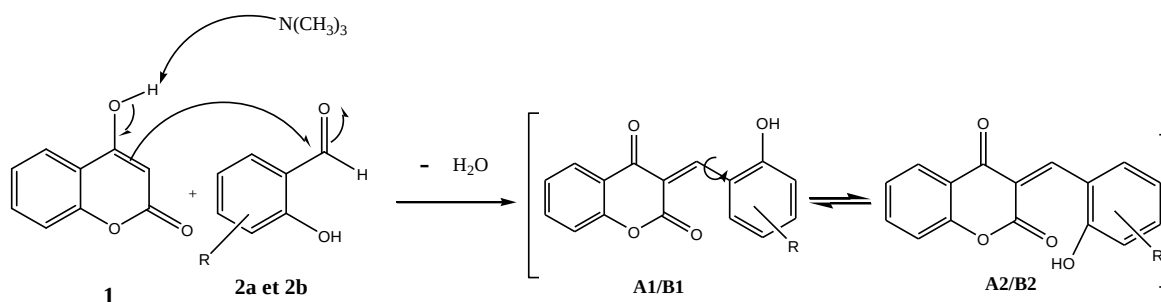
3486 cm^{-1} (OH libre), 1716 cm^{-1} (O=C-O), 1571 cm^{-1} (C=C-aromatique).



III. Mécanisme de la réaction

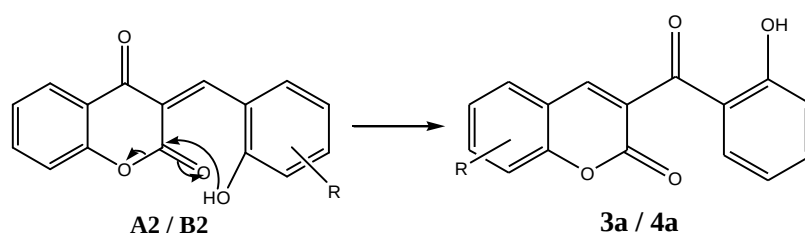
La synthèse a été effectuée à partir du 4-hydroxycoumarine **1** et divers aldéhydes aromatiques. La première étape de la synthèse est une condensation aldolique, suivie par la déshydratation, ce qui a entraîné la création d'un chromène **A/B** qui peut présenter deux formes tautomères **A1/B1** et **A2/B2** due à la libre rotation de la liaison σ . Dans la dernière étape, le chromène conjugué subit deux types de réactions selon la forme de l'intermédiaire: une translactonisation intramoléculaire qui donne les composés **3a-4a**. En présence d'une deuxième molécule de la 4-hydroxycoumarine, l'intermédiaire **A** réagit avec cette dernière et donne le dimère 3,3'- (benzylidène) bis (4-hydroxycoumarine) **3b**, ce qui n'est pas le cas de l'intermédiaire **B**.

Première étape :

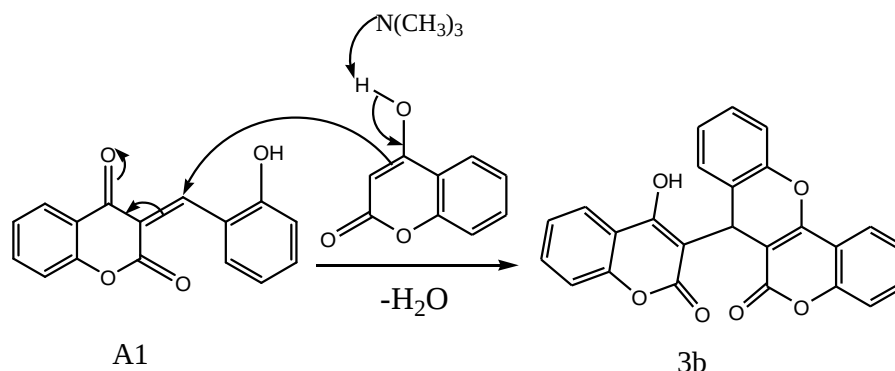


Deuxième étape

a/ Translactonisation intramoléculaire



b/ Addition d'une deuxième molécule de 4-hydroxycoumarine

IV. Synthèse de dérivés chromèno[3,2-c]chromèn-2,3-diones 5 et 6

Les coumarines synthétisées présentent un fort potentiel réactionnel. Afin de les valoriser nous avons essayé de greffer un halogène I^+ pouvant faire l'objet d'une substitution électrophile sur le noyau benzénique de la coumarine ou du phénol, dans le but d'accéder à de nouveaux composés iodés intéressants sur le plan réactionnel et biologique comme traceurs radioactifs dans la médecine nucléaire.

La réaction a été menée en utilisant $Na^{125}I$ en présence de la chloramine T comme oxydant et dans un mélange de solvant méthanol/acétonitrile.

Après analyse en spectrométrie de masse, nous avons constaté qu'il ya eu une perte d'une molécule de H_2 par rapport aux produits de départ et absence d'iode dans la masse moléculaire du produit final 5 même pour 6. Dans ce cas donc, l'iode a servi d'un catalyseur et le produit iodé n'était qu'un intermédiaire. Des analyses en spectrométrie de masse LC-MS électrospray en mode positif (ESI+) ont été réalisées afin de déterminer la structure des produits obtenus, et nous avons été surpris par l'obtention d'un nouveau produit cyclisé entre le groupement hydroxyle du phénol et le carbone de la double liaison en position 4 confirmé par une perte d'une molécule d'hydrogène H_2 par rapport aux molécules de départ 3a et 4a. Cette cyclisation peut donc s'expliquer par une attaque nucléophile du groupement hydroxyle grâce aux doublets non liants de l'oxygène, sur le carbone 4 de la coumarine après iodation de ce dernier (schéma II.3).

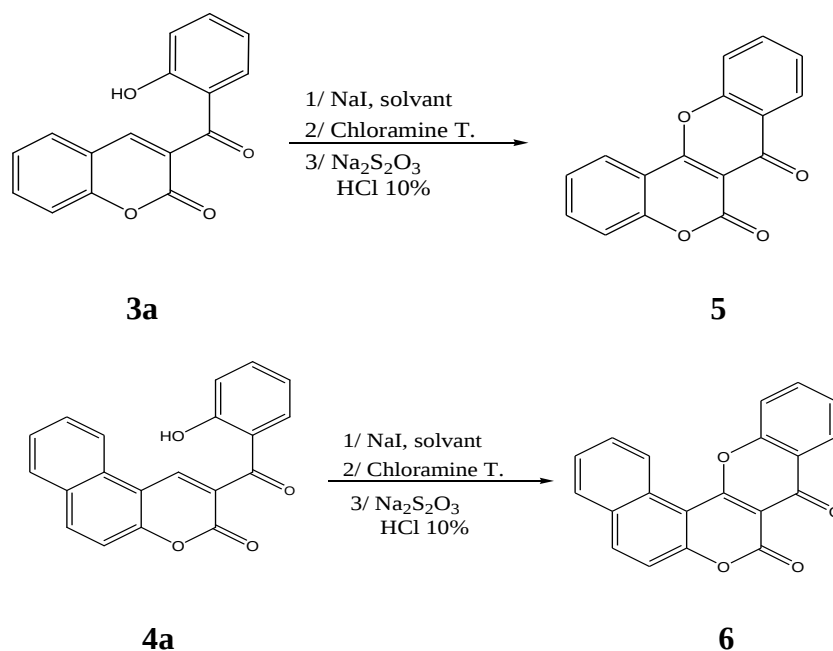


Schéma II.3

IV.1. Analyse par spectroscopie UV/vis

Les spectres d'absorptions ont été réalisés juste après dissolution dans le chloroforme pour les composés présentés ci-dessous :

Les spectres UV/vis des composés **5** et **6** montrent deux longueurs d'ondes d'absorption :

Composé **5** : $\lambda_{\text{abs1}} = 294 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{abs2}} = 318 \text{ nm}$ et Composé **6** : $\lambda_{\text{abs1}} = 363 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{abs2}} = 382 \text{ nm}$, attribuables aux deux groupements carbonyles ($\text{C}=\text{O}$).

IV.2. Analyse par spectroscopie IR

Les bandes caractéristiques enregistrées en cm^{-1} pour les produits **5** et **6** sont :

1696 cm^{-1} ($\text{O}=\text{C}-\text{O}$), $1500\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{C}$ aromatique) et 1737 cm^{-1} ($\text{O}=\text{C}-\text{O}$)

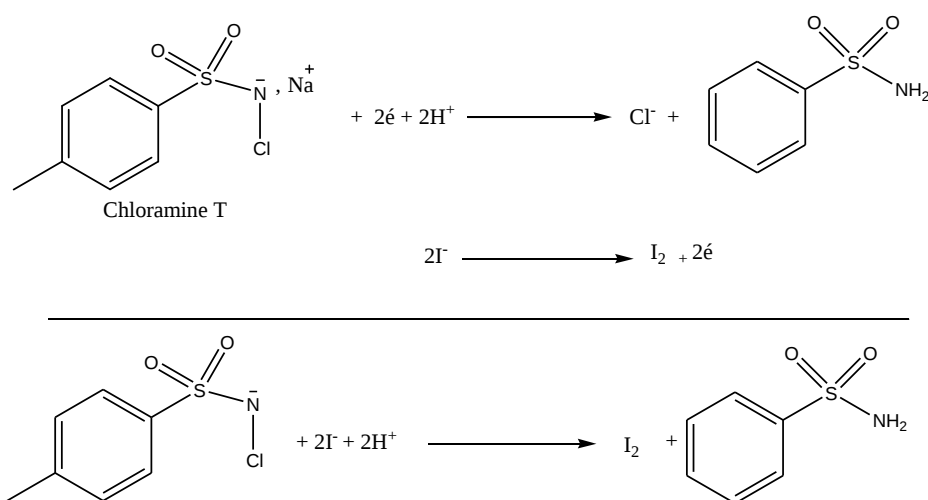
IV.3. Analyse par spectrométrie de masse LC-MS (ESI+)

Le spectre de masse LC-MS en mode (ESI⁺) du composé **5** montre 3 pics moléculaires correspondants aux ions $(\text{M}+\text{H})^+$, $(\text{M}+\text{Na})^+$ et $(2\text{M}+\text{Na})^+$ qui apparaissent à $m/z = 265$ (65%), **287 (100%)** et **551 (26%)** respectivement ce qui confirme la formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{O}_4$. Le pic de base $(\text{M}+\text{Na})^+$ de la molécule **5** apparaît à $m/z = 287$ (100%) ce qui confirme la pureté et la stabilité de la molécule.

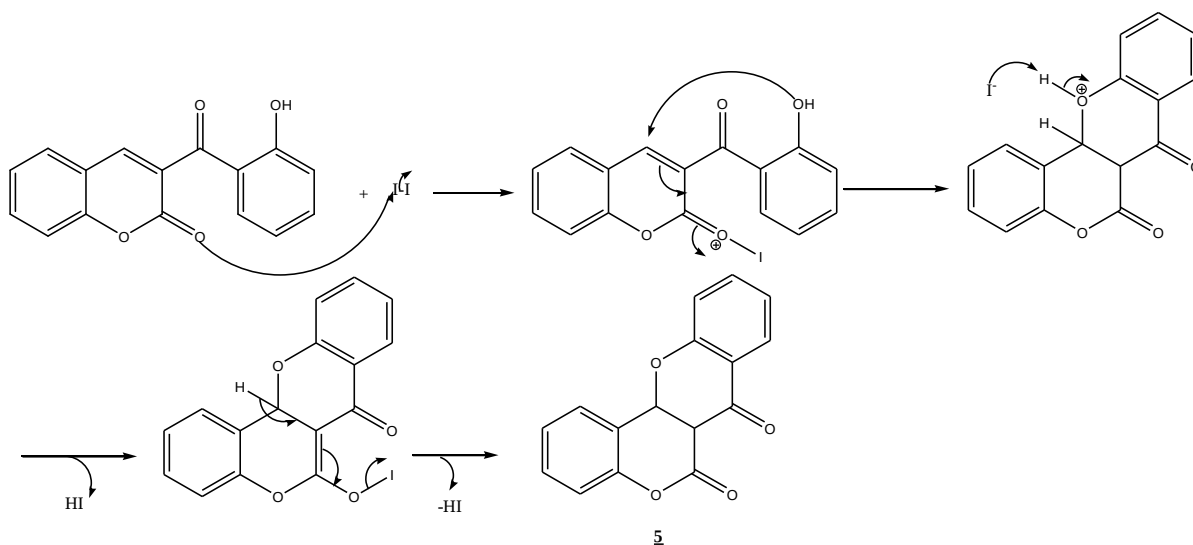
Le spectre de masse LC-MS en (ESI⁺) du composé **6** montre 3 pics moléculaires correspondants aux ions (M+H)⁺, (M+Na)⁺ et (2M+Na)⁺ qui apparaissent à **m/z**= **315 (65%)**, **337 (100%)** et **651 (63%)** respectivement ce qui confirme la formule brute C₂₀H₁₀O₄. Le pic de base (M+Na)⁺ de la molécule **6** apparaît à **m/z** =**337 (100%)** ce qui confirme la pureté et la stabilité de la molécule.

IV.4. Mécanisme de la réaction

Oxydation des ions I⁻ en I₂



Formation du chroméno[3,2-c]chromèn-2,3-diones



V. Action de 5-iodosalicylaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine

Afin de réaliser notre objectif nous nous sommes proposé de faire la réaction d'iodation sur le salicylaldéhyde pour obtenir le composé 5-iodosalicylaldéhyde puis procéder de la même façon qu'au départ c.à.d. à sa condensation sur la 4-hydroxycoumarine pour avoir des composés iodés.

V.1. Synthèse de 5-iodosalicylaldéhyde

La réaction d'iodation du salicylaldéhyde **2a** est décrite dans la littérature par réaction de KI en présence de NaOCl [69]. Nous avons procédé de la même manière en utilisant le Na-I et la Chloramine T comme oxydant (schéma II.4).

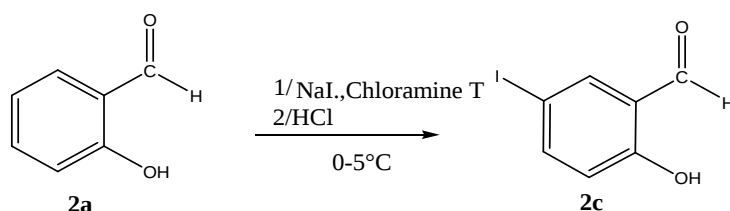


Schéma II.4

La pureté du produit **2c** a été vérifiée par CCM et sa structure est identifiée par comparaison à la littérature du point de fusion et des résultats spectroscopiques en UV/visible et I.R.

L'analyse par CCM du composé **2c** montre une seule tache avec un rapport frontal de **0.99**, Ce qui confirme la pureté du composé **2c**.

$$P_f = 92^{\circ}\text{C}, \quad P_f \text{ littérature} = 98^{\circ}\text{C} \text{ [69]}.$$

V.2. Analyse par spectroscopie UV/vis

Le spectre UV/vis du composé **2c** réalisé dans le chloroforme donne une longueur d'onde d'absorption à $\lambda_{\text{abs}} = 350 \text{ nm}$.

V.3. Analyse par spectroscopie IR

Les bandes caractéristiques enregistrées en cm^{-1} pour le produit **2c** sont :

3239 cm^{-1} (OH associé), 166 cm^{-1} (C=C aromatique), 695 cm^{-1} (C-H aromatiques), 539 cm^{-1} (C-I).

V.4. Action de 5-iodosalicylaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine

La réaction de condensation du 5-iodosalicylaldéhyde **2c** sur la 4-hydroxycoumarine **1** est réalisée dans les trois solvants, toluène, éthanol et méthanol en présence de la triméthylamine, aux reflux conventionnel et sous irradiation micro-ondes. Dans le toluène il se forme un composé blanc à chaud dès le début du chauffage par contre dans le méthanol et l'éthanol le solide blanc se sépare après 30 mn. A la fin de la réaction le solide blanc est récupéré par filtration à chaud et le filtrat donne un produit jaune après refroidissement et évaporation du solvant.

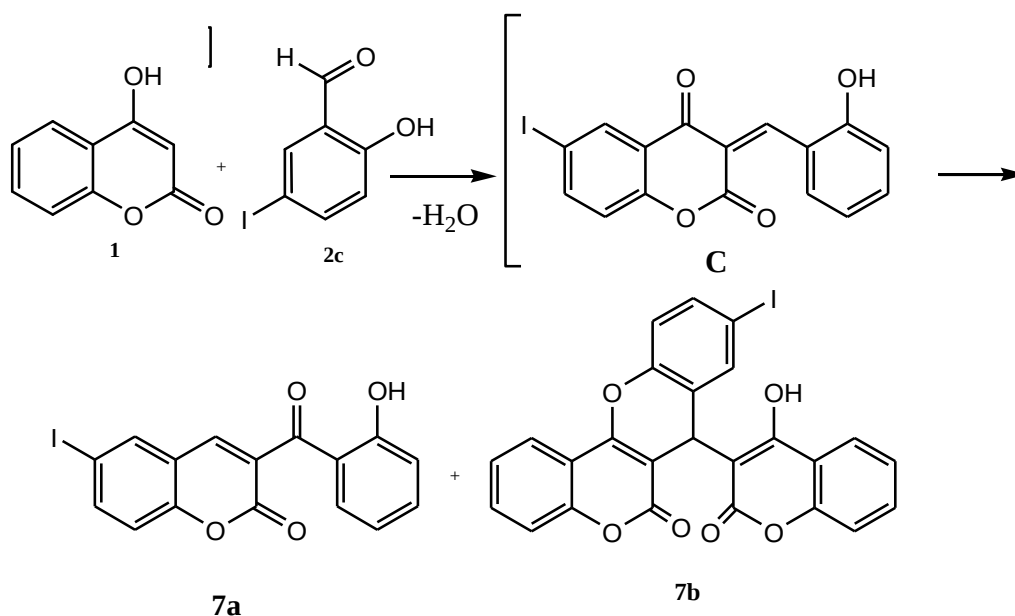


Schéma II.5

V.4.1. Analyse par Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse par CCM du composé **7a** montre une seule tache avec un rapport frontal différent de celui du composé **2c**.

$$R_f (7a) = 0.71$$

$$R_f (2c) = 0.98$$

V.4.2. Analyse par spectroscopie UV/vis

Le spectre d'absorption du composé **7a** a été réalisé juste après dissolution dans le chloroforme, ce dernier montre une longueur d'onde d'absorption à **310nm**

V.4.3. Analyse par spectroscopie IR

Les bandes caractéristiques enregistrées en cm^{-1} pour le produit **7a** sont : 3054 cm^{-1} (OH associé), 1706 cm^{-1} (O=C-O), 1613 cm^{-1} (C=O), 759 cm^{-1} (C-H aromatique), 533 cm^{-1} (C-I).

VI. Conclusion

Dans ce travail le but que nous avons fixé est de synthétiser des dérivés coumariniques en faisant réagir la 4-hydroxycoumarine comme réactif de base avec le salicylaldéhyde dans un premier temps ensuite avec le 2-hydroxynaphtaldéhyde dans un deuxième temps en présence de thriméthylamine comme catalyseur sous différentes conditions aux reflux du solvant et sous irradiation micro-onde (sans solvant, minimum de toluène et en présence de solvant) est atteint.

Avec les deux aldéhydes le meilleur rendement a été enregistré dans le méthanol à reflux.

Dans la deuxième partie nous avons essayé de synthétiser de nouveaux composés iodés intéressants sur le plan biologique comme traceurs radioactifs dans la médecine nucléaire mais après l'identification des produits obtenus avec spectrométrie de masse, nous avons constaté que les composés obtenus ne contiennent pas d'Iode.

C'est pour cette raison que nous avons réalisé la réaction d'iodation sur le salicylaldéhyde en utilisant Na-I et la Chloramine T comme oxydant ce qui a aboutit à la formation de 5-iodosalicylaldéhyde, ce dernier a été condensé par la suite avec la 4-hydroxycoumarine pour obtenir deux produits iodés, blanc séparé à chaud et jaune après filtration.

Après identification de nos produits de synthèse en utilisant les différentes techniques d'analyses usuelles (Pf, CCM, UV/vis et I.R), nous avons procédé à la valorisation de ces derniers en étudiant leurs activités antioxydantes et antibactériennes qui seront détaillées dans le chapitre III suivant.

Partie expérimentale

I. Appareillages

Les points de fusion sont déterminés par un appareil scientifique SPM3 équipé d'un microscope.

La chromatographie analytique sur couche mince (CCM) a été effectuée à l'aide des plaques de gel de silice 60 F254 prêtent à l'emploi à support en aluminium.

Les produits obtenus sont dissous dans l'acétone et l'éluant utilisé est un mélange Chloroforme-Méthanol.

Pour la révélation, les plaques sont introduites dans une boîte qui contient de l'iode. L'obtention d'une seule tache indique la pureté du produit.

Spectroscopie Infrarouge

Les résultats de l'IR ont été obtenus à l'aide d'un Spectrophotomètre: BRUKER TENSOR 27 IR spectrometer réalisés au niveau du laboratoire LPCM de l'UMMTO. Les nombres d'ondes (ν) sont donnés en cm^{-1} .

Spectrophotométrie UV/visible

Les mesures en spectrophotométrie UV-visible sont réalisées dans le laboratoire de LPCM de l'UMMTO. Les bandes d'absorption ont été enregistrées sur un appareil scientifique de marque Thermo a EVOLUTION 220, UV. Visible spectrophotometer. Les produits ont été dissous dans de chloroforme.

I-Matières et matériels

Pour la synthèse, le toluène utilisé est apporté du laboratoire BIOCHEM, Le méthanol celui du laboratoire CARLO ERBA, l'éthanol est issu du laboratoire SIGMA-ALDRICH, Les aldéhydes aromatiques utilisés sont commerciaux, et la 4-hydroxycoumarine utilisée apporté par FLUKA. Le 2-hydroxynaphtaldéhyde est synthétisé au niveau du laboratoire.

II-Manipulation

II.1-Réaction d'iodation du salicylaldéhyde

Dans un ballon de 500 mL, sont introduits 14 mL de salicylaldéhyde (0,134mole) et 300mL de méthanol sous agitation magnétique jusqu'à dissolution totale. 1 équivalent de Na-I

(0,134mole, 20,07g) est additionné toujours en maintenant l'agitation magnétique. Une fois Na-I est dissout, le ballon est placé dans un bain de glace. On ajoute 1 équivalent de la Chloramine T ensuite on agite pendant 60min en gardant la température à 0°C. On retire le bain de glace et on ajoute 100 mL d'une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 10% en masse en continuant l'agitation pendant 5mn. Sous agitation magnétique on acidifie le mélange avec une solution de HCl (2M, environ 10 mL) jusqu'à pH 3-4 et précipitation d'un produit de couleur jaune. Après filtration, et lavage avec de l'eau distillée froide, le solide est recristallisé dans un mélange éthanol-eau (50/50) pour avoir le produit 5-iodosalicylaldéhyde **2c** sous forme de poudre jaune pâle.

II.2. Réactions entre le salicylaldéhyde et ses dérivés vis à vis de la 4-hydroxycoumarine

a. Reflux conventionnel

Dans un ballon de 250 mL, on introduit 5 mmoles de 4-hydroxycoumarine et 20 mL de solvant puis on additionne 5 mmoles du salicylaldéhyde ou de l'un de ses dérivés en présence d'une base organique faible la triméthylamine (0.4 mL).

La durée de la réaction varie selon le solvant et l'aldéhyde aromatique utilisé (plus la masse molaire de l'aldéhyde aromatique est grande, la durée de la réaction augmente, 20mn pour le salicylaldéhyde, 30min pour le 2-hydroxynphtaldéhyde et 2h pour le 4-iodosalicylaldéhyde).

Dans le toluène, la 4-hydroxycoumarine est partiellement soluble à froid et à chaud elle se dissout complètement. Avec le salicylaldéhyde il se forme un précipité blanc à chaud après quelques mn. Après filtration, le produit solide est lavé avec du méthanol chaud noté **3b**. Le filtrat donne un autre produit jaune après refroidissement, filtré et lavé avec du méthanol chaud ensuite le filtrat est refroidit pour récupérer un produit pure noté **3a**.

Dans les mêmes conditions opératoires, en remplaçant le toluène par l'éthanol et le méthanol (solvants polaires et protiques) et avec les mêmes quantités d'aldéhyde et 4-hydroxycoumarine en ajoutant la triméthylamine comme catalyseur basique, nous avons obtenu les mêmes produits mais avec des rendements différents.

La pureté a été contrôlée par la chromatographie sur couche mince (CCM) qui donne une seule tache différente de celle du produit de départ.

Dans les mêmes conditions opératoires que précédemment en changeant le salicylaldéhyde par le 2-hydroxynaphtaldéhyde, il se forme un précipité à chaud. Après filtration à chaud, le produit solide est lavé avec le solvant de la réaction chaud. Ensuite on récupère le produit solide de couleur jaune noté **4a**.

Nous avons obtenus le même produit **4a** dans les trois solvants mais avec des rendements différents.

- **Condensation avec le 5-iodosalicylaldéhyde**

La condensation de 5-iodosalicylaldéhyde avec la 4-hydroxycoumarine est réalisée au reflux pendant 2 heures dans les trois solvants. Dans le toluène il se forme un composé blanc à chaud dès le début du chauffage par contre dans le méthanol et l'éthanol le solide blanc se sépare après 30 mn. A la fin de la réaction le solide blanc **7b** est récupéré par filtration à chaud. Après concentration du filtrat et refroidissement un produit jaune **7a** se sépare, filtré ensuite lavé avec du diéthylique.

b. Condensations sous irradiation micro-ondes

On suit les mêmes étapes que dans le cas du chauffage conventionnel pour chaque aldéhyde aromatique mais avec des conditions spécifiques, par rapport au solvant telle que :

- une énergie de 180W pendant 5mn puis 2 cycles de 5mn à 180W (cas d'éthanol).
- une énergie de 100W pendant 1mn puis 300W pendant 3mn (cas de méthanol).
- une énergie de 180W pendant 5mn puis 450w pendant 5mn à 3 cycles (cas du toluène).

Nous avons obtenu les mêmes produits que dans le cas conventionnel mais avec des rendements différents.

b.1. Avec minimum de toluène

Dans les mêmes conditions opératoires que précédemment pour les trois aldéhydes aromatiques (sous irradiation M.O) mais avec un minimum de toluène (5 mL), les produits séparés sont similaire à ceux obtenus avec 20mL de toluène mais avec des rendements plus élevé.

b.2. Sans solvant

Dans un mortier, on introduit un mélange équimolaire de la 4-OHcoumarine (0.005mol), aldéhyde aromatique 2-hydroxylé (0.005mol) et 0.4mL de la triméthylamine et

pour bien homogénéiser le mélange on a ajouté quelques gouttes de diéthyléther puis on met le mélange réactionnel dans un ballon afin de le mettre sous irradiations à micro-onde dans les conditions optimales pour chaque aldéhyde aromatique.

On a obtenu les mêmes produits qu'avec solvant avec des rendements élevés.

II.3. Synthèse des dérivés chromèno[3,2-c]chromèn-2,3-diones 5 et 6

Dans un ballon de 100mL, est introduit 1 équivalent de **3a** (0.002mol)/ **4a** (0.002mol) au reflux d'un mélange de solvant (ACN-MeOH pour **3a** et ACN-MeOH-DMSO pour **4a**) auquel sont ajoutés 3 équivalents de Na-I. Le mélange est gité pendant quelques minutes jusqu'à dissolution totale de Na-I, ensuite 3 équivalent de Chloramine T sont ajoutés directement dans le ballon. Un changement de couleur du jaune vers le marron est apparu (présence des ions I^+ ou bien l'oxydation des ions I^- par la Chloramine T). Le mélange réactionnel est chauffé à 65°C sous agitation magnétique. Après 3h, 2 équivalents de $Na_2S_2O_3$ dissouts dans 1ml d'eau distillée sont ajoutés en maintenant l'agitation pendant 10mn ; un changement de couleur du marron foncé vers le marron clair est observé (réduction des ions I^+ par $Na_2S_2O_3$). Après concentration du mélange, HCl (2M) est ajouté jusqu'à un pH acide (1-2) et un solide se forme. Le solide est filtré ensuite lavé plusieurs fois avec le diéthyle éther.

III-Résultats spectroscopiques

Le produit 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromèn-2-one (**3a**)

Le composé **3a** est obtenu sous forme d'un produit jaune ; $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) 3403 cm^{-1} (OH associé), 1716 cm^{-1} (O=C-O) ; Pf= 175°C; Rf= 0.90; UV/vis: λ_{abs} = 342 nm (dans le $CHCl_3$).

Le produit de 2-(2-hydroxybenzoyl)-3H-benzo[f]chromèn-3-one (**4a**)

Le composé **4a** est obtenu sous forme d'un produit jaune ; $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) 3486 cm^{-1} (OH libre), 1716 cm^{-1} (O=C-O), 1571 cm^{-1} (C=C-aromatique) ; Pf= 254-256°C; Rf=0.80 ; UV/vis: λ_{abs} =375 nm (dans le $CHCl_3$).

Dérivés chromèno[3,2-c]chromèn-2,3-diones 5 et 6

Le composé **5** est obtenu sous forme d'une poudre blanche-grisée Rdt % : 14.77% ; $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) 1696 cm^{-1} (O=C-O), 1500-1600 cm^{-1} (C=C aromatique) ; Pf= 120°C ; UV/vis: λ_{abs1} = 294 , λ_{abs2} = 318 nm ; LC-MS (ESI+) : 3 pics moléculaires correspondants aux ions

$(M+Na)^+$, $(M+H)^+$ et $(2M+Na)^+$ qui apparaissent à $m/z=287$ (100%), 265 (65%) et 551 (26%) respectivement ce qui confirme la formule brute $C_{16}H_8O_4$ et le pic de base $(M+Na)^+$ de la molécule **5** apparaît à $m/z = 287$ (100%) ce qui confirme la pureté et la stabilité de la molécule.

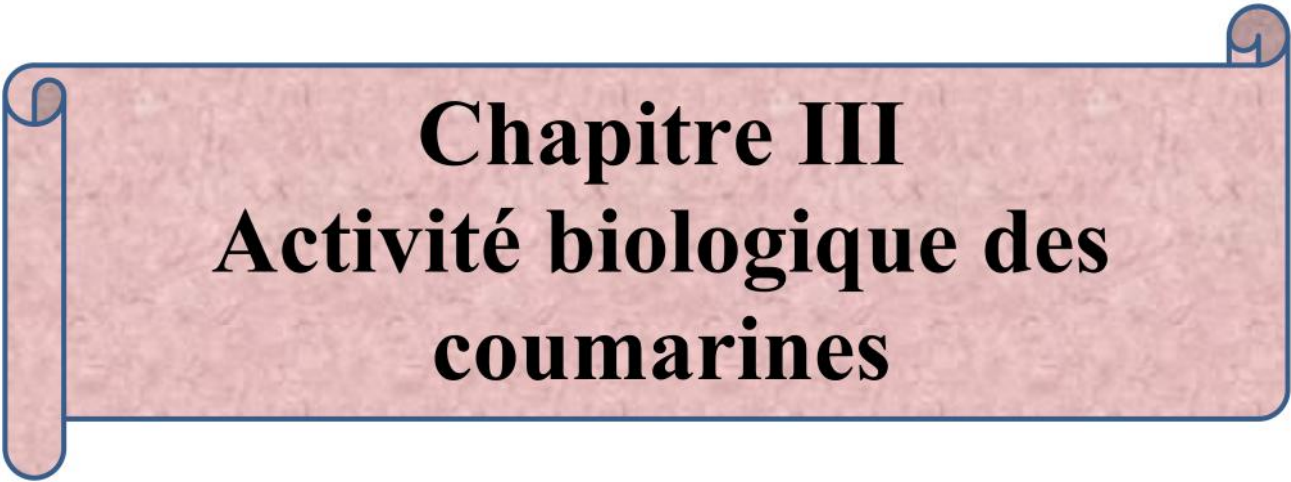
Le composé **6** est obtenu sous forme d'une poudre marron claire; Rdt % : 64.91%; $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 1737 cm^{-1} (O=C-O), 1500-1600 cm^{-1} (C=C aromatique); Pf=216°C; UV/vis : $\lambda_{abs1} = 363$, $\lambda_{abs2} = 382$ nm; LC-MS (ESI+): 3 pics moléculaires correspondants aux ions $(M+Na)^+$; $(M+H)^+$ et $(2M+Na)^+$ qui apparaissent à $m/z= 337$ (100%), 315 (65%) et 651 (63%) respectivement ce qui confirme la formule brute $C_{20}H_{10}O_4$. Le pic de base de la molécule **6** apparaît à $m/z = 337$ ($(M+Na)^+$, 100%) ce qui confirme la pureté et la stabilité de cette dernière.

2-hydroxy-5-iodobenzaldéhyde (2c)

Poudre jaune pâle; Rdt% : 91,30% ; $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3239 cm^{-1} (OH associé), 695 cm^{-1} (C-H aromatique), 539 cm^{-1} (C-I), 1661 cm^{-1} (C=C); Pf= 92 °C; Rf= 0.98; UV/vis: $\lambda_{abs} = 350$ nm

Le produit 3-(2-hydroxybenzoyl)-6-iodo-2H-chromèn-one (7a)

Obtenu sous forme d'une poudre jaune; Rdt% : 3.57% ; $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3054 cm^{-1} (OH associé), 1706 cm^{-1} (O=C-O), 1613 cm^{-1} (C=O), 759 cm^{-1} (4H aromatiques), 533 cm^{-1} (C-I); Pf= 252 °C; Rf= 0.71 ; UV/vis: $\lambda_{abs} = 310$ nm.



Chapitre III

Activité biologique des coumarines

Evaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des dérivés de la 4-hydroxycoumarine et des chroménylchromènes.

Face à la perte d'efficacité de l'antibiothérapie, mise en péril par l'émergence de germes multi-résistants et à la recherche de nouveaux agents antioxydants plus efficaces, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité absolue et un axe de recherche mondial, comme en témoigne le nombre toujours croissant d'articles parus dans la littérature à ce sujet. En outre, la compréhension des phénomènes impliqués dans les mécanismes d'actions de ces molécules est un critère essentiel pour pouvoir imaginer de nouvelles structures encore plus actives. La nature fournit les antioxydants et les antimicrobiens les plus connus, la synthèse par voie chimique permet, dans certains cas, d'améliorer l'activité de ceux-ci par des modifications structurales.

I. Etude de l'activité antibactérienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu.

La thérapie des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes ou synthétiques [70].

I.1. Définition de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne correspond à l'activité d'une molécule ou composé de source végétale ou synthétique, qui à très faible concentration inhibe le développement d'une bactérie (action bactériostatique) ou la tue (action bactéricide). La sensibilité d'une bactérie varie selon la nature de l'antibactérien [70].

I.2. Propriétés antimicrobiennes importantes

Certaines espèces microbiennes pathogènes, sont de moins au moins sensibles aux antibiotiques et développent des résistances multiples à ces derniers. D'où la nécessité

d'orienter les recherches vers la synthèse de nouvelles molécules actives pouvant faire l'objet d'inhibition de développement des microorganismes.

Parmi ces molécules nous trouvons les polyphénols. Qui sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydroxylases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire [71].

Les molécules aromatiques possédant le coefficient antibactérien le plus élevé sont les phénols, ensuite viennent les aldéhydes et les cétones. Elles s'affirment par endroits supérieurs aux antibiotiques classiques [72].

A l'heure actuelle, plus de huit mille composés phénoliques ont été isolés et synthétisés [73]. Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques. Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénoliques, xanthones et autres phloroglucinols [74].

I.3. Etude de l'activité antibactérienne des coumarines

Un grand nombre des coumarines tel que les 4-hydroxycoumarines et leurs dérivés ont été synthétisés et évalués pour leur aptitude à jouer un rôle positif dans la prévention des maladies humaines et animales. Diverses activités pharmacologiques des composés représentatifs ont été décrites dans la littérature. La plupart des dérivés de 4-hydroxycoumarine ont montré des effets anticoagulants représentatifs [75], alors que d'autres études ont montré que ces molécules exercent plusieurs activités antimicrobiennes et antifongiques. Par exemple, Elles inhibent la croissance de *Saccaromyces cerevisiae* et la germination des spores d'*Aspergillus niger*. Pour l'activité antibactérienne, on note qu'ils sont plus efficaces contre les Gram positifs [71].

I.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

I.4.a. Méthode de disques

L'activité biologique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque contenant le produit. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé [76].

- **Réalisation de l'antibiogramme**

Les différentes souches sont inoculées sur gélose nutritive. Après incubation de 18 à 24 heures à 37°C, un inoculum est préparé pour chaque souche dans l'eau physiologique, jusqu'à une densité optique de 0.08 à 0.1, puis ensemencement sur Muller-Hinton.

Les disques (6 mm de diamètre) en papier wattman imprégnés du produit à tester sont déposés aseptiquement sur la gélose inoculée. Les boîtes sont ensuite incubées 24 heures à 37 °C.

Les zones d'inhibition des souches sont observées autour des disques (6 mm) puis mesurées.

Des disques standards d'antibiotiques sont utilisés comme contrôles positifs [77].

I.4.b. Méthode de dilutions

Les produits qui semblaient être actifs, font l'objet d'une évaluation de leurs activités par la méthode de dilutions pour l'étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

- **Détermination des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)**

Les CMI sont déterminées par la méthode standardisée de micro-dilution en milieu liquide. L'étude se réalise en tubes Eppendorfs en bouillon Mueller-Hinton, avec un inoculum bactérien final de D.O (0.08-0.1).

Les tubes Eppendorfs sont incubés pendant 18h à 37°C.

Les dilutions des échantillons se distribuent dans des tubes à essais en partant de la concentration la plus forte à la plus faible.

La CMI correspond à la première dilution où la croissance est négative (pas de culture visible) [77].

I. Activité antioxydante

Certaines recherches scientifiques récentes ont mis en évidence l'existence des facteurs communs responsables aussi bien du vieillissement que de maladies liées au stress oxydant comme le cancer, les maladies cardio-vasculaires, les maladies neuro-dégénératives (Parkinson et Alzheimer), et aussi certaines allergies et autres maladies chroniques. Ces diverses maladies auraient, entre autres, la même composante qui permet au bois de brûler, à l'huile de rancir, à l'aliment d'altérer ou au fer de rouiller. L'un des principaux acteurs de tout cela est l'oxydation de l'oxygène [78].

Quand la cellule utilise de l'oxygène, il se passe, un grand nombre de réactions d'oxydation.

Le résultat est la production d'énergie, mais aussi de différents sous-produits appelés espèces réactives de l'oxygène « ERO» [79]. L'organisme est équipé pour lutter contre ces ERO par un énorme système de défense constitué de système antioxydant. Cependant, ce système de défense est parfois dépassé, surtout quand les agressions sont multipliées sous l'effet des radicaux libres endogènes et exogènes.

II.1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [80].

II.2. Les radicaux libres

Un radical libre est définies comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés [81], cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaine débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre [82].

II.3. Les espèces réactives de l'oxygène

Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($\bullet OH$), le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) [83].

II.4. Les antioxydants

Dans les systèmes biologiques, un antioxydant est une substance qui, en faible concentration comparativement à la quantité des substances oxydables telles les espèces oxygénées réactives (ERO), retarde significativement ou prévient l'oxydation des substrats comme les lipides, les protéines, les DNA et les carbohydrates. Son rôle est d'intercepter les radicaux libres avant qu'ils ne réagissent avec le substrat [84].

Les antioxydants incluent le système de réparation, les enzymes antioxydantes, les facteurs affectant l'homéostasie vasculaire, le signal de la transduction et l'expression des gènes. Les antioxydants empêchent globalement l'apparition du stress oxydatif [84].

Les antioxydants les plus connus sont : l'acide ascorbique (vitamine C), la vitamine E, les polyphénols, les caroténoïdes [85], ...

a. Les antioxydants endogènes

Sont capables soit de maintenir les espèces réactives de l'oxygène à des concentrations quasi stationnaires soit de piéger ces espèces (antioxydants non enzymatiques).

b. Les antioxydants naturels

La vitamine E : capable d'une part de piéger chimiquement l'oxygène singulet (O_2) en s'oxydant en quinone, d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle (OH).

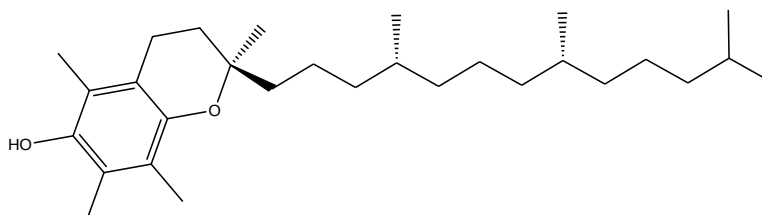


Figure III.1 : Structure de la vitamine E

La vitamine C : c'est un piègeur très efficace des anions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène singulet.

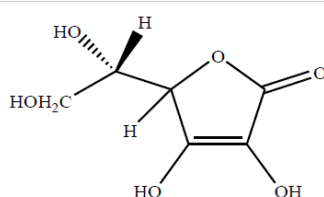


Figure III.2 : Structure de la vitamine C

Les caroténoïdes : leur rôle protecteur dans le système biologique implique la désactivation des espèces électroniquement activées tel l'oxygène singulet O_2 et la désactivation d'espèces chimiques réactives telles les radicaux peroxydes $ROO\cdot$ et alkyles

R', qui peuvent être générés à l'intérieur des cellules et occasionner des dommages oxydatifs.

Le Zinc : le zinc joue un rôle antioxydant indirect en assurant la stabilisation de Cu-ZnOD, cependant il possède d'autres propriétés anti oxydantes dont le mécanisme précis est encore incomplètement connu.

Le Sélénium : joue un rôle dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire, le maintien de l'intégrité membranaire réduit la probabilité de propagation de lésions oxydative à des biomolécules [86].

II.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante. Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un composé sont regroupées selon leur principe :

➤ Evaluation de produits résultant de l'oxydation

Comme exemples nous avons l'évaluation des peroxydes et le dosage d'hydroperoxydes.

➤ Evaluation de l'aptitude du composé à piéger des radicaux libres

La capacité du produit à piéger les radicaux libres implique la création de radicaux.

Nous citons la méthode du radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)[87], méthode d'ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)[88], méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants)[89]...

II.6. Activité antioxydante des coumarines

Comme tout composé phénolique, les coumarines, de différents types, possèdent des propriétés très diverses. Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes [90].

Plusieurs coumarines simples, ou fusionnées à des chalcones ou à des benzodiazepines..., ont montré une activité antioxydante nettement supérieure ou similaire à celle de la vitamine E ou de la vitamine C [91,92].

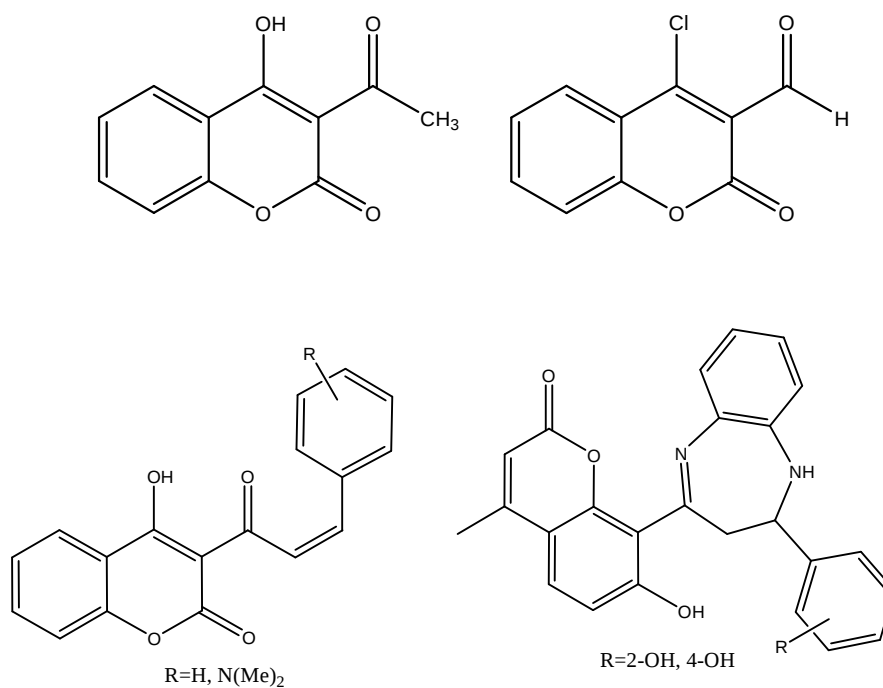


Figure III.3 : Quelques coumarines simples ou fusionnées, à activité antioxydante.

Partie expérimentale

I. Activité antibactérienne

I.1. Choix et origines des souches microbiennes testées

Le choix des bactéries a été porté sur quatre souches fréquentes en pathologie humaine.

- ✓ Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.
- ✓ Bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.

- ***Escherichia coli* ATCC 25922** (bacille à Gram négatif)

Commensal du tube digestif, est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales [93].

- ***Klebsiella pneumoniae* ATCC700603** (Gram négatif)

Commensal du tube digestif et des voies aériennes supérieures. Germe opportuniste impliqué dans des infections nosocomiales, généralement des infections urinaires, des pneumopathies, des septicémies et de la méningite [94].

- ***Staphylococcus aureus* 43300** (Cocci à Gram positif)

Nommée aussi staphylocoque doré, tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales [95].

- ***Bacillus cereus* ATCC 10876** (Gram positif)

Un agent pathogène humain opportuniste qui est parfois associée à des infections, provoque des maladies parodontales et d'autres infections plus graves [96].

Les souches bactériennes sélectionnées sont des souches hospitalières. Elles nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie UMMTO et ont été conservées à 5°C dans des boîtes de Pétri à (gélose nutritive).

L'eau distillée, les milieux de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) ont été stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

I.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne nous avons abordés deux méthodes :

I .2.a. Méthode de diffusion de disques sur milieu solide

Cette méthode qualitative est réalisée sur toutes les souches bactériennes pour déterminer les produits actifs par apparition de zones d'inhibitions [76].

➤ Réalisation de l'antibiogramme

1. Préparation de pré-culture

La réactivation des souches a été effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu BHIB après incubation pendant 24h à 37°C. Un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (GN) puis incubées à 37°C pendant 18 à 24h (figure III.4).



Figure III.4: Développement des souches bactérienne dans les boîtes de pétri après incubation pendant 24h.

2. Préparation de la suspension bactérienne ou de l'inoculum

La méthode de culture peut aussi être utilisée pour préparer l'inoculum. Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. Racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à une DO de 0.08 à 0.10 réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

3. Préparation des échantillons ou produits testés

Les échantillons ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) afin de préparer une concentration de 10 mg/ml pour chaque produit de structure suivante :

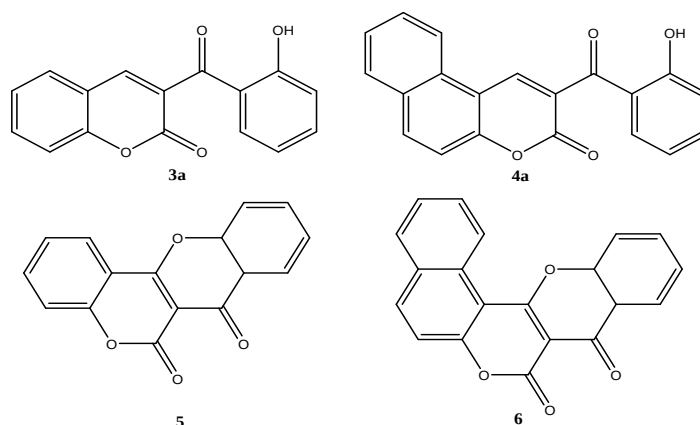


Figure III.5 : Structure des produits testés.

4. Ensemencement et dépôt de disques

Couler aseptiquement le milieu de culture Muller Hinton en surfusion dans des boîtes de Pétri de 15ml. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse. L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur les mêmes boîtes de Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

- Les disques imprégnés de 20µl de produit sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats de nos produits, qui sont : Augmentin Aug (30µg), Acide Nalidixique NA (30µg) et Cefoxitine FOX (30µg).

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

5. Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes se fait par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques. La sensibilité aux différents produits est classée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit [76]:

- Non sensible (-) pour le diamètre moins de 8 mm ;

- Sensible (+) pour un diamètre entre 9 à 14 mm;
- Très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour le diamètre plus que 20 mm.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau III.1: Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des produits 3a, 4a, 5 et 6 ainsi que les antibiotiques de référence Augmentin, acide Nalidixique et Cefoxitine.

produit Souche	Diamètre de la zone d'inhibition des produits de synthèse (mm).				Diamètre de la zone d'inhibition des antibiotiques de référence (mm).		
	3a	4a	5	6	NA	FOX	Aug
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	25±0.2	28±0.5	20±1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	-	-	-	16±0.1	20±0.1	14±0.1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	20±0.3	-	-	-	10±0.3	45±0.2	40±0.2
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	28±0.7	-	-	-	21±0.7	14±0.5	13±0.6

(-): Pas d'inhibition.

Comme le montre le tableau III.1 et la figure III.6, les souches bactériennes se comportent différemment vis-à-vis des produits testés.

En effet, les bactéries à gram négatif *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* se sont révélées résistantes à tous les produits testés. Les deux autres souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* ne présentent aucune sensibilité aux produits 4a, 5 et 6.

Seul, le produit 3a montre une forte activité contre les bactéries à gram positif *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* avec des diamètres de 20 et 28 mm respectivement.

En comparant ce résultat avec ceux des trois antibiotiques testés, des zones d'inhibitions comprises entre 10 et 45mm et entre 13 et 21mm pour les souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* respectivement, nous pouvons conclure que ces deux dernières sont extrêmement sensibles au produit 3a avec une zone d'inhibition nettement supérieure telles illustrées dans la figure III.7.

Nous remarquons ainsi clairement, que la présence du groupement hydroxyle dans les molécules de structure ouverte (**3a** et **4a**) joue un rôle major dans ce test, mais cet effet est désactivé par le deuxième benzène de la coumarine du produit **4a**. Contrairement aux produits de structure fermée (**5** et **6**) qui ne présentent aucune sensibilité aux micro-organismes testés.

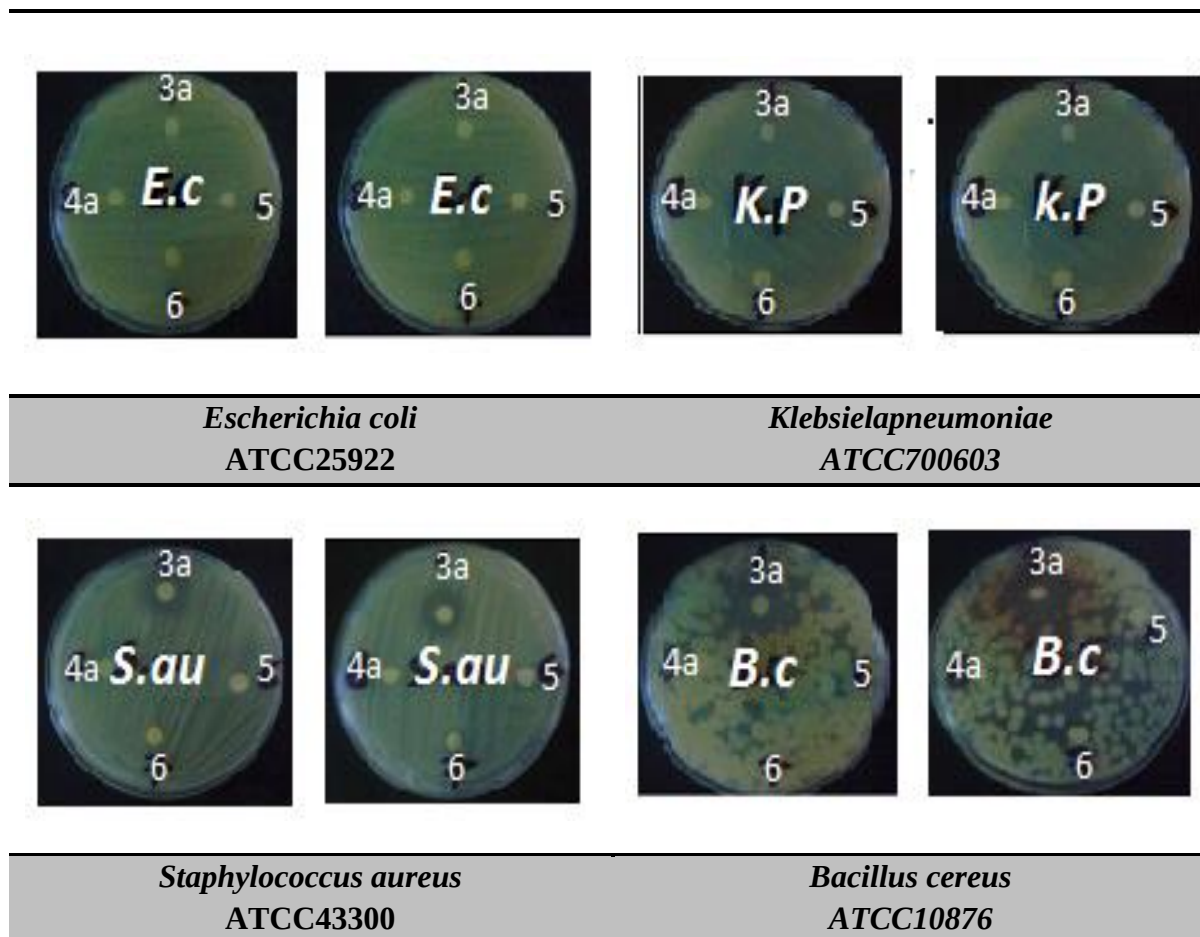


Figure III.6 : Effet des produits testés sur les souches bactériennes.

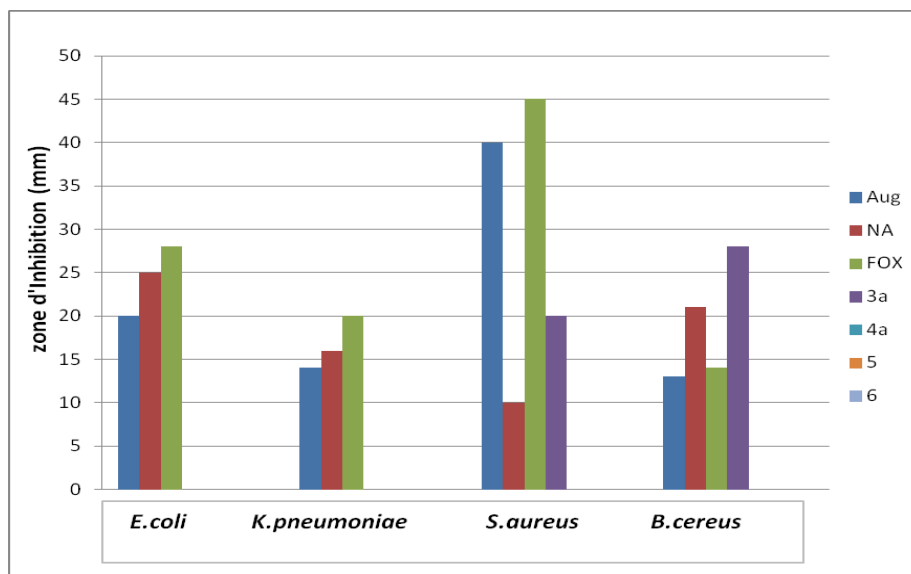


Figure III.7: Diamètres des zones d'inhibition des produits ainsi que les antibiotiques de référence Augmentin, acide Nalidixique et Cefoxitine.

I .2.b. Méthode des dilutions :

Les produits qui semblaient être actifs, résultats révélés par l'apparition de zones d'inhibitions, font l'objet d'une évaluation de leurs activités par la méthode de dilutions pour l'étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

1. Préparation de l'inoculum :

L'inoculum a été préparé de même façon que précédemment pour avoir une D.O (0.08-0.1) pour les deux souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

2. Préparation de la solution A :

Dans un tube à essai on met 9 ml de milieu de culture BHIB liquide plus 1 ml de la suspension bactérienne avec une D.O (0.08-0.1).

3. Préparation des échantillons

Les dilutions sont préparées à partir de la solution mère du produit **3a** à 10mg/ml en faisant des dilutions de demi pour avoir des concentrations de 5 ; 2,5 et 1,25 mg/ml dans le DMSO.

4. Préparation des tubes eppendorfs

Dans chaque tube eppendorf nous mettons 0.5 ml de la solution A auquel nous ajoutons 20µl de chaque échantillon, agiter bien le mélange et mettre à incubation pendant 24 heures à 37°C.

Témoin - : 0.5ml du milieu de culture BHIB plus 20µl de l'échantillon à tester.

Témoin + : 0.5ml de la solution A.

Agiter puis incuber pendant 24h à 37°C.

5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Nous avons déterminé les valeurs de CMI du produit **3a** pour les souches bactériennes, qui se sont montrées sensibles (20 - 28 mm) par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide, la lecture s'effectue à l'œil nu et résumé dans le tableau III.2 suivant.

Tableau III.2 : Résultats des CMI du composé 3a.

Dilutions Souches	Solution mère 10mg/ml	1 ^{ème} dilution 5 mg/ml	2 ^{ème} dilution 2.5 mg/ml	3 ^{ème} dilution 1.25 mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pas de trouble	Pas de trouble	Trouble	Trouble
<i>Bacillus cereus</i>	Pas de trouble	Trouble	Trouble	Trouble

En pratique après avoir observé la CMI, on considère tous les tubes de dilutions décroissantes en allant vers la plus faible non inhibitrices.

Aligiannis et ses collaborateurs [97] ont proposés une classification sur la base des résultats des CMI, comme suit :

- forte inhibition : CMI inférieure à 500µg/ml ;
- inhibition modérée : CMI varie de 600 µg/ml à 1 500 µg/ml ;
- faible inhibition : CMI supérieure à 1 600 µg/ml.

Ainsi, selon cette classification, on constate une très faible inhibition pour notre produit dilué. Cependant la souche de *Staphylococcus aureus* s'est montrée plus sensible au produit avec une valeur de 5mg/ml contre une CMI de 10 mg/ml avec la souche *Bacillus cereus* malgré sa très forte activité dans le milieu solide (une zone d'inhibition de 28mm).

II. Evaluation du pouvoir antiradicalaire par la méthode de DPPH

II.1. Principe

DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH[•] est réduit en diphényle picrylhydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité de l'antioxydant à donner des protons [98]. On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



Où: **(AH)** représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH[•] (violet) pour le transformer en diphényle picrylhydrazine (jaune) [99].

Les produits testés (**3a**, **4a**, **5** et **6**) sont préparés à des concentrations de 10⁻¹mol/l puis dilués à un demi pour avoir des concentrations de 0,05 ; 0,025 et 0,0125 M dans le DMSO.

II.2. Mode opératoire

Un volume de 40µl, de chaque échantillon de chacune des concentrations 0.1, 0.05, 0.025 et 0.0125mol/l, est ajouté à 2ml d'une solution de radicaux DPPH[•] dissout dans l'éthanol. Le mélange est secoué énergétiquement et laissé pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance du DPPH[•] est déterminée par colorimétrie à 517nm.

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

L'évaluation de l'activité anti-oxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage d'inhibition selon la relation 1 suivante :

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

Avec : **A₀** : Absorbance à 517nm du standard (contient tous les éléments mais sans aucun échantillon).

A₁ : Absorbance à 517nm de l'échantillon. 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.

II.3. Résultats et discussion

➤ Les résultats obtenus par ce test sont représentés dans la figure III.8, qui représente la Densité Optique des produits testés ainsi que la référence, Acide Ascorbique, utilisé en fonction de la concentration.

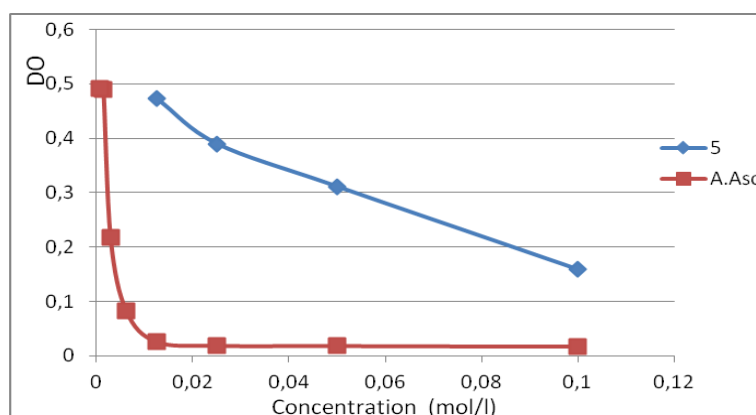


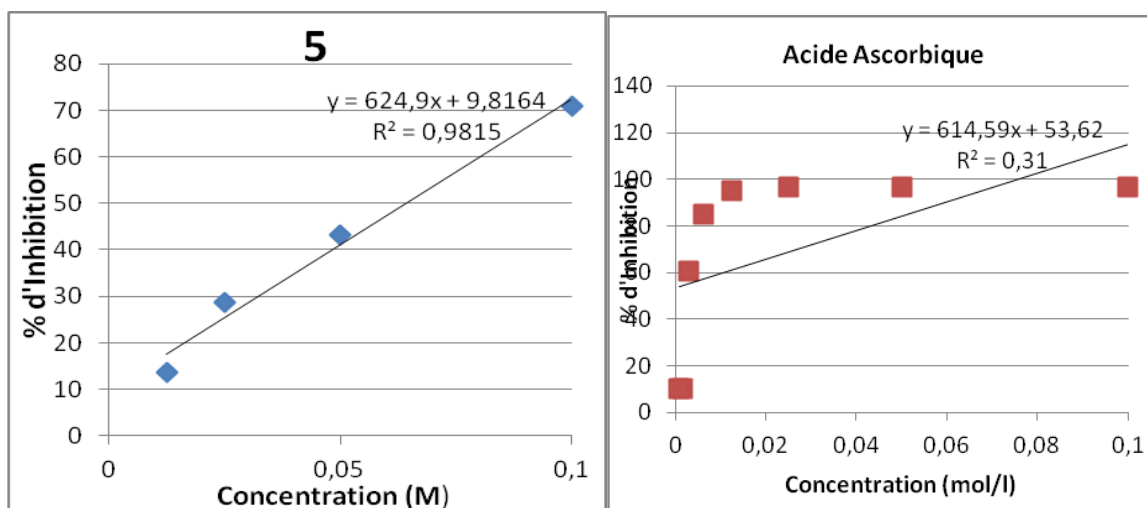
Figure III.8: Densité Optique en fonction de la Concentration

Cette représentation illustre bien que les produits **3a**, **4a** et **6** ne présentent aucune activité antioxydante envers le radical DPPH.

Le produit **5** s'avère le produit le plus actif de cette série de produits testés. En effet, à la plus grande concentration (0,1mol/l) il présente le pourcentage d'inhibition le plus important avec une valeur de 71%, un résultat pas très loin de l'acide ascorbique mais qui s'atténue rapidement au fur et à mesure que la concentration diminue (13% contre 95% de la référence). Les résultats sont calculés par la relation **1** et donnés dans le tableau III.3 et figure III.9.

Tableau III.3: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du produit 5 et de l'acide ascorbique.

% d'inhibition				
Dilutions Produit	Solution mère $10^{-1}M$	1 ^{ème} dilution $5 \times 10^{-2}M$	2 ^{ème} dilution $2.5 \times 10^{-2}M$	3 ^{ème} dilution $1.25 \times 10^{-2}M$
5	71	43,13	28,74	13,62
Acide Ascorbique	96,89	96,71	96,62	95,27

**Figure III.9:** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de l'acide ascorbique et du produit 5.

Il semble que, pour les produits **3a** et **4a**, de forme ouverte, la présence du groupement hydroxyle n'a aucun effet sur le pouvoir de piégeage du radical libre DPPH'.

Notons aussi que, l'addition d'un deuxième noyau benzénique (produit **6**) désactive la molécule dans ce test contrairement à la molécule **5** qui ne présente qu'un seul noyau benzénique.

➤ Les pourcentages du DPPH' résiduels en fonction des concentrations des échantillons, nous permettent d'obtenir la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration de DPPH' initiale à 50%. Cette valeur est appelée la concentration efficace EC50 et parfois notée IC50 (concentration inhibitrice minimale). Plus cette valeur d'EC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. La concentration inhibitrice

minimale (IC₅₀) est estimée par extrapolation à 50% d'inhibition en traçant la droite % inhibition en fonction de la concentration.

A ces concentrations utilisées (0.1, 0.05, 0.025 et 0.0125 M) nous n'avons pas pu déterminer la IC₅₀% de l'acide ascorbique, nous avons alors continué les dilutions à un demi jusqu'à 0.00078M.

Les résultats sont donnés dans le tableau III.4 et la figure III.10.

Tableau III.4: Valeur d'IC₅₀% du composé 5 et de l'acide ascorbique

Produit	IC 50% (mol/l)
5	0,064
Acide ascorbique	0,0034

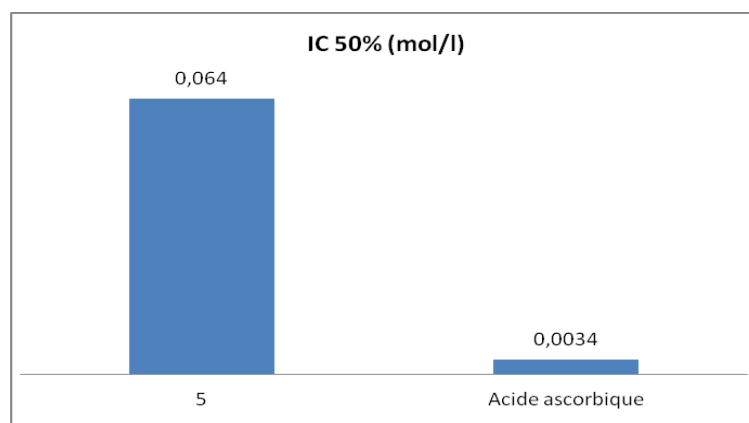


Figure III.10 : Valeur d'IC₅₀% du composé 5 et de l'acide ascorbique

Notons que, la IC₅₀% du produit 5 est de 0,064M et celle de l'Acide Ascorbique est de 0,0034M.

De là, nous pourrions conclure que le composé 5 possède une activité antioxydante mais très inférieure à l'activité de la référence utilisée (acide ascorbique).

III. Conclusion

Dans le cadre de ce travail, nous avons évalué l'activité biologique de quelques composés coumariniques synthétisés par l'étude de l'activité antibactérienne et antioxydante.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes. Selon la méthode de diffusion de disques, seul le composé **3a** possède une activité

antimicrobienne contre les souches à Gram positif contrairement aux souches à Gram négatif qui manifeste une résistance pour tous les produits testés.

Le produit **3a** qui semblait être actif a fait l'objet de la détermination de la CMI.

L'activité antioxydante de ces composés a été évaluée par la méthode de DPPH. Les résultats obtenus ont montré que la réduction de DPPH est enregistrée pour le composé **5** mais qui reste faible par rapport à la référence utilisée.

L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une partie dans la recherche de substances synthétiques biologiquement active.



Conclusion générale

Conclusion générale

Au terme de ce mémoire, le but que nous avons fixé, à savoir la maîtrise des méthodes de synthèse en chimie organique, a été atteint.

Les résultats essentiels obtenus ont été analysés comme suit :

Dans notre étude nous avons constaté, dans un premier temps, que la condensation de salicylaldéhyde ou du 2-hydroxynaphtaldéhyde avec la 4-hydroxycoumarine en présence de la triméthylamine comme catalyseur a donné des dérivés 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromèn-2-ones avec des rendements assez importants pour **3a** et **4a** respectivement et un dérivé dicoumarinique **3b**.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de la réaction d'iodination des produit **3a** et **4a** en utilisant NaI en présence de la chloramine T, dans le but de rechercher de nouveaux composés radiopharmaceutiques. Dans les conditions opératoires adoptées nous avons obtenu de nouvelles structures **5** et **6** par cyclisation intramoléculaire et l'iode n'a servit que comme catalyse. Pour cela nous avons procédé d'abord à l'iodation du salicylaldéhyde ensuite à la condensation de l'aldéhyde iodé avec la 4-hydroxycoumarine qui a donné la formation de deux composés **7a** et **7b**.

L'analyse physico-chimique (UV/visible, I.R, Pf, CCM) des produits synthétisés a montré que ces produits sont différent de **5** et **6**.

L'étude antibactérienne et anti oxydante des composés **3a**, **3b**, **5** et **6** a montré une bonne activité antibactérienne uniquement pour le composé **3a** contre toutes les bactéries à **Gram +** utilisées. Ce dernier a présenté une bonne activité contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, mais n'a aucune activité contre *Escherichia coli* et *Klebsseila pneumoniae* (bactérie à Gram -).

Le calcul de la CMI a montré une très faible inhibition pour **3a** après dilution. Cependant la souche de *Staphylococcus aureus* s'est montrée plus sensible au produit **3a** à une valeur concentration de 5mg/ml contre une CMI de 10 mg/ml avec la souche *Bacillus cereus* malgré sa très forte activité dans le milieu solide (une zone d'inhibition de 28mm).

Le test d'activité antioxydante en utilisant le radical DPPH[•] a montré que seul le composé **5** qui est actif.

Les nouveaux produits **7a** et **7b** feront l'objet d'une étude particulière. Ainsi pour la détermination de leur structure nous allons faire appel aux différentes techniques d'analyses (RMN ¹H et ¹³C et masse).

L'activité biologiques des coumarines **7a** et **7b** n'est pas encore connue, nous aurons donc à rechercher ultérieurement leurs activités biologiques.

Ce travail fera donc l'objet d'une publication internationale après avoir réalisé et compléter toutes les autres analyses spectroscopiques en RMN du proton et du carbone-13 ainsi que la spectrométrie de masse.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] P. Arnaud, B. Jamart, J. Bodiguel, N. Brosse, Chim. Org. Cours. 17^e Ed. 2004.
- [2] L. Wu, X. Wang, W. Xu, F. Farzaneh, R. Xu. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives Curr. Med. Chem., 16, 4236–4260, (2009).
- [3] Tebakh Chabha, Imerzoukene Fadhela. Synthèse et caractérisation de quelques molécules anticoagulante dérivées de la coumarine. Master: Chimie pharmaceutique: UMMTO, (2009).
- [4] Mead, J.A.R., Smith, J.M. et Williams, R.T., The Metabolism of Hydroxycoumarins. J.Biochem, 68, 61-67, (1958)..
- [5] Macek, K. Pharmaceutical application of Thin-Layer and Paper Chromatography, New York (1972).
- [6] Harbone, J.B. Phytochemical Methods. A Guide to modern Techniques of Plant analysis, second edition (1984).
- [7] Wagner, H., Bladt, S et Zgainski, E.M. Plant Drug Analysis, springer, Berlin (1984).
- [8] Bruneton, J. Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes médicinales, 3^e Edition, Tec et Doc, Paris (1999).
- [9] Prachyawarakorn, V., Mahidol, C et Ruchirawat, S. Pyranocoumarins from the twigs of *Mammea siamensis*. Phytochemistry, 67, 924-928, (2006).
- [10] Kostova, I., Momekov, G et Stancheva, P. New Samarium (III), Gadolinium (III), and Dysprosium (III) Complexes of Coumarin-3-Carboxylic Acid as Antiproliferative Agents. Metal-Based Drugs, 10, 1-8, (2007).
- [11] Hamimed Souad, Mémoire de Magistère, U. Constantine, (2009)
- [12] Abu, E.R.A et El-Tawil, B.A., The electronic absorption spectra of some coumarins. A molecular orbital treatment, Can.J.Chem, 63, 1173-1178, (1985).
- [13] Shults, E.E., Petrova, T.N., Shakirov, M.M., Chernyak, E.I., Pokrovskiy, L.M., Nekhoroshev, S.A et Tolstikov, G.A., Coumarin Compounds from Roots of *Peucedanum morisonii* Bess.). Chemistry for Sustainable Development, 11, 649-654, (2003).
- [14] Sariaslani, S.F et Rosazza, J.P. Novel Biotransformations of 7-thoxycoumarin by *Streptomyces griseus*. Applied and Environmental Microbiology, Aug, 46, 468-474, (1983).
- [15] Lalande, J et Parenty, A. Synthèse d'une coumarine. L'actualité chimique, 16, 27-30, (2003).
- [16] Tosun, A., Ozkal, N., Baba, M et Okuyama, T. Pyranocoumarins from *Seseli gymmiferum* subsp. *Corymbosum* Growing in Turkey. Turk J Chem, 29, 327-334, (2005).
- [17] Xiao, W.L., Li, S.H., Shen, Y.H., Niu, X.M et Sun, H.D. Two New Coumarin Glucosides from the Roots of *Angelica apaensis* and Their Anti-Platelet Aggregation Activity. Arch Pharm Res, 30, 799-802, (2007).
- [18] Widodo, G.P., Sukrasno, S.E.Y et Adnyna, I.K. A coumarin from *Ageratum Leaves* (*Ageratum conyzoides* L.). International Journal of Pharmacology, 4, 56-59, (2007).
- [19] Bruneton J ;(pharmacognosie photochimie plantes médicinales). 2^{ème} edition, Paris (1999).
- [20] Hoult JR, Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. Gen Pharmacol, 27(4):713-22, (1996).
- [21] Bruneton J. Coumarines. Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes médicinales. Tec & Doc ed. p 263-278 (1999).
- [22] Barnard, D.L., Xu, Z.Q., Stowell, V.D., Yuan, H., Smee, D.F., Samy, R., Sidwell, R.W., Nielsen, M.K., Sun, L., Cao, H., Li, A., Quint, C., Deignan, J., Crabb, J et Flavin, M.T. Coumarins and pyranocoumarins, potential novel pharmacophores for inhibition of measles virus replication. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 13, 39–59, (2002).
- [23] Kostova, I. Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents. Curr.Med. Chem.-Anti-Cancer Agents, 5, 29-46, (2005).

- [24] Sarker, S.D., Nahar, L., Rahman, M.N., Siakalima, M et Kumarasamy, Y. Bioactivity of umbelliprenin, the major component found in the seeds of *Angelica sylvestris*. *Ars Pharm*, 46, 35-41, (2005).
- [25] Kostova, I., Raleva, S., Genova, P et Argirova, R. Structure Activity Relationships of Synthetic Coumarins as HIV-1 Inhibitors. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 68274, 1-9, (2006).
- [26] Ochocka R.J., Rajzer D., Kowalski., Lamparczyk H. Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. By capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 709, 197-202, (1995).
- [27] Taguchi G., Fujikawa S., Yazawa T., Kodaira R., Hayashida N., Shimosaka M., Okazaki M., Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Science*, 151, 153-161, (2000).
- [28] Ojala T., Rames S., Haansu P., Vuorela H., Hiltunen R., Haahtela K., Vuerela P. Antimicrobial activity of some coumarin containing hebal plants growing in finland. *Journal of Enthopharmacology*, 2000, 73, 299-305, (2000).
- [29] Chen C.N., Weng M.S., Wu C., Lin J.k., 2004 .Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanosoma cells. *Food Chemistry*, 1(2), 175-185, (2004).
- [30] Khan I., Kulkari M.V., Gopal M., Shahabuddin. Synthesis and biological evaluation of novel angular fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15, 3584-3587, (2005).
- [31] Thati B., Noble A., Rowan R., Creaven S.B., Walsh M., Egan d., Kavanagh K., Mechanism of action of coumarin and silver coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in vitro*, 21, 801-808, (2007).
- [32] Stefanova T., Nikolova N., Michailova A., Mitov I., Iancovii., Zlabinger g.I., Neychev H. Enhanced resistance to *Salmonella enteric sero var typhimurium* infection in mice after coumarin treatment. *Microbes and infection*.2007, 9: 7-14.
- [33] O'NEAL MA, GRIFFIN AC. *Cancer Res.* 17(9), 911-6, (1957).
- [34] Anderson C.M., Hallberg A., Hogberg T. Advances in the developpement of pharmaceutical antioxidant drug. *Food Chem*, 28, 65-180, (1996).
- [35] Hu S.G., Li L., He X.W. Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1062, 31-37, (2005).
- [36] Bruneton J. *Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales*. 2eme edition Tec et Doc (Ed). Paris, p 914, (1993).
- [37] Cottiglia F., Loy G.,Garan D., Floris C., Casu M., Pompei R., Bonsignore L. Antimicribial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedecine*, 8(4), 302-305, (2001).
- [38] Laure F. Etude de la composition chimique et de la biodiversité du *Calophylum urophyllum* de Polynésie française. Thèse de Doctorat, Nice., p 373 (2005).
- [39] Redoyal L.M., Beltram M., Sauchor., Olmedo D.A. *Bioorganic and medicinal chemistry Letters*. *Fitoterapia*, 15, 4447-4450, (2005).
- [40] Veselovsskaya M.V., Garzed M.M., vinogradova V.I., Khilia P.V. Modified coumarins furocoumarin derivatives of cytisin. *Chemistry of Natural Compound*, 42(3), 277-280, (2006).
- [41] Schorderet M., 1992. *Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques.*, OPU, Alger, p918, (1992).
- [42] Repcak M., Imrich J., Fanekova M. Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L) Rauschert. *Plant Physiol.*, 158, 1085, 1087, (2001).

- [43] WH.Perkin. J. Chem., Soc., 21, (1868).
- [44] Hv.Pechmann. J. Chem., Soc., 17, 929, (1884).
- [45] E Knoevenagel. Biochem., 31, 2596, (1898).
- [46] EC. Horning, MG. Horning, DA. Dimmig. Org Synth., 3, 165, (1955).
- [47] Pochet L, Doucet C, Schynts M, Thierry N, Boggetto N, Pirotte B, Jiang KY, Masereel B, de Tullio P, Delarge J, Reboud-Ravaux M. Esters and amides of 6- (chloromethyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid as inhibitors of alpha-chymotrypsin: significance of the "aromatic" nature of the novel estertype coumarin for strong inhibitory activity. J Med Chem., 39(13), 2579-85, (1996).
- [48] Doucet C, Pochet L, Thierry N, Pirotte B, Delarge J, Reboud-Ravaux M. 6- Substituted 2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid as a core structure for specific inhibitors of human leukocyte elastase. J Med Chem., 42(20), 4161-71, (1999).
- [49] Pochet L, Doucet C, Dive G, Wouters J, Masereel B, Reboud-Ravaux M, Pirotte B. Coumarinic derivatives as mechanism-based inhibitors of alphachymotrypsin and human leukocyte elastase. Bioorg Med Chem , 8(6), 1489- 501, (2000).
- [50] Kempen I, Hemmer M, Counerotte S, Pochet L, de Tullio P, Foidart JM, Blacher S, Noel A, Frankenne F, Pirotte B. 6-Substituted 2-oxo-2H-1-benzopyran- 3-carboxylic acid derivatives in a new approach of the treatment of cancer cell invasion and metastasis. Eur J Med Chem, 43(12), 2735-50, (2008).
- [51] G. H. Jones, J. B. D. Mackenzie, A. Robertson, W. B. Whalley. "The Chemistry of Fungi. Part 11. Derivatives of 3 : 4-Dimethoxyphenol." J. Chem. Soc., 562-569, (1949).
- [52] A. Ogawa, K. Kondo, S. Murai, N. Sonoda. "Selenium-assisted Carbonylation of o-Hydroxyacetophenone with Carbon Monoxide." J. Chem. Soc. Chem. Commun., 21, 1283-1284, (1982).
- [53] J. Jung, J. Kim, O. Park. "Simple and Cost Effective Syntheses of "4 Hydroxycoumarin." Synth. Commun., 29, 3587-3595, (1999).
- [54] Fylaktakidou K. C., Hadjipavlou-Litina D. J., Litinas K. E., Nicolaides D. N. Natural and synthetic coumarin derivatives with antiinflammatory / antioxidant activities. Curr. Pharm. Design., 10, 3813-3833, (2004).
- [55] Bosignore L., Cottiglia F., Elkhaili H., et al. Synthesis and antimicrobial activity of coumarin 7 substituted cefalosporins and sulphones, Farmaco, 30, 425-430, (1998).
- [56] Crowther M.A., Ginsberg J.S., Julian J., et al. Comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. N. Engl. J. Med, 2003, 18, 1133-1138, (2003).
- [57] Hahm H.A., Armstrong D. K., Chen T.L., et al. Novobiocin in combination with highdose chemotherapy for the treatment of advanced breast cancer: A Phase 2 study. Biol. Blood Marrow Transplant, 6, 335-343, (2000).
- [58] Sardari S., Mori Y., Horita K., et al. Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. Bioorg. Med. Chem, 7, 1933-1937, (1999).
- [59] Zhao H., Neamati N., Hong H., et al. Coumarin-based inhibitors of HIV integrase, J. Med. Chem, 40, 243-249, (1997).
- [60] Mazumder A., Wang S., Neamati N., Nicklaus M., et al. Antiretroviral agents as inhibitors of both human immunodeficiency virus type 1 integrase and protease. J. Med. Chem, 39; 2472-2481, (1996).
- [61] Aoife L., O'Kenedy R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. Curr. Pharm. Design, 10, 3797- 3811, (2004).
- [62] W. R. Sullivan, C. F Huebner, M. A. Stahmann and K. P. Link, J.Am. Chem. Soc , 65, 2288-2290, (1943).

- [63] J. Ribolleau, C.Deschamps-Vallet, D. Molho and C. Mentzer, Bull. Soc. Chim France, 3138, (1970).
- [64] Y. Rachedi, M. Hamdi, V. Spéziale, Synth. Commun, 1990, 20(18), 2827-2836. (26)-M. Moréno-Manas, R. Pleixats. Synthesis, 430 (1984).
- [65] P. De March, M. Moréno-Manas, R. Pleixats and J. L. Roca, J. Heterocyclic. Chem, 21, 1371 (1984).
- [66] J. Cervello, M. Gil, P. de March, J. Marquet, M. Moréno-Manas, J. L. Roca and F. Sanchez-Ferrando, J. Chem. Tetrahedron, vol. 43 N°. 10, pp. 2381-2387 (1987).
- [67] M. Makhoulfi-Chebli, M. Hamdi, A. M. S. Silva, F. Balegroune, J. Sos. Alger. Chim, 18 (1), 91-10, (2008).
- [68] Ayache Hayat; Saidi Lynda. Conception, Synthèse et Évaluation par UV-VISIBLE et Fluorescence de Dérivés Coumariniques en tant que SondesMaster: Chimie pharmaceutique:UMMTO, 2014.
- [69] Nguyen Tien Cong, Tran Thi Duong, Nguyen Anh Tien, UDC 547.814.1, (2014)
- [70] (a) Billing J., Sherman P. W., Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot? Q. Rev. Biol., 73, 3-49, (1998). (b) Nicolas M., Daniel C., Activités technologique en microbiologie-Technique de base et méthodologie, CRDP D'aquitaine- Bordeaux, 152, (1998).
- [71] Cowan M. M., Plant Products as Antimicrobial Agents, Clin. Microbiol. Rev., 12, 564-582, (1999).
- [72] Derety E., J. Mol. Structre. (Theochem), (1999).
- [73] Mompon B., Lemaire B., Mengal P., Surbled M., Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle, Ed. INRA, Paris (les Colloques, N° 87), (1998).
- [74] Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul. F., Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif, Phytothérapie, 1, 3-6, (2004).
- [75] Pineo G.F., Hull R.D., Adverse effects of coumarin anticoagulants, Drug Saf, 9 (4), 263-71, (1993).
- [76] Choi Y.M et al, Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. LWT, 39, 756-761, (2006).
- [77] Harrar A., Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Rhamnus alaternus L, mémoire de magistère, Sétif, 29-30, (2012).
- [78] Le Cren F., Les antioxydants, la révolution du XXI^e siècle, 2^{ème} édition, (2004).
- [79] Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., Antioxidants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited, (2001).
- [80] Boyd B. et al, Ford C. Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. Glycoscience& Nutrition, 4 (6), 7, (2003).
- [81] Jacques B., André R., Biochimie métabolique Ed ellipses, Paris, 217-225, (2004).
- [82] Martinez-Cayuela M., Oxygen free radicals and human disease, Biochem, 77, 147-161, (1995).
- [83] Gutteridge J.M., Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence, Free Radic. Res. Commun, 19, 141-158, (1993).
- [84] Tiwari A. K., Antioxidants: New-generation therapeutic base for polygenic disorders, Curr. Sci., 86 (8), 1092-1102, (2004).
- [85] Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. Z., Jore D. D., Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique, 91-96, (2003).
- [86] Delattre J., beauddeux J. L., Bonnfont Rousselot D., Radicaux libres et stress oxydant, aspect biologique et pathologique, Edition Tec et Dct Lavoisier, (2005).
- [87] Ammar R. B., Bhouri W., Sghaier M. B., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlef I., Kilani S., Mariotte A. M., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M. G. D., Ghedira K., Antioxidant

and freeradical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L.(Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study, *Food Chem.*, , 116, 258-264, (2009).

[88] Attou A., Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent, 47, (2011).

[89] Benzie I. F. F., Strain, J. J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76, (1996).

[90] Madhavi D.L. et al, *Food antioxidants*, Ed: CRC PRESS, 361- 460, (1996).

[91] Al-Ayed A. S., Synthesis of New Substituted Chromen [4,3-c]pyrazol-4-ones and Their Antioxidant Activities *Molecules*, 16, 10292-10302, (2011).

[92] Patil R. B, Sawant S. D., Reddy K. V., Shirsat M., Synthesis, Docking Studies and Evaluation of Antioxidant Activity of Some Chromenone Derivatives, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6 (2), 381 -391, (2015).

[93] Percival S.L., *Microbiology of waterborne diseases*, Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, p. 480, (2004).

[94] Tsai S.S., et col., Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia in Community-acquired and Nosocomial Infections in Diabetic Patients, (2010).

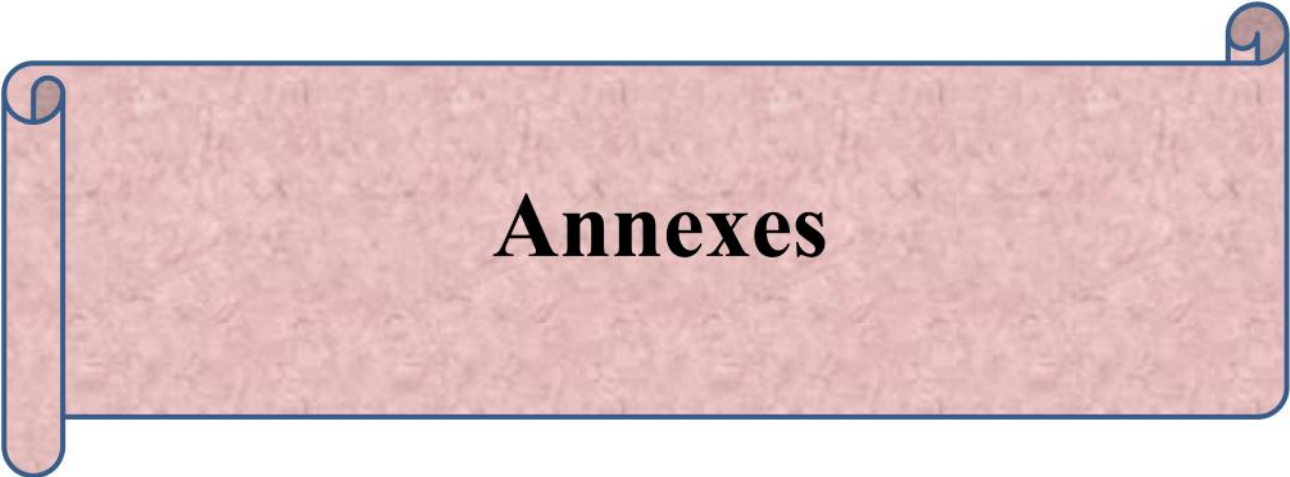
[95] Dworkin M.M., Falkow S., *Proteobacteria: Gamma subclass*, Ed. Springer, *Chang Gung Med J*, 33(5), 533, (2005).

[96] Hoffmaster A., et col., Characterization of *Bacillus cereus* Isolates Associated with Fatal Pneumonias: Strains Are Closely Related to *Bacillus anthracis* and Harbor *B. anthracis* Virulence, *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3352-3360, (2006).

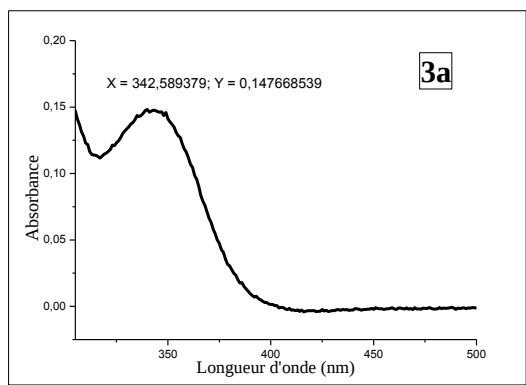
[97] Aligiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S., Chinou I. B., Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species, *J. Agric, Food Chem*, 40, 4168-4170, (2001).

[98] Sanchez-Moreno C., Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Int. J. of Foods Sci. Tech*, 8, 121-137, (2002).

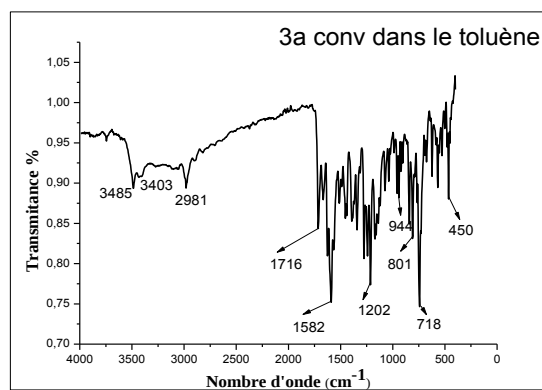
[99] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm.Wiss. Technol*, 28, 25-30, (1995).



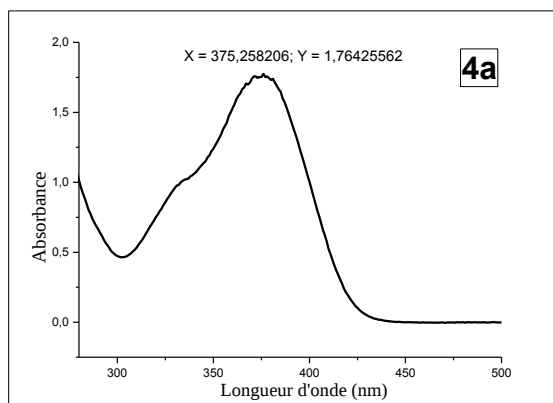
Annexes



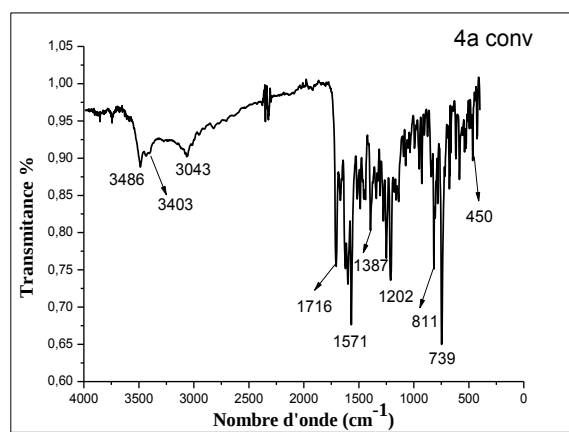
Spectre UV/vis du composé (3a) dans le chloroforme



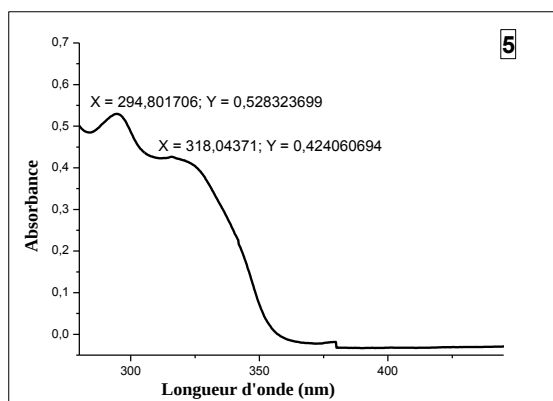
Spectre IR du composé 3a



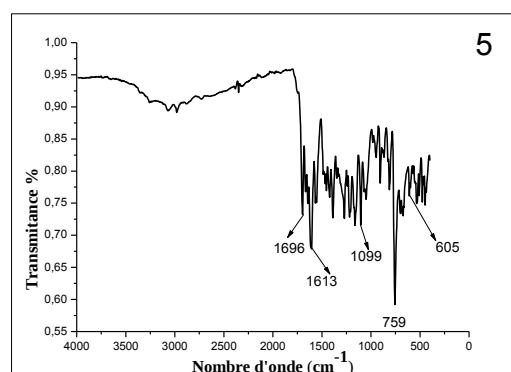
Spectre UV/vis du composé (4a) dans le chloroforme



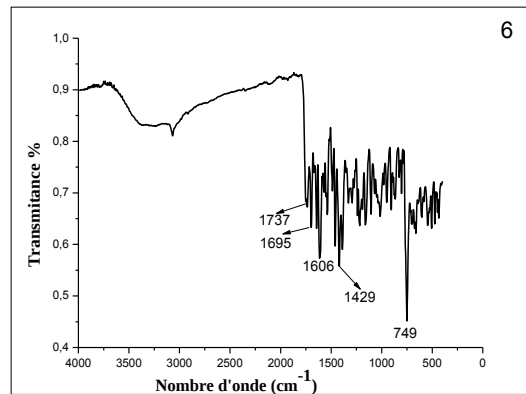
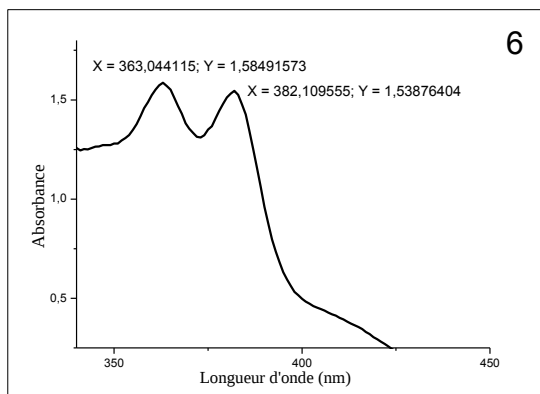
Spectre IR du composé 4a



Spectre UV/vis du composé (5) dans le chloroforme

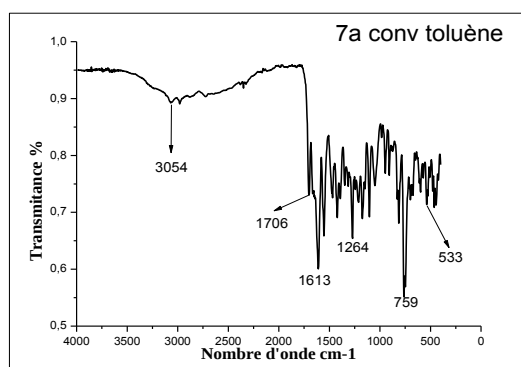
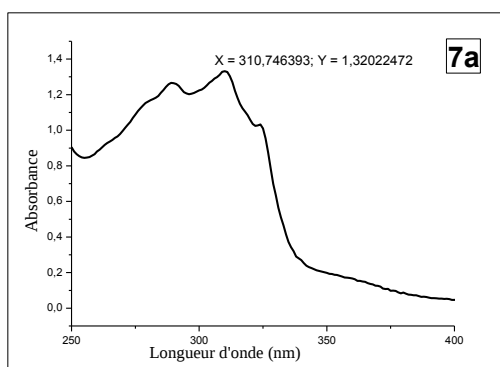


Spectre IR du composé 5



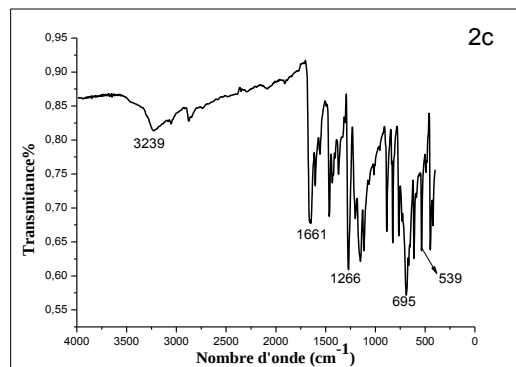
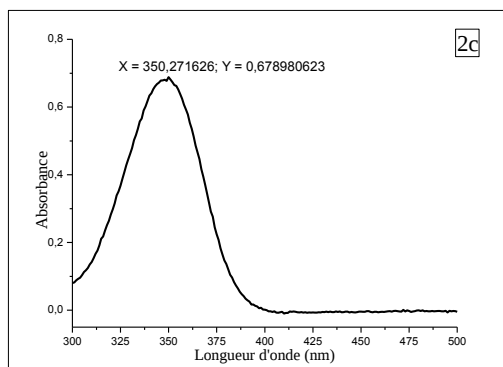
Spectre UV/vis du composé (6) dans le chloroforme

Spectre IR du composé 6



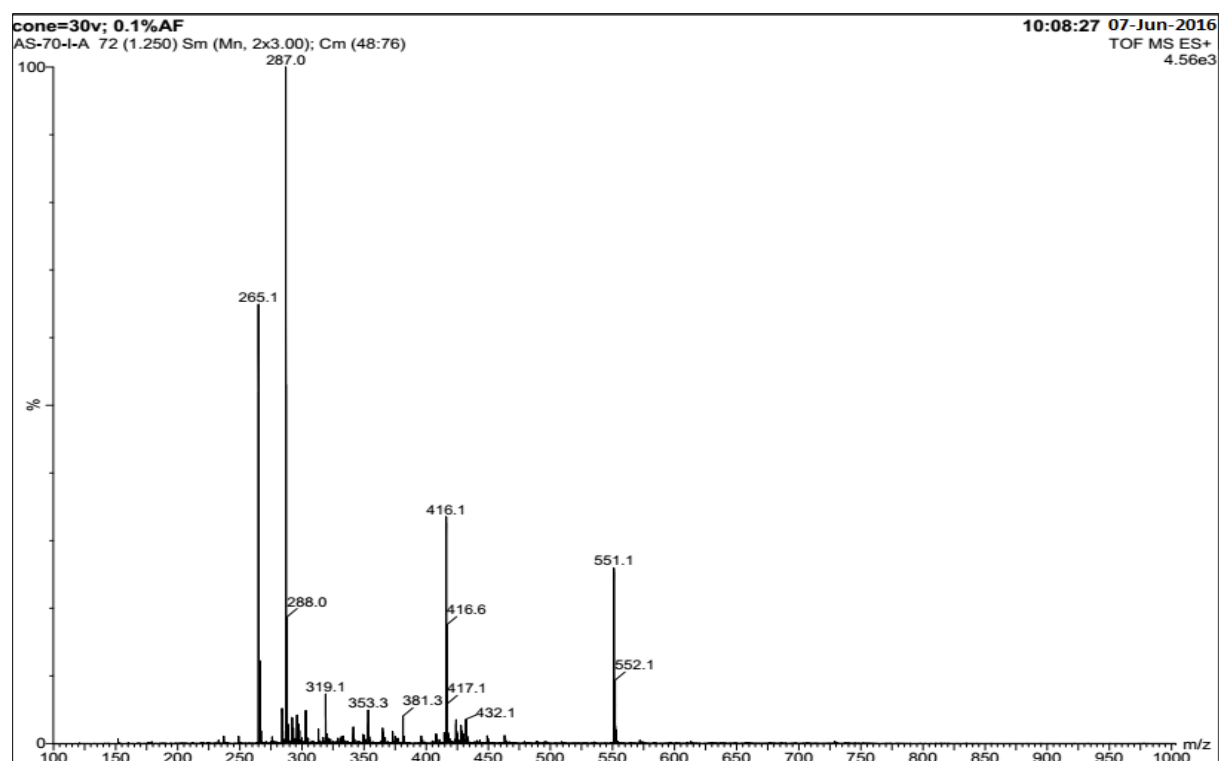
Spectre UV/vis du composé (7a) dans le chloroforme

Spectre IR du composé 7a

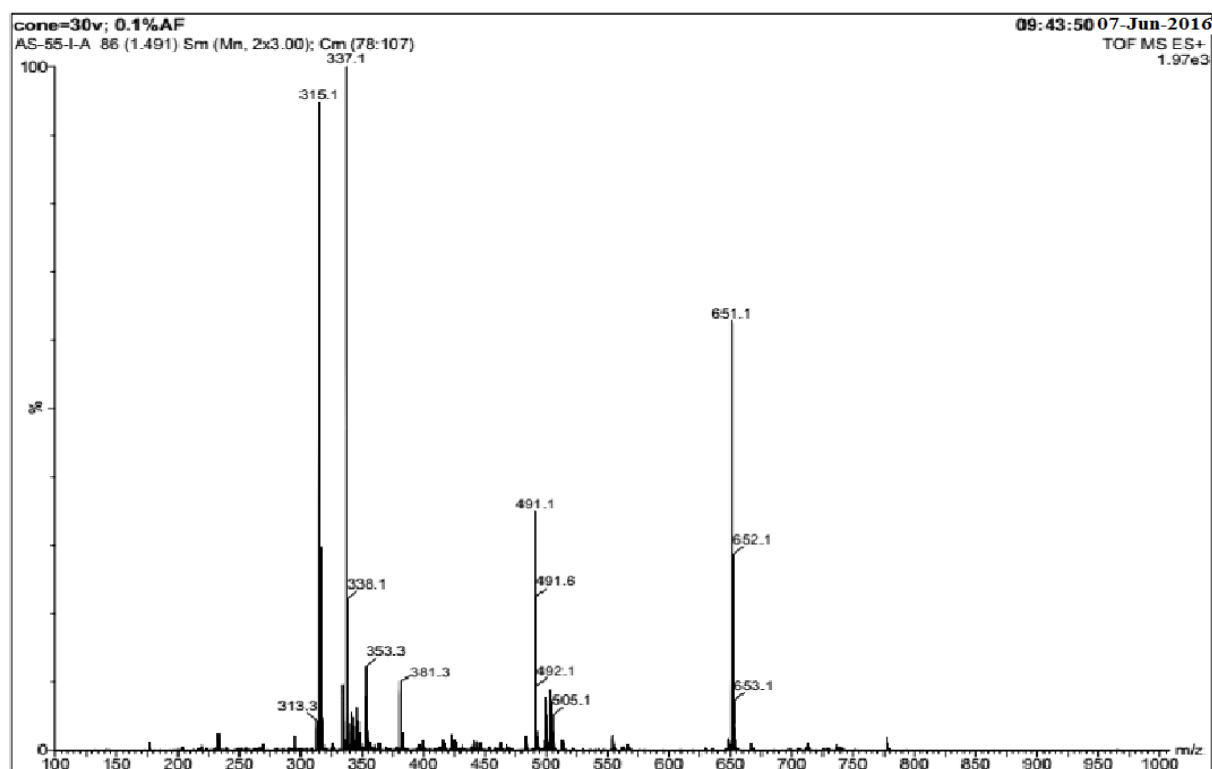


Spectre UV/vis du composé (2c) dans le chloroforme

Spectre IR du composé 2c



Spectre de masse du composé 5



Spectre de masse du composé 6