

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERI, TIZI-OUZOU

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE CHIMIE



THÈSE DE DOCTORAT 3^{ème} CYCLE LMD

Filière : **CHIMIE**

Spécialité: **Chimie des Matériaux et de l'Environnement**

Présentée par :

M^{me} Sabrina HALIT

Sujet :

**Conception, synthèse et évaluation biologique de
composés hétérocycliques azotés et oxygénés**

Devant le jury d'examen composé de :

Mme. Leila DERMECHE	Professeure	UMMTO	Présidente
Mme. Malika MAKHLOUFI-CHEBLI	Professeure	UMMTO	Rapporteur
Mme. Amina BENAZZOUZ-TOUAMI	MCA	UMMTO	Co- Rapporteur
Mme. Yamina AIT ABDESSELAM-ABDI	MCA	ENST, Alger	Examinatrice
Mme. Ouarda HOCINE-BENLOUNES	MCA	UMMTO	Examinatrice
Mr. Mohamed Ali BENMENSOUR	MCA	UMMTO	Examineur
Mme. Souhila BOUAZIZ-TERRACHET	Professeure	UMBB	Invitée

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Physique et Chimie des Matériaux (LPCM) de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou en collaboration avec le laboratoire de l'université de Reims. J'aimerais via ces quelques lignes remercier les personnes qui ont contribué au bon déroulement et à l'élaboration de cette thèse.

*Je voudrais tout d'abord exprimer ma profonde gratitude à Madame **CHEBLI** épouse **MAKHLOUFI Malika**, Professeure à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour m'avoir proposé ce sujet et de m'avoir accueillie au sein de son équipe. Je la remercie chaleureusement d'avoir encadré ce travail de thèse, avec beaucoup de compétence, d'enthousiasme et de disponibilité. Merci Madame pour vos conseils, votre optimisme et la confiance que vous m'avez accordée au cours de ces années. Vous avez su me donner, quand il le fallait, les clés pour conduire ce travail à son terme.*

*Je tiens à remercier également Madame **BENAZZOUZ** épouse **TOUAMI Amina**, Maître de conférences classe A à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, d'avoir accepté de prendre en charge le Co-encadrement de mes travaux de recherche. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour l'attention constante qu'elle a portée à mon travail, pour sa disponibilité. Ses qualités scientifiques et humaines, ses encouragements m'ont été précieux dans l'accomplissement de cette thèse.*

*J'exprime aussi mes vifs remerciements envers Monsieur **BEHR Jean-Bernard**, Professeur à l'université de Reims, ainsi que Mr **ROBERT Anthony**, Mme **MACHADO-RODRIGUEZ Carine** et Mme **MARTINEZ Agathe** pour leur implication dans l'analyse de mes produits et l'interprétation des résultats spectroscopiques.*

Mes remerciements vont également à:

*Madame **DERMECHE Leila**, Professeure à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, qui me fait le grand honneur de présider le jury de cette thèse.*

*Madame **BENLOUNES** épouse **HOCINE Ouarda**, Maître de conférences classe A à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Remerciements

*Madame **ABDI** épouse **AIT ABDESSELAM Yamina**, Maître de conférences classe A à L'ENST d'Alger, pour l'honneur qu'elle me fait d'accepter d'être membre de ce jury et de valoriser de sa précieuse présence ce travail.*

*Que Monsieur **Ali BENMENSOUR Mohamed**, Maître de conférences classe A à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, trouve ici mes sincères remerciements, Pour avoir accepté d'être membre de ce jury et d'évaluer ce travail.*

*J'adresse ma toute gratitude et ma toute reconnaissance à Madame **TERRACHET épouse BOUAZIZ Souhila**, Professeure à l'université de M'hamed Bougara de Boumerdès, d'avoir accepté de collaborer avec nous, pour son aide très précieuse, son professionnalisme et sa grande disponibilité.*

*Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à Monsieur **AMIROUCHE Saifi**, Ingénieur de recherche et responsable d'atelier de prototypage et maintenance des équipements scientifiques au CRAPC pour sa générosité scientifique, ses conseils et surtout pour les analyses RMN.*

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur **MERZOUK Tahar**, Ingénieur au laboratoire LPCM et à Monsieur **BOUDINAR Salem** Maître de conférences classe A à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou qui, par leur disponibilité constante, leur dynamisme et bonne humeur mais aussi par leur soutien quotidien, m'ont considérablement aidé durant mon parcours au sein du laboratoire LPCM.*

*J'adresse un grand et chaleureux remerciement à tous les chercheurs et enseignants que j'ai eu le plaisir de côtoyer au Laboratoire LPCM, pour leur disponibilité, leurs conseils, la bonne humeur et la convivialité qu'ils ont répandue au quotidien...Un grand **MERCI** à tous.*

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes chers parents,

Deux personnes exceptionnelles qui, par tous leurs sacrifices, leur amour, leur dévouement, leur patience et leur soutien inconditionnel m'ont permis d'arriver là où je suis.

A mes deux Frères : Kousseila et Massinissa

A mes deux grand-mères : Ouzna et Hedda

A mes deux défunts grands-pères

Et à toute ma Famille.

Merci d'être là pour moi.

Sabrina

Liste des abréviations

AA : Acide ascorbique

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

ADN : Acide Désoxyribose Nucléique

Ala : Alanine

Arg : Arginine

Asn : Asparagine

Asp : Acide aspartique

ATR : Réflectance totale atténuée

CCM : Chromatographie sur couche mince

CE₅₀ : Concentration efficace

CI₅₀ : Concentration inhibitrice

CMI : Concentration minimale inhibitrice

d : Doublet

dd : doublet-dédouble

DBSS : dodécylbenzènesulfonate de sodium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DMSO-d₆ : Diméthylsulfoxyde deutéré

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

ERO/ERN : espèces réactives de l'oxygène/azote

EtOH : Ethanol

FDA: Food and Drug Administration

Glu : Acide glutamique

Gln : Glutamine

Gly : Glycine

His : Histidine

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HOMO : Highest Occupied Molecular Orbital

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence

INH : Isonicotinyl Hydrazine

Ile : Isoleucine

IR : Infrarouge

LC-MS : Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse

Leu : Leucine

Lys : Lysine

LUMO : Lowest Unoccupied Molecular Orbital

m : Multiplet

nm : nanomètre

NMT : N-myristoyltransférase

Liste des abréviations

NOESY: Nuclear Overhauser Effect
Spectroscopy

ORCA : One Really Cool Application

Pf : Point de fusion

Phe : Phénylalanine

ppm : partie par million

Rdt : Rendement

Pro : Proline

RMC : Réaction multicomposants

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RMN 2D : Résonance magnétique
nucléaire bidimensionnelle

RSA : Relation structure-activité

s: Singulet

Ser : Serine

SNC: Systèmes nerveux central

t : Triplet

Thr : Thréonine

TMS: Tétraméthylsilane

Tyr : Tyrosine

UV-vis : Ultraviolet-visible

Val : Valine

λ_{max} abs : Longueur d'onde d'absorption
maximale

Autres

Å : Ångström

°C : degré Celsius

g : gramme

h : heure

Hz, MHz : hertz, Méga hertz

J : Constante de couplage

min : minute

mm : millimètre

mL : millilitre

mmol, mol : millimole, mole

m/z : Rapport masse sur charge

µg : microgramme

µL : microlitre

δ : Déplacement chimique

Liste des tableaux

Partie I

Tableau I.1: Différentes structures et applications des coumarines	4
Tableau I.2 : Exemples de molécules bioactives dérivés de la pyrazolone	16
Tableau I.3 : Molécules hybrides contenant les structures coumarine, pyrazoline, pyrazolone et leurs activités biologiques.	23
Tableau I.4: Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et espèces non radicalaires.....	25
Tableau I.5 : Différentes techniques utilisées pour mesurer l'activité antioxydante	26

Partie II

Tableau II.1: Optimisation de la quantité de DBSS (mol %) pour la synthèse de la benzylpyrazolylcoumarine 5a	53
Tableau II.2: Synthèse catalysée par le DBSS (2 mol %) des dérivés benzylpyrazolylcoumarines 5a-i	54
Tableau II.3: Résultats de l'analyse RMN ^1H à 400 MHz du composé 5a	56
Tableau II.4: Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 101 MHz du composé 5a	56
Tableau II.5: Caractéristiques spectroscopiques UV-visible des composés 5a-i dans le DMSO	57
Tableau II.6: Résultats spectroscopiques IRTF des composés 5a-i	58
Tableau II.7: Diamètre (mm) de la zone d'inhibition des dérivés benzylpyrazolylcoumarines 5a-i à 5 mg/mL	65
Tableau II.8: Concentration minimale inhibitrice (CMI en $\mu\text{g/mL}$).	67
Tableau II.9: Résidus d'interaction prédits pour le composé synthétisé 5e et le Kétoconazole avec la protéine N-myristoyltransférase (NMT).	69

Partie III

Tableau III.1: Condensation de la 3-acétoacétylcoumarine 8a avec l'isoniazide 9 dans différentes conditions de réaction	82
Tableau III.2 : Synthèse des dérivés 10a-g de 3-(isonicotinoyl-5-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-3-yl)-2 <i>H</i> -chromèn-2-ones catalysée par HCl conc. dans un mélange chloroforme-éthanol (2:1) à température ambiante.	84

Liste des tableaux

Tableau III.3: Résultats de l'analyse RMN ^1H à 400 MHz du composé 10a	86
Tableau III.4: Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 101 MHz du composé 10a	86
Tableau III.5: Résultats de l'analyse RMN ^1H à 500 MHz du composé 10b	88
Tableau III.6: Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 126 MHz du composé 10b	88
Tableau III.7: Résultats de l'analyse RMN ^1H à 500 MHz du composé 10c	91
Tableau III.8: Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 126 MHz du composé 10c	91
Tableau III.9: Résultats de l'analyse RMN ^1H à 500 MHz du composé 10d	93
Tableau III.10: Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 126 MHz du composé 10d	93
Tableau III.11: Résultats de l'analyse RMN ^1H à 400 MHz du composé 10e	95
Tableau III.12: Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 101 MHz du composé 10e	95
Tableau III.13: Résultats de l'analyse RMN ^1H à 500 MHz du composé 10f	97
Tableau III.14: Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 126 MHz du composé 10f	97
Tableau III.15: Résultats de l'analyse RMN ^1H à 400 MHz du composé 10g	99
Tableau III.16: Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 101 MHz du composé 10g	100
Tableau III.17: Caractéristiques spectroscopiques UV-visible des composés 10a-g dans le DMSO	101
Tableau III.18: Activité antifongique <i>in-vitro</i> et diamètre (mm) de la zone d'inhibition des dérivés de 3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)-2 <i>H</i> -chromèn-2-on contre les souches sélectionnées.....	106
Tableau III.19: Concentration minimale inhibitrice (CMI en $\mu\text{g/mL}$).....	109
Tableau III.20: Descripteurs de réactivité globale de l'isonicotinoylpyrazolylcoumarine synthétisée, énergies d'ionisation (E_i), affinité électronique (A_e), potentiel chimique (μ), électrophilicité (ω), mollesse (S) et dureté chimique (η).	111
Tableau III.21: Interactions des liaisons hydrogène, résidus en interaction et énergies de liaison ($\Delta E_{\text{Binding}}$), calculées pour le composé synthétisé 10e et le standard avec la protéine Phytase A.....	115

Liste des schémas

Partie I

Schéma I.1 : Méthodes de synthèse des coumarines.....	5
Schéma I.2 : Synthèse du noyau pyrazolone.....	15

Partie II

Schéma II.1: Synthèse des dérivés de la benzylpyrazolylcoumarine 5a-i en utilisant le DBSS comme catalyseur.....	48
Schéma II.2: Réaction multicomposants des quatre réactifs 4-hydroxycoumarine, hydrate d'hydrazine, acétoacétate d'éthyle, et dérivés d'aldéhydes.....	49
Schéma II.3: Mécanisme plausible pour la synthèse des benzylpyrazolylcoumarines 5a-i ...	50
Schéma II.4: Produits susceptibles de se formés avec la 1ère méthode.	51
Schéma II.5: Produits susceptibles de se formés avec la 2ème méthode.....	51
Schéma II.6: Méthode de synthèse des dérivés benzylpyrazolylcoumarines 5	52
Schéma II.7: Synthèse favorisée par les micelles et mécanisme possible pour la formation de la benzylpyrazolylcoumarine.	60

Partie III

Schéma III.1: Synthèse des 3-acétoacétylcoumarines 8a-g	81
Schéma III.2: Condensation de la 3-acétoacétylcoumarine 8a avec l'isoniazide 9 dans différentes conditions de réaction	82
Schéma III.3: Un mécanisme plausible pour la formation du composé 11a	83
Schéma III.4: Produits possibles suite à la réaction entre les molécules 10a-g et 9	84
Schéma III.5: Mécanisme concevable pour la synthèse de la 3-(5-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)-2 <i>H</i> -chromèn-2-one substituée 10a-g	102

Liste des figures

Partie I

Figure I.1 : Structure chimique de la coumarine.....	3
Figure I.2 : Structures des coumarines rapportées par Couttolenc et al	6
Figure I.3 : Dérivés de chitosane possédant des coumarines H1-H4	7
Figure I.4 : Structure des coumarines O-prénylées les plus actives.	7
Figure I.5 : Structure chimique de la styrylcoumarine C4.....	8
Figure I.6 : Coumarines antifongiques.....	9
Figure I.7 : Coumarines antifongiques synthétisées dans des conditions sans solvant et exploitant le liquide ionique comme catalyseur.	9
Figure I.8 : Nouvelles coumarines prénylées de Clausenalenis.....	10
Figure I.9 : Coumarines 7-substituées anti-inflammatoires proposées par Srivastava.	11
Figure I.10 : Structure chimique des médicaments anticoagulants les plus courants.....	12
Figure I.11 : Structure of 1 <i>H</i> -pyrazol-3-ol (9) and pyrazolin-5-one (10).	13
Figure I.12 : Médicaments approuvés par la FDA contenant un noyau pyrazolone et dérivés pyrazolone.	14
Figure I.13 : Structure chimique d'une pyrazoline	17
Figure I.14 : Dérivés de pyrazolines présentant une activité antimicrobienne.	19
Figure I.15 : Dérivés de pyrazolines présentant une activité antituberculeuse.....	19
Figure I.16 : 2-[5-(4-chlorophenyl)-3-(thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazol-1-yl]-4-methylquinoline.....	20
Figure I.17 : Dérivés de pyrazolines ayant une activité anti-inflammatoire.....	20
Figure I.18 : 5-(4-fluorophenyl)-3-(2,3,4,5-tetramethoxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazole.....	21
Figure I.19 : N-(4-chlorophenyl)-5, 6-dimethoxy-3-(pyridin-4-yl)-3,3a,4,8b-tetrahydroindeno[1,2- <i>c</i>]pyrazole-2(1 <i>H</i>)-carboxamide	21
Figure I.20 : Mécanisme de réaction du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) avec un antioxydant.....	27
Figure I.21: Schéma de la méthode de diffusion sur disque de gélose	29
Figure I.22: Algorithmes de recherche et fonctions de notation utilisés dans le docking moléculaire.....	31

Liste des figures

Partie II

Figure II.1 : Spectre de masse GC-MS du composé 5a	55
Figure II.2: Spectres d'absorption UV/vis des composés 5a-i dans le DMSO à 10^{-5} M.....	57
Figure II.3: Différentes structures tautomères de composé 5a	61
Figure II.4: Structures géométriques 3D optimisées pour le composé 5a	62
Figure II.5: Absorbance à 517 nm en fonction de la concentration des produits 5a-i et de l'acide ascorbique standard AA.....	63
Figure II.6: Valeurs des CI_{50} (μ g/mL) de l'activité antioxydante pour les composés 5a-i et le standard AA.....	64
Figure II.7: Activités antifongiques par zone d'inhibition dans des boîtes de Pétri des dérivés 5a-i (AF1 à AF4).....	65
Figure II.8: CMI des composés actifs contre la souche <i>Candida albicans</i>	66
Figure II.9: Vues 2D et 3D des modes de liaison des composés A- 5e et B-ketoconazole à la protéine N-myristoyltransférase (NMT)	68

Partie III

Figure III.1: Connectivités HMBC de 6-Hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (10b).....	89
Figure III.2: Corrélations principales 1H - ^{15}N de la 6-Hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (10b).....	89
Figure III.3 : Spectres d'absorption UV-visible des composés 10a-g dans le DMSO.	100
Figure III.4 : Structures de résonance possibles des composés 10c et 10g	101
Figure III.5: Calculs des enthalpies des structures 10a₁ , 10a₂ et liaison hydrogène dans la structure 10a₁	103
Figure III.6: Variation de l'absorbance en fonction de la concentration des différents composés 10a-g et AA	105
Figure III.7: Valeurs CI_{50} (mol/L) de l'activité antioxydante pour les composés 10a-g et le standard AA.....	105
Figure III.8: Activités antifongiques par zone d'inhibition dans des boîtes de Pétri des dérivés 10a-g (AF1 à AF5).....	107
Figure III.9: Photographies des résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des composés 10d et 10e contre la souche <i>Candida albicans</i>	108

Liste des figures

Figure III.10: Photographies des resultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du composé 10e contre la souche <i>Aspergillus niger</i>	108
Figure III.11: Energies et représentations des orbitales HOMO et LUMO pour l'isonicotinoylpyrazolylcoumarine	110
Figure III.12: Vues 2D et 3D de la conformation d'arrimage de A- 10e (S), B- 10e (R) et C- kétoconazole avec une protéine fongique, (D) superposition des conformations d'arrimage des énantiomères (R) (bâton vert) et (S) (bâton gris).	113

SOMMAIRE

Introduction générales	1
------------------------------	---

Partie I. Synthèse bibliographique

I. Coumarines	3
I.1. Classifications et propriétés des coumarines	3
I.2. Les différentes méthodes de synthèse des coumarines	4
I.3. Applications des coumarines	5
I.3.1. Activité antioxydante	5
I.3.2. Activité anticancéreuse	7
I.3.3. Activité antibactérienne	8
I.3.4. Activité antifongique	8
I.3.5. Activité antivirale.....	10
I.3.6. Activité anti-inflammatoire.....	11
I.3.7. Activité anticoagulante	11
II. Pyrazole, Pyrazolone et Pyrazoline	12
II.1. Pyrazolones.....	13
II.1.1. Stratégies de synthèse des pyrazolones	14
II.1.2. Profil pharmacologique des pyrazolones.....	15
II.2. Pyrazolines.....	16
II.2.1. Méthodes de synthèse des pyrazolines	17
II.2.2. Activités biologiques de la pyrazoline.....	18
II.2.2.1. La pyrazoline comme agent antimicrobien	18
II.2.2.2. La pyrazoline comme agent antituberculeux.....	19
II.2.2.3. La pyrazoline comme agent antipaludéen	19
II.2.2.4. La pyrazoline comme agent anti-inflammatoire.....	20
II.2.2.5. La pyrazoline comme agent anticancéreux	21
II.2.2.6. La pyrazoline comme agent anticonvulsivant	21

SOMMAIRE

III. Molécules hybrides	22
IV. Activité antioxydante	25
IV.1. Les antioxydants	25
IV.2. Évaluation de la capacité antioxydante	26
IV.2.1. Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	27
V. Activité Antifongique.....	28
V.1. Infections fongiques	28
V.2. Méthode d'évaluation de l'activité antifongique.....	28
VI. Docking moléculaire	29
VI.1. Processus de docking	30
VI.2. Applications du docking moléculaire	31
VII. Conclusion	32
Références bibliographiques	33

Partie II. Réaction catalysée par le dodécylbenzènesulfonate de sodium pour la synthèse verte des dérivés de la benzylpyrazolylcoumarine. Étude du mécanisme, de l'activité biologique et calculs théoriques

Chapitre 1. Synthèse des dérivés benzylpyrazolylcoumarines catalysés par le dodécylbenzènesulfonate de sodium (SDBS). Étude du mécanisme réactionnel mis en jeu et interprétation théorique des résultats obtenus

Introduction	47
I. Optimisation des conditions de réaction	48
I.1. Effet de la quantité du catalyseur sur la réaction	52
I.2. Étude de l'effet du substituant de l'aldéhyde.....	53
II. Caractérisations spectroscopiques des produits 5a-i	54
II.1. Étude par spectrométrie de masse GC-MS du composé 5a	54
II.2. Étude par spectroscopie RMN ¹ H de 5a	55
II.3. Étude par spectroscopie RMN ¹³ C de 5a	56

SOMMAIRE

II.4. Étude par spectroscopie UV-Visible des composés 5a-i	57
II.5. Étude par spectroscopie infrarouge IRTF.....	58
III. Étude du mécanisme catalytique	59
IV. Étude DFT, Géométries des composés synthétisés.....	61

Chapitre 2. Évaluation de l'activité antioxydante et antifongique *in-vitro* et Étude de docking moléculaire des dérivés benzylpyrazolylcoumarines

I. Évaluation de l'activité antioxydante des dérivées 5a-i	63
I.1. Évaluation de l'activité de piégeage du radical libre par la méthode de DPPH	63
II. Activité antifongique des produits 5a-i	64
III. Simulations de docking moléculaire	67
Conclusion.....	70
Partie expérimentale.....	71
Références bibliographiques	75

Partie III. Synthèse d'une nouvelle série de molécules hybrides dérivées d'isonicotinoylpyrazolylcoumarine. Étude du mécanisme, de l'activité biologique et calculs théoriques

Chapitre 1. Synthèse des dérivés d'isonicotinoylpyrazolylcoumarine et étude computationnelle

Introduction	79
I. Condensation de la 3-acétoacétylcoumarine 8a avec l'isoniazide 9 dans différentes conditions de réaction.....	80
I.1. Synthèse des dérivés 3-acétoacétylcoumarine 8a-g	80
II. Synthèse des dérivés de 3-(isonicotinoyl-5-méthyl-1 <i>H</i> -pyrazol-3-yl)-2 <i>H</i> -chromèn-2-ones 10a-g	83
II.1. Caractérisation du composé 3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)-2 <i>H</i> -chromèn-2-one (10a)	85
II.1.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))	85
II.1.2. Étude par spectroscopie RMN du proton ¹ H	85
II.1.3. Étude par spectroscopie RMN ¹³ C.....	86

SOMMAIRE

II.2. Caractérisation du composé 6-Hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)-2 <i>H</i> -chromèn-2-one (10b)	87
II.2.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))	87
II.2.2. Étude par spectroscopie RMN du proton ¹ H	87
II.2.3. Étude par spectroscopie RMN ¹³ C.....	88
II.2.4. Étude par spectroscopie RMN 2D HSQC et HMBC du produit 10b	89
II.2.5. Étude par spectroscopie RMN HMBC ¹ H- ¹⁵ N	89
II.3. Caractérisation du composé 7-hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)-2 <i>H</i> -chromèn-2-one (10c)	90
II.3.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))	90
II.3.2. Étude par spectroscopie RMN du proton ¹ H	90
II.3.3. Étude par spectroscopie RMN ¹³ C.....	91
II.4. Caractérisation du composé 8-hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)-2 <i>H</i> -chromèn-2-one (10d)	92
II.4.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))	92
II.4.2. Étude par spectroscopie RMN du proton ¹ H	92
II.4.3. Étude par spectroscopie RMN ¹³ C.....	93
II.5. Caractérisation du composé 3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)-6-nitro-2 <i>H</i> -chromèn-2-one (10e)	94
II.5.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))	94
II.5.2. Étude par spectroscopie RMN du proton ¹ H	94
II.5.3. Étude par spectroscopie RMN ¹³ C.....	95
II.6. Caractérisation du composé 3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)-6-iodo-2 <i>H</i> -chromèn-2-one (10f)	95
II.6.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))	96
II.6.2. Étude par spectroscopie RMN du proton ¹ H	96
II.6.3. Étude par spectroscopie RMN ¹³ C.....	97
II.7. Caractérisation du composé 2-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)-3 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>]chromèn-3-one (10g)	98
II.7.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))	98
II.7.2. Étude par spectroscopie RMN du proton ¹ H	98

SOMMAIRE

II.7.3. Étude par spectroscopie RMN ^{13}C	99
II.8. Étude par spectroscopie UV-visible des produits 10a-g	100
III. Mécanisme et interprétation théorique proposés pour la synthèse des composés 10a-g .	102
Chapitre 2. Évaluation de l'activité antioxydante et antifongique <i>in-vitro</i> des dérivés d'isonicotinoylpyrazolylcoumarine et étude du Docking moléculaire	
I. Évaluation de l'activité antioxydante des dérivés d'isonicotinoylpyrazolylcoumarine 10a-g	104
II. Évaluation de l'activité antifongique des composés 10a-g	106
III. Études computationnelles.....	109
III.1. Étude DFT	109
III.2. Docking moléculaire	112
Conclusion.....	116
Partie expérimentale	117
Références bibliographiques	124
Conclusion générale	130
Annexe.....	132

Introduction générale

Les structures hétérocycliques, notamment les cycles à cinq et six chaînons contenant des atomes d'azote, d'oxygène ou de soufre, sont largement répandues dans la nature [1]. Ces composés constituent la classe privilégiée de composés d'origine naturelle ayant une importance pharmaceutique. Ils ont une aptitude exceptionnelle à être utilisés comme divers biomimétiques intelligents et comme noyau actif dans une structure complexe, ce qui en a fait un motif indispensable dans le domaine pharmaceutique. Plusieurs composés dérivés hétérocycliques sont connus. Ce nombre continue de croître rapidement, car les substitutions hétérocycliques peuvent modifier le degré d'ionisation des composés dans le pH physiologique, entraînant des changements dans leur basicité et leur lipophilie, ce qui entraîne des différences substantielles dans les propriétés pharmacocinétiques [2].

Les coumarines font partie des hétérocycles naturels présentant un large spectre d'activités biologiques [3]. Ce sont des intermédiaires clés qui ont acquis une place particulière dans les domaines hétérocycliques et pharmaceutiques pour la synthèse de nouveaux composés, en raison de leur diversité structurelle et de leurs activités polyvalentes. Les composés hétérocycliques azotés sont également parmi les différents types de systèmes hétérocycliques abondants dans la nature et qui ont une importance thérapeutique considérable. Les analogues des hétérocycles à base d'azote occupent une position exclusive en tant que source précieuse d'agents thérapeutiques en chimie médicinale. Plus de 75 % des médicaments approuvés par la FDA et actuellement disponibles sur le marché sont des fragments hétérocycliques azotés [4].

Dans la conception de nouveaux médicaments, le développement de molécules hybrides en combinant plusieurs entités hétérocycliques offre la possibilité de créer de nouveaux composés multicycliques avec des profils biologiques nouveaux ou plus performants. Actuellement, plusieurs hybrides sont à différents stades d'essais cliniques et pourraient être introduits dans la pratique clinique pour traiter diverses maladies dans un avenir proche [5]. Plusieurs études ont montré que le squelette de la coumarine combiné à un échafaudage hétérocyclique contenant de l'azote tel que le triazole [5], le pyrazole [6,7], la pyrazolone [8], la thiazole [9], le benzimidazole [10] et les pyrazolines [11], soit comme substituant, soit comme composant fusionné dans le noyau de la coumarine peut conduire à de nouveaux candidats au spectre plus large, plus efficaces, moins toxiques et dotés de multiples mécanismes d'action. La synthèse d'hétérocycles oxygène-azotés d'intérêt biologique est l'un

des thèmes de recherche qui a été exploré au sein de notre laboratoire [12–14]. C'est dans ce contexte général que s'inscrit notre travail de thèse.

Les résultats obtenus dans ce travail sont exposés en trois parties :

- La première partie est consacrée à une étude bibliographique qui met en évidence les composés hétérocycliques, leurs méthodes de synthèse ainsi que leurs différentes activités biologiques.
- La seconde partie est subdivisée en deux chapitres, le premier chapitre est accordé à la synthèse des dérivés benzylpyrazolylcoumarines via une réaction de condensation en un pot de l'hydrazine hydrate, de l'acétoacétate d'éthyle, de l'aldéhyde aromatique et de la 4-hydroxycoumarine catalysée par le dodécylbenzènesulfonate de sodium (DBSS), à l'étude du mécanisme réactionnel mis en jeu et à l'interprétation théorique des résultats obtenus. Le deuxième chapitre comprend l'évaluation *in-vitro* de l'activité antioxydante et antifongique des composés obtenus et les études de docking moléculaire des composés actifs afin d'estimer leur potentiel comme inhibiteurs antifongiques.
- La 3ème partie comporte également deux chapitres, le premier est dédié à la synthèse d'une série de molécules hybrides de dérivés d'isonicotinoylpyrazolylcoumarines par réaction de cyclocondensation des dérivés de la 3-acétoacétylcoumarine avec l'isoniazide. L'interprétation des résultats et la détermination structurale des composés obtenus sont également rapportées dans ce chapitre. Le second chapitre décrit les résultats *in-vitro* de l'activité antioxydante et de l'activité antifongique de la série synthétisée. Les paramètres de calcul comme la DFT et l'étude de docking moléculaire pour l'activité antifongique des conjugués coumarine-pyrazoline-INH synthétisés ont également été réalisés.

Partie I

Synthèse bibliographique

I. Coumarines

Les hétérocycles contenant de l'oxygène sont largement répandus dans les composés naturels et synthétiques. Les coumarines sont parmi les hétérocycles les plus connus qui possèdent un atome d'oxygène dans leurs cycles. La fraction coumarine se trouve dans de nombreux produits naturels qui sont utilisés depuis plusieurs décennies dans la médecine traditionnelle du monde entier. La coumarine possède des propriétés physico-chimiques distinctives et peut être facilement transformée en une large gamme de coumarines fonctionnalisées. En conséquence, un grand nombre de dérivés de la coumarine ont été conçus, synthétisés et évalués pour une variété de cibles pharmacologiques.

I.1. Classifications et propriétés des coumarines

Les coumarines (benzopyran-2-one ou chromèn-2-one) appartiennent à une grande classe de composés phénoliques et sont issues de la fusion d'un cycle α -pyrone avec un noyau benzène (**Figure I.1**) [15]. La plupart des coumarines ont été identifiées comme des métabolites secondaires répandus dans diverses espèces végétales, notamment les plantes vertes [16], mais aussi dans les champignons et les micro-organismes [17,18]. La molécule mère a été isolée pour la première fois par Vogel en 1820 à partir des graines de l'arbre *Dipteryx odorata*, appelé fève tonka [19].

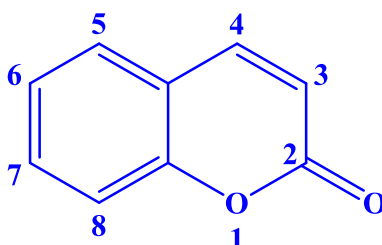
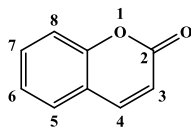
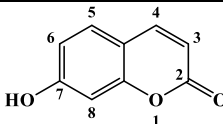
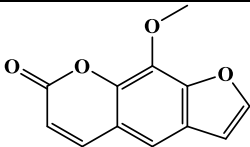
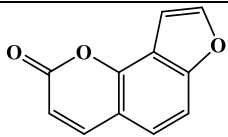
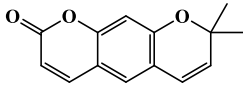
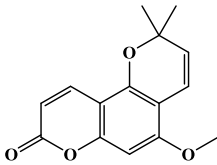
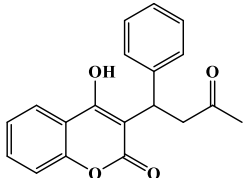


Figure I.1 : Structure chimique de la coumarine

Les coumarines possèdent une ou plusieurs fonctions phénoliques. Les hydroxyles de ces coumarines peuvent être libres, étherifiés ou engagés dans une liaison hétérosidique. Elles sont principalement divisées en coumarines simples et en coumarines complexes. Ces dernières sont constituées d'un cycle furanique ou pyranique associé au cycle benzo- α -pyrone, il y a les furanocoumarines et les pyranocoumarines (linéaires et angulaires). Les différentes structures des coumarines sont présentées dans le **tableau I.1**.

Tableau I.1 : Différentes structures et applications des coumarines

Molécule	Structure	Exemple	Application	Réf
Coumarines simples		Coumarine simple	Fixateur de parfum; Peinture ; Spray additif ; arôme alimentaire	[20]
		Ombelliférone	Leucémie ; Antioxydant ; Antimicrobien ;	[21]
Furanocoumarines		Xanthotoxine	Antileucodermique	[22]
		Angelicin	Thalassémie ; Drépanocytose ; Antiviral ;	[23]
Pyranocoumarines		Xanthyletin	Antibactérien ;	[24]
		Alloxanthoxyletin	Antibactérien ; Antiviral ;	[25]
Coumarines substituées au pyrone		Warfarine	Anticoagulant	[26]

I.2. Les différentes méthodes de synthèse des coumarines

Compte tenu du potentiel chimique élevé des coumarines et de leur importance biologique, plusieurs méthodes ont été développées pour leurs synthèses. Notamment la réaction de Perkin [27], la condensation de Pechmann [28], la condensation de Knoevenagel [29], Reformatsky [30] et la réaction de Wittig [31]. Le **schéma I.1** résume les principales voies de synthèse des coumarines.

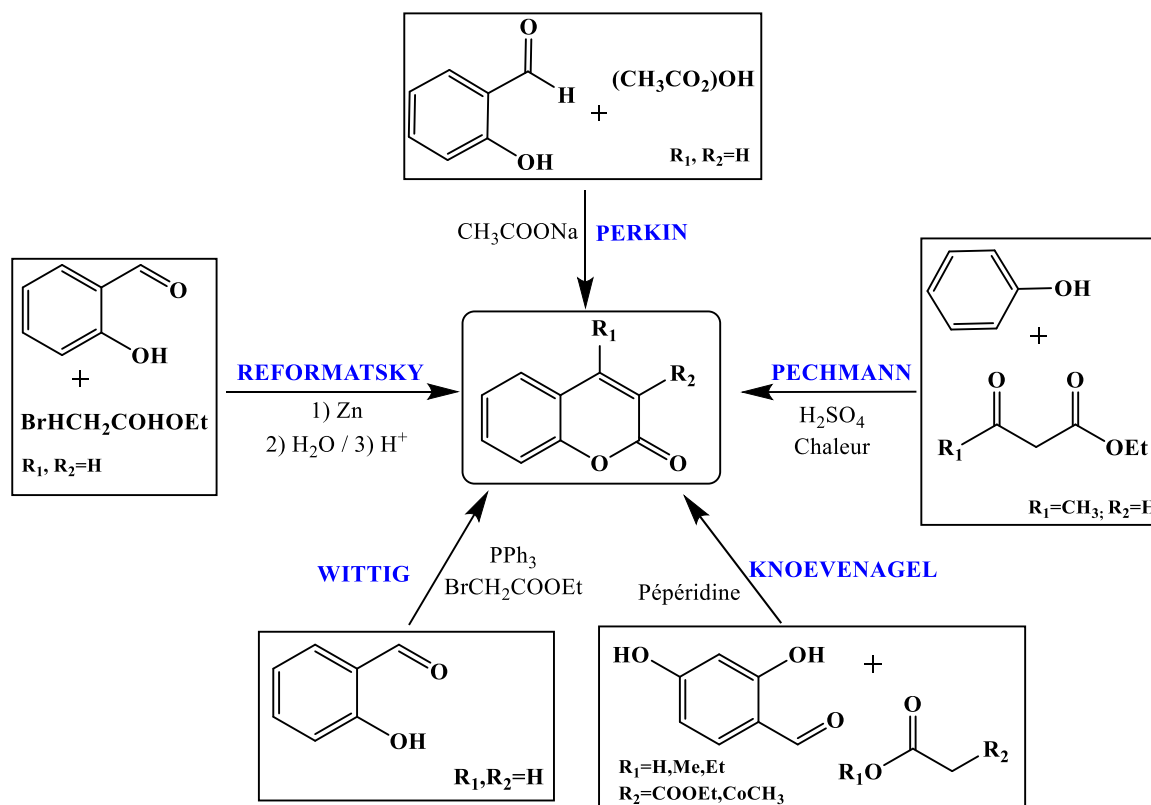


Schéma I.1 : Méthodes de synthèse des coumarines

I.3. Applications des coumarines

Les coumarines présentent de nombreuses applications pharmacologiques notamment anticoagulantes [32], antimicrobiennes [33], anti-inflammatoires [34], antidiabétiques [35] et anticancéreuses [36]. Elles sont aussi dotées de propriétés anti-convulsivantes et neuroprotectrices [37]. Leur importance est également évidente dans l'industrie alimentaire où leurs activités fongicides et antioxydantes sont étudiées et exploitées [38,39]. Bien qu'elles soient reconnues pour leurs activités biologiques, les coumarines présentent une caractéristique largement explorée par l'industrie du à leurs propriétés lumineuses. La luminescence de certains dérivés résulte des propriétés intrinsèques de transfert de charge des systèmes conjugués riches en électrons [40]. Ces composés ont une large gamme d'applications telles que les sondes biologiques fluorescentes, les sondes de surveillance de l'activité enzymatique ainsi que l'information pharmacologique précise et en temps réel [40].

I.3.1. Activité antioxydante

Le potentiel antioxydant des coumarines naturelles et synthétiques a fait l'objet de recherches approfondies au cours des dernières années et il est apparu clairement que les

coumarines poly-hydroxy ou phénoliques sont des antioxydants efficaces dans les systèmes biologiques [41].

En 2019, Couttolenc et ses collaborateurs ont étudié l'activité de piégeage des radicaux de trois hydroxy-4-méthylcoumarines (**C1-C3**, **figure I.2**) au moyen de méthodes expérimentales et théoriques [42]. L'activité de piégeage des composés a été évaluée par trois méthodes différentes à savoir sur les radicaux ABTS (l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6 sulfonique)), DPPH (2,2-diphényl-1 picrylhydrazyl) et galvinoxyl en tant que capacité antioxydante équivalente de Trolox (un analogue de la vitamine E). Les résultats ont montré que le **C1** ne présentait pas d'activité de piégeage des radicaux, alors que le **C2** s'est révélé plus actif que Trolox (Témoin positif) contre le radical $ABTS^{\bullet+}$ (CE_{50} 30,83 μ M) et le composé **C3** a présenté une activité antioxydante supérieure à celle du standard Trolox vis à vis des radicaux $ABTS^{\bullet+}$, DPPH et galvinoxyl avec des CE_{50} de 39,98, 150,99 et 13,19 μ M, respectivement. Il est probable que de telles différences dans l'activité antioxydante puissent reposer sur les différences dans les positions relatives des groupes hydroxy [43].

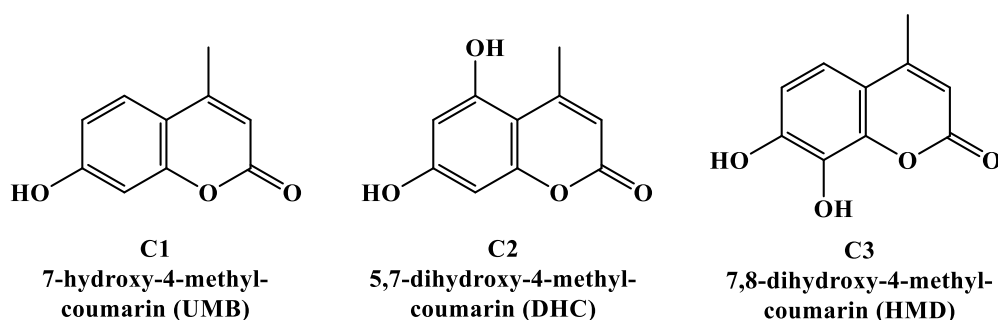


Figure I.2 : Structures de coumarine rapportées par Couttolenc et al.

Le potentiel antioxydant du noyau coumarine peut être exploité dans la synthèse de nouveaux composés hybrides avec une augmentation de l'activité antioxydante. Un exemple récent de cette stratégie est la synthèse d'une nouvelle série de dérivés de chitosane contenant le noyau coumarine (**H1-H4**, **Figure I.3**), réalisée par Li et ses collaborateurs [44]. Sur la base de la valeur de la CI_{50} , la propriété inhibitrice des dérivés de chitosane-coumarine synthétisés a montré une amélioration remarquable par rapport au chitosane.

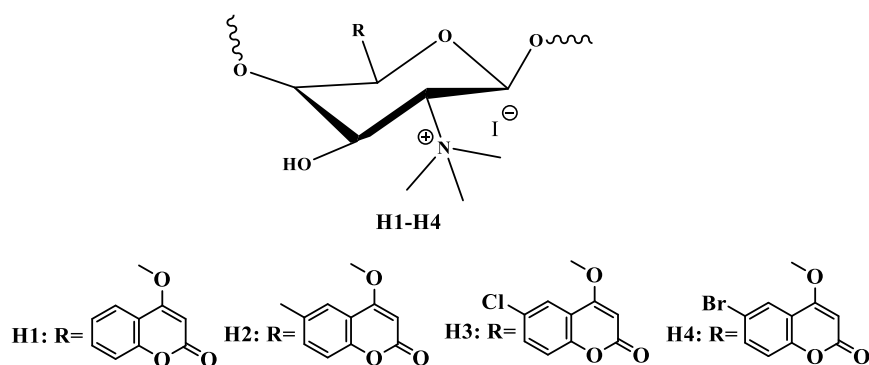


Figure I.3 : Dérivés de chitosane possédant des coumarines **H1-H4**.

I.3.2. Activité anticancéreuse

Le terme "cancer" définit un large éventail de maladies causées par l'accumulation de mutations et caractérisées par un processus en plusieurs étapes, impliquant de nombreux facteurs différents qui peuvent ne pas causer directement le cancer mais augmenter les risques de mutations génétiques [45,46]. Récemment, Maleki et al. ont synthétisé dix-huit dérivés de coumarine O-prénylés et les ont testés sur des cellules cervicales cancéreuses HeLa et des cellules normales HDF (fibroblaste dermique humain) par le test MTT (dosage colorimétrique à base de tétrazolium) [47]. Les composés les plus prometteurs sont présentés dans la **Figure I.4**.

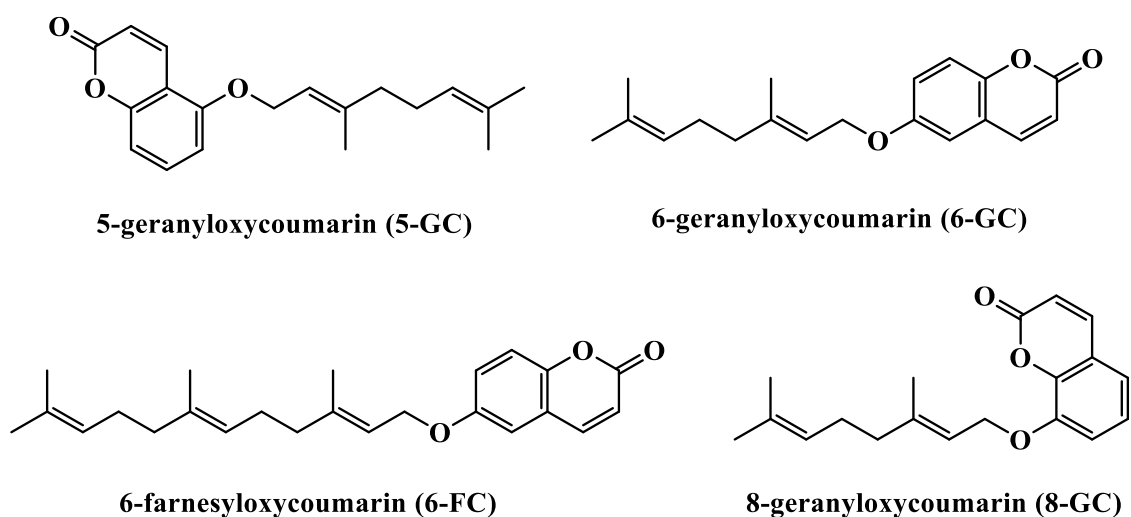


Figure I.4 : Structure des coumarines O-prénylées les plus actives.

Herrera et al. ont synthétisé une série de 3- et 7-styrylcoumarines, dont certaines ont montré une activité anti-proliférative sur les cellules d'adénocarcinome du côlon humain SW480 [48]. Parmi eux, la 7-(4 hydroxy-3,5-diméthoxystyryl)-2H-chromène-2-one (**C4**, **Figure I.5**) a montré la plus grande activité ($CI_{50} = 1,01 \mu M$) car elle était capable d'induire

l'apoptose dans les cellules SW480, probablement en modulant la protéine suppresseur de la tumeur p53. Le nouveau composé a également été testé *in-vivo*, démontrant qu'il était capable d'inhiber la progression précoce de l'adénocarcinome du côlon [49].

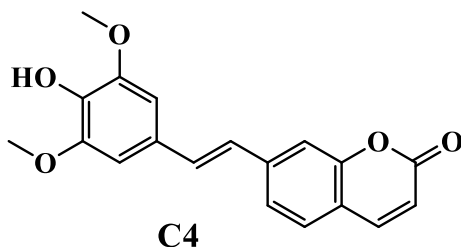


Figure I.5 : Structure chimique de la styrylcoumarine C4.

I.3.3. Activité antibactérienne

La lutte contre les infections et les bactéries multi-résistantes est certainement l'un des problèmes les plus difficiles auxquels la communauté scientifique et l'humanité dans son ensemble sont confrontées. Les bactéries multi-résistantes (BMR) sont définies comme des souches non sensibles à un ou plusieurs antimicrobiens appartenant à trois classes d'antimicrobiens ou plus, tandis que les souches non sensibles à tous les antimicrobiens sont classées comme souches extrêmement résistantes aux médicaments [50,51]. Le règne végétal constitue une source pratiquement inépuisable de nouveaux produits chimiques et d'échafaudages, tels que les poly-phénols et les coumarines [52].

En 2005, le pouvoir antibactérien de près de 50 dérivés de coumarine, naturels et synthétiques, a été évalué puis corrélé par une étude RSA. La sensibilité bactérienne aux coumarines a été évaluée en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB), en considérant les composés actifs présentant des valeurs de CMI allant de 62,5 à 2000 µg/mL. Parmi les composés actifs, l'**Osthénole** (une coumarine naturelle ayant également l'activité anti-inflammatoire) a montré l'activité la plus puissante avec une CMI de 62,5 µg/mL contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* [53].

I.3.4. Activité antifongique

Les maladies fongiques sont un fléau bien connu du monde animal et végétal, mais une menace plus cachée pour la santé humaine. Plus de 90 % de tous les décès liés aux champignons signalés sont dus à des espèces appartenant à l'un des quatre genres suivants : *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* et *Pneumocystis* [54]. Les dérivés de la coumarine sont dotés d'une activité antifongique, potentiellement utile dans les secteurs pharmaceutique et agroalimentaire.

En 2016, Shaik et al ont conçu une nouvelle série de dérivés de coumarine conjugués à des fragments de 1,2,3-triazole, sur la base d'un travail antérieur de Shi et Zhou et de l'utilisation courante des azoles comme médicaments antifongiques [55,56]. La puissance antifongique des nouveaux composés a été testée contre *Candida albicans* et quatre autres pathogènes fongiques (c'est-à-dire *Fusariumoxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Cryptococcus neoformans*) ; les valeurs de CMI ont été évaluées et comparées aux CMI des composés de référence Miconazole et Fluconazole. Les composés **C5-C7** et **C9** (**Figure I.6**) se sont révélés être équipotents au Miconazole contre *C. albicans* et le composé **C8** s'est révélé deux fois plus actif que le Miconazole et équipotent au Fluconazole.

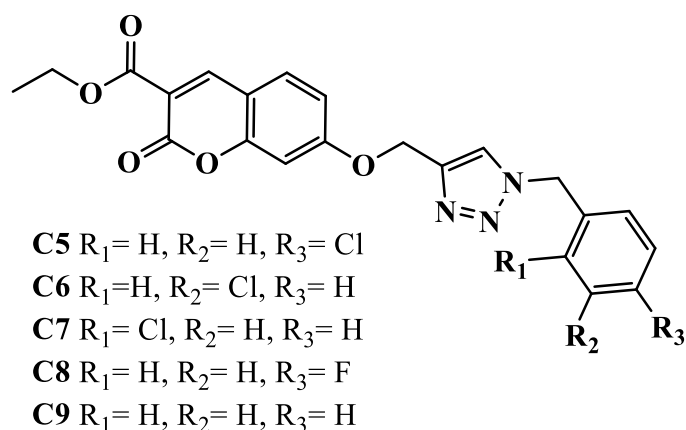


Figure I.6 : Coumarines antifongiques

En 2017, quinze nouveaux dérivés de coumarine ont été synthétisés par Tiwari et al, dans des conditions sans solvant et en exploitant le liquide ionique $[Et_3NH][HSO_4]$ comme catalyseur [57]. Les composés ont été testés pour leurs activités antifongiques et antibactériennes et, parmi la série, les composés **C10** et **C11** se sont avérés être les plus puissants en tant que fongicides (**Figure I.7**). Les valeurs de CMI observées pour les composés **C10** et **C11** étaient comparables à celles du médicament standard, le Miconazole.

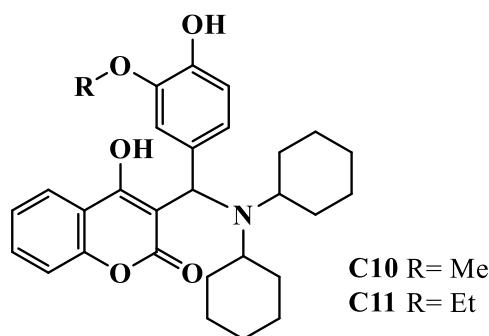


Figure I.7 : Coumarines antifongiques synthétisées dans des conditions sans solvant et exploitant le liquide ionique comme catalyseur.

I.3.5. Activité antivirale

L'année 2020 a été une année cruciale pour la guerre intemporelle entre l'homme et les virus : L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a déclaré l'épidémie de Sars-COVID-19 comme une urgence de santé publique de portée internationale le 31 décembre 2019 et le 11 mars, l'OMS a qualifié le COVID-19 de pandémie [58]. L'histoire de l'humanité est marquée par une succession cyclique de pandémies et la recherche de nouveaux antiviraux est toujours en cours, en raison de la capacité des virus à muter et de l'apparition continue de nouveaux virus dans le scénario médical [59]. Le monde naturel est une source inestimable de composés médicaux précieux et, dans la lutte contre les maladies virales, plusieurs molécules naturelles présentent une activité antivirale [60]. Les coumarines, comme d'autres composés polyphénoliques, exercent une activité antivirale remarquable [61]. L'activité antivirale des coumarines s'explique par différents mécanismes qui affectent le cycle de vie des virus et leurs activités biologiques peuvent être modifiées en fonction de la combinaison de divers substituants et conjugués [59]. Les coumarines semblent être actives contre plusieurs virus, comme le VIH, la grippe, l'hépatite, la dengue et le Chikunguya [59].

Liu et ses collaborateurs, après une étude phytochimique sur la tige de Clausenalenis, ont isolé trois nouvelles coumarines prénylées et neuf connues [62]. Toutes les coumarines prénylées ont été évaluées à la fois pour leurs activités anti-inflammatoires et pour leurs activités contre la transcriptase inverse (TI) du VIH. Les trois nouveaux composés isolés (**C12-C14**, **Figure I.8**) ont montré la meilleure activité inhibitrice avec une CE_{50} de 0,29, 0,68 et 0,17 μM , respectivement. De plus, aucune cytotoxicité n'a été observée contre la lignée cellulaire C8166 ($CC_{50} > 200,00 \mu\text{M}$).

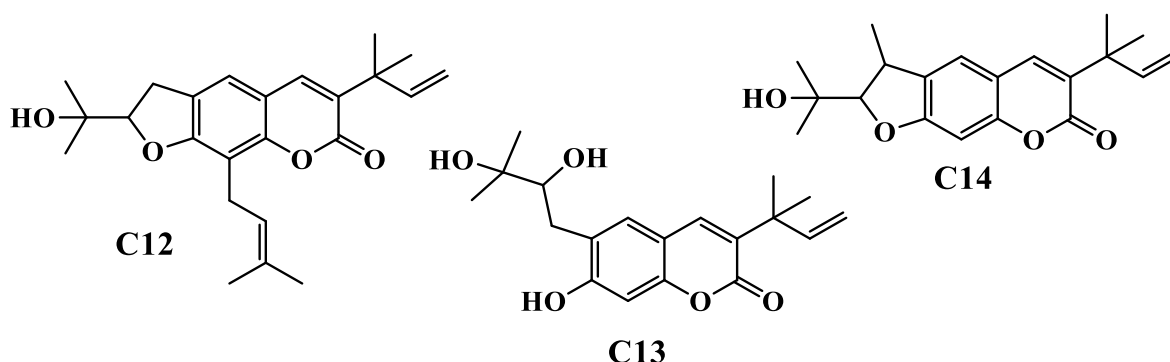


Figure I.8 : Nouvelles coumarines prénylées de Clausenalenis.

I.3.6. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est la réponse du système immunitaire aux stimuli nocifs, tels que les agents pathogènes, les cellules endommagées, les composés toxiques ou l'irradiation, et agit en éliminant les stimuli nocifs et en initiant le processus de guérison. L'inflammation est donc un mécanisme de défense essentiel à la santé. Habituellement, au cours des réponses inflammatoires aiguës, les événements et interactions cellulaires et moléculaires minimisent efficacement les blessures ou les infections imminentes. Cependant, une inflammation aiguë non contrôlée peut devenir chronique et contribuer à diverses maladies inflammatoires chroniques [63]. Parmi les nombreuses activités biologiques démontrées par les dérivés de la coumarine, l'effet anti-inflammatoire ne pouvait certainement pas manquer.

En 2016, Srivastava et ses collaborateurs ont évalué l'effet anti-inflammatoire et analgésique d'une série de coumarines 7-substituées synthétisées, et par conséquent, les composés les plus actifs ont été évalués *in-vitro* pour l'inhibition de 5-LOX [64]. Les composés **C15** et **C16** (**Figure I.9**) ont été les dérivés les plus prometteurs, également dans l'évaluation du risque ulcérogène par rapport à l'acide acétylsalicylique. L'étude cinétique *in vitro* du composé **C16** ($CI_{50} = 2,09$ nM) a montré une inhibition mixte ou non compétitive de la 5-LOX. La présence d'un substituant en position C-6 du cycle benzothiazole s'est avérée très importante pour augmenter l'activité.

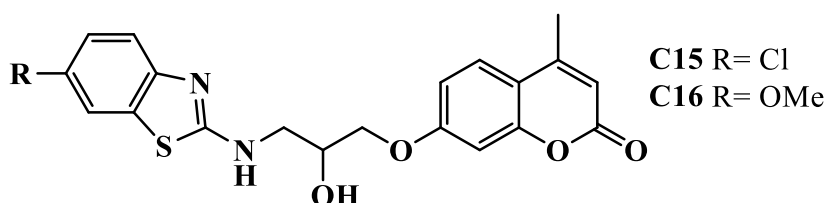


Figure I.9 : Coumarines 7-substituées anti-inflammatoires proposées par Srivastava.

I.3.7. Activité anticoagulante

L'histoire médicale récente des médicaments anticoagulants a été largement dominée par une classe simple de molécules qui a été découverte grâce à une mystérieuse mortalité du bétail et, plus tard, employée comme un puissant rodenticide : les coumarines. Toutefois, ce n'est qu'en 1940 que la molécule responsable a été identifiée par Karl Link et son étudiant Harold Campbell : il s'agissait du 3,3'-méthylène-bis (4-hydroxycoumarine), connu plus tard sous le nom de dicoumarol. D'autres études menées par l'équipe de Link ont abouti à la découverte de la warfarine en 1948, approuvée comme rodenticide aux États-Unis en 1952 et pour le traitement anticoagulant chez l'homme en 1954, sous le nom de Coumadin.

Actuellement, la warfarine est l'un des médicaments anticoagulants les plus utilisés, avec d'autres dérivés de la coumarine comme le dicoumarol et l'acénocoumarol (**Figure I.10**) [65–67].

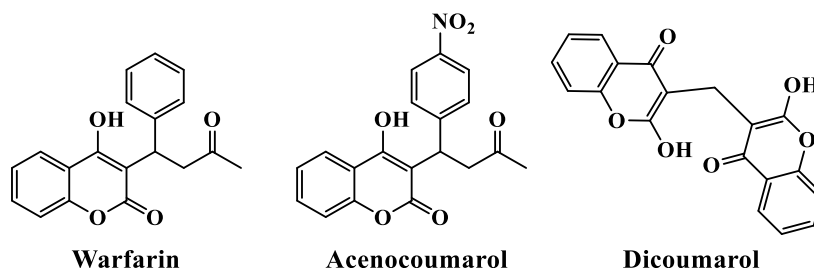
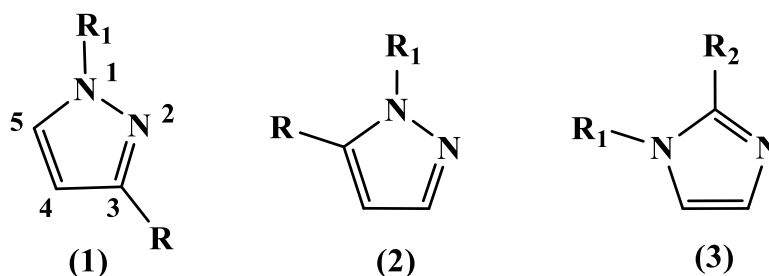


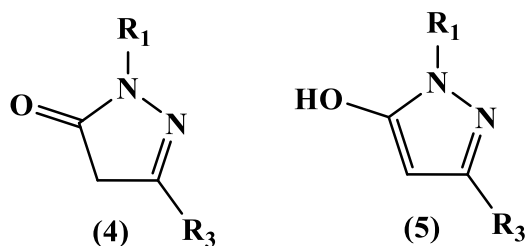
Figure I.10 : Structure chimique des médicaments anticoagulants les plus courants.

II. Pyrazole, Pyrazolone et Pyrazoline

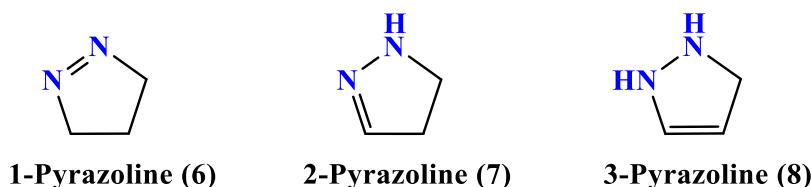
Les hétérocycles à cinq chaînons contenant deux atomes d'azote adjacents, peuvent être discutés en fonction du nombre de doubles liaisons présentes. Les pyrazoles contiennent deux doubles liaisons dans le noyau, ce qui confère un caractère aromatique à ces molécules. Ce sont des composés stables et ils peuvent présenter les formes isomériques **(1)** et **(2)** lorsqu'ils sont correctement substitués. Les pyrazoles sont rares dans la nature par rapport aux imidazoles **(3)**, qui sont très répandus et jouent un rôle central dans de nombreux processus biologiques.



Les pyrazolones, qui contiennent également deux doubles liaisons, se présentent principalement sous la forme cétonique **(4)**, bien qu'elles puissent également exister sous la forme émol **(5)**.



Les pyrazolines n'ont qu'une seule double liaison dans le noyau et, selon la position de la double liaison, peuvent exister sous trois formes distinctes : 1-pyrazoline (6), 2-pyrazoline (7) et 3-pyrazoline (8).



Malgré leur rareté dans la nature, ces composés ont été utilisés dans de nombreuses applications, notamment dans les produits pharmaceutiques, les produits chimiques agricoles (pesticides) et les colorants.

II.1. Pyrazolones

Les pyrazolones (1*H*-pyrazol-3-ol) (9) et la pyrazolin-5-one (10) (Figure I.11) représentent un groupe de composés important en raison de leurs multiples caractéristiques et applications.

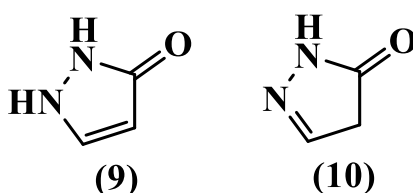


Figure I.11: Structure de 1*H*-pyrazol-3-ol (9) et de la pyrazolin-5-one (10).

Depuis 1883, date de la synthèse de l'antipyrine (**P1**) par Knorr, les activités analgésiques et antipyrétiques des analogues de la pyrazolone ont suscité une grande attention [68]. La découverte de ces caractéristiques a encouragé les chercheurs à synthétiser d'autres dérivés de la pyrazolone ayant un comportement similaire mais avec une meilleure action thérapeutique. Aujourd'hui, de nombreux médicaments approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) contenant un noyau pyrazolone ont été explorés (Figure I.12).

Par exemple, l'Edaravone (**P2**) a été utilisée comme capteur de radicaux libres pour le traitement de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) [69], l'Aminophénazone (**P3**) avec des activités antipyrétiques et anti-inflammatoires a été utilisée dans des tests respiratoires pour mesurer l'activité métabolique du cytochrome P-450 dans les évaluations de la fonction hépatique [70]. L'Eltrombopag (**P4**) a été utilisé pour le traitement d'une faible numération plaquettaire chez les adultes atteints de thrombocytopénie immunitaire chronique idiopathique

[71], la dichloralphénazone (**P5**) a été utilisée pour le soulagement des céphalées de tension et vasculaires [72]. Le Métamizole (**P6**) a été utilisé pour les douleurs périopératoires, les douleurs cancéreuses, les blessures aiguës et d'autres formes de douleur. Il est considéré comme l'antipyrétique le plus puissant [73]. Plusieurs petites molécules expérimentales contenant de la pyrazolone ont été considérées comme des candidats médicaments, notamment la Sulfamazone (**P7**), la Propyphénazone (**P8**) [74] et la Nifenazone (**P9**) [75].

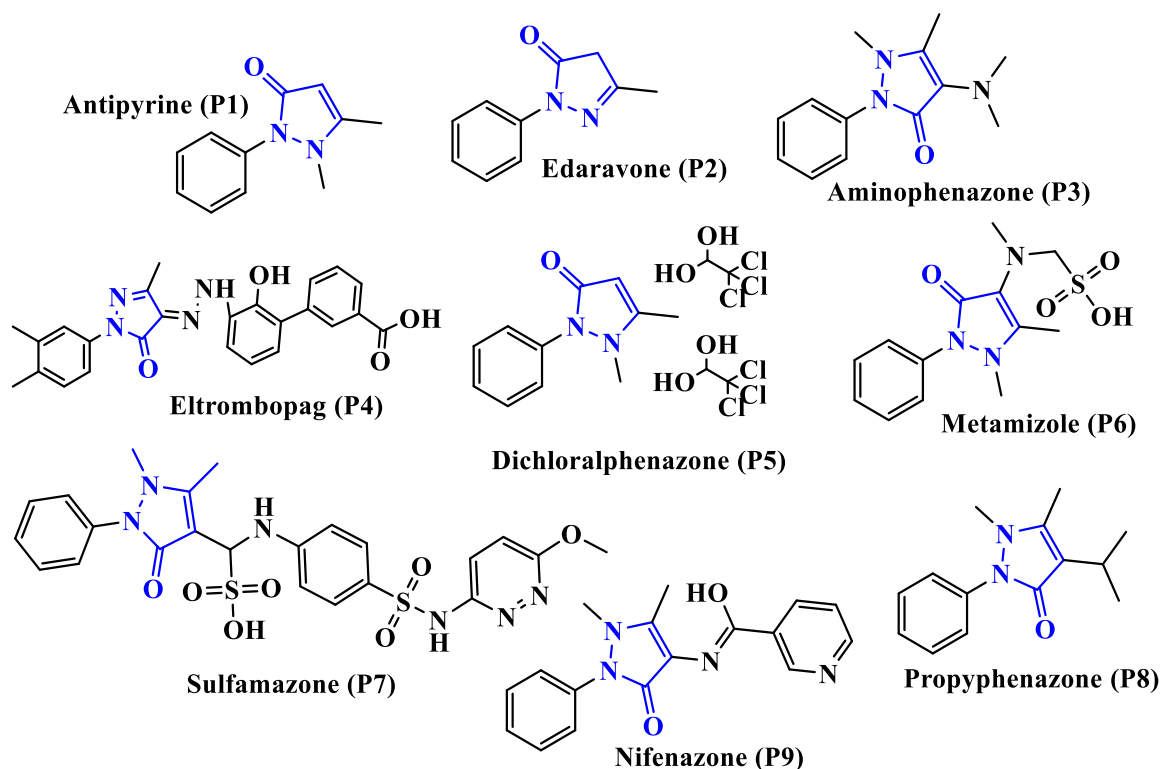


Figure I.12 : Médicaments approuvés par la FDA contenant un noyau pyrazolone et dérivés pyrazolones.

II.1.1. Stratégies de synthèse des pyrazolones

Des avancées récentes dans la synthèse des pyrazolones ont été rapportées dans la littérature [76]. La condensation des hydrazines avec des composés β -cétoester est la méthode classique pour la synthèse des pyrazolones (**Schéma 1.2**), les conditions catalytiques sont généralement l'utilisation d'une base organique comme la pipéridine ou inorganique comme l'hydruure de sodium (NaH) dans le système du solvant éthanol ou méthanol [71].

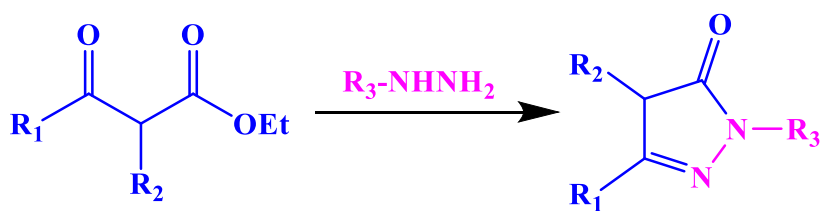


Schéma I.2 : Synthèse du noyau pyrazolone.

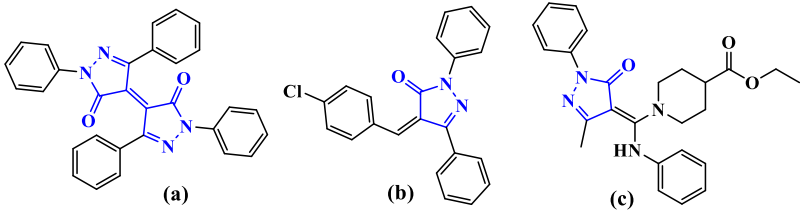
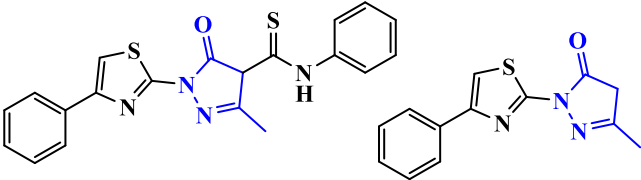
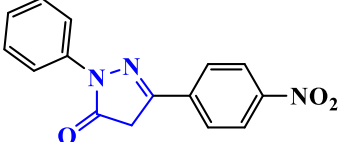
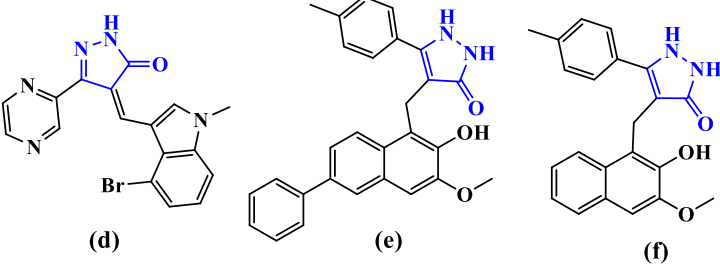
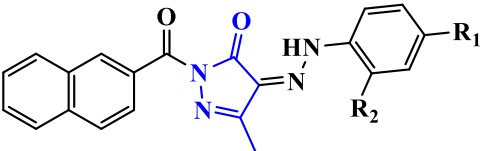
Le noyau des pyrazolones a été largement utilisé pour synthétiser ultérieurement une large gamme de dérivés, notamment des spirohétérocycles et des productions d'acylation, qui présentent de multiples sites réactifs [77]. La substitution électrophile en position C-4 des pyrazolones est une voie de synthèse efficace pour la construction de pyrazolones liées à des groupes chiraux et de pyrazolones 4-disubstituées. En outre, en tant que synthon important, les pyrazolones α , β -insaturées ($R_1 : C=C-R'/C=N-R'/C=O$) peuvent être transformées en diverses pyrazolones. Lorsque R_1 est $C=C-R'$, ils peuvent subir l'addition de 1,4-Michael en tant qu'accepteurs pour générer un analogues de pyrazole 4-substitués [78].

II.1.2. Profil pharmacologique des pyrazolones

Un large éventail de propriétés pharmacologiques des dérivés de la pyrazolone a été rapporté, notamment des activités antimicrobiennes [79], anti-tumorales [80], anti-inflammatoires et analgésique [81], anti-Alzheimer [82] et antidiabétique [83].

Quelques exemples de molécules bioactives dérivés de pyrazolone sont reportés dans le **tableau I.2**.

Tableau I.2 : Exemples de molécules bioactives dérivés de la pyrazolone

Activités biologiques	Molécules	Réf
Agents antimicrobiens	 (a) (b) (c)	(a) et (b) [84] (c) [76]
Agents antioxydants		[85]
Agents antiviraux		[86]
Agents antitumoraux	 (d) (e) (f)	(d) [87] (e) et (f) [88]
Agents antidépresseurs	$R_1=R_2=Cl$ $R_1=R_2=Me$ 	[89]

II.2. Pyrazolines

Les pyrazolines (**Figure I.13**, structure A), également appelées dihydropyrazoles, sont des composés hétérocycliques non aromatiques à cinq chaînons contenant une double liaison et deux atomes d'azote en positions adjacentes. Trois types de pyrazolines peuvent apparaître en fonction de la position de la double liaison dans le cycle [90]. Les trois catégories sont **1-pyrazoline** (4,5-dihydro-3*H*-pyrazole), **2-pyrazoline** (4,5-dihydro-1*H*-pyrazole), et la **3-pyrazoline** (2,3-dihydro-1*H*-pyrazole), où les positions de la double liaison sont entre les atomes d'azote, les atomes de carbone-azote et les atomes de carbone, respectivement [90]. Parmi ces trois types, les 2-pyrazolines sont les plus étudiées [91]. Du point de vue de la stabilité, les 1-pyrazolines sont généralement instables et s'isomérisent en 2-pyrazolines, mais il existe quelques rapports sur la synthèse de 1-pyrazolines stables [92,93].

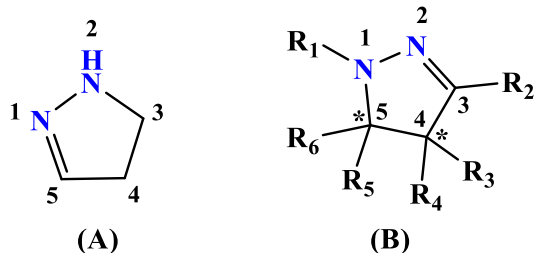


Figure I.13 : Structure chimique d'une pyrazoline

Des recherches antérieures ont montré que les pyrazolines sont un pharmacophore intéressant pour la découverte de médicaments. Ces composés hétérocycliques sont largement présents dans la nature sous forme d'alcaloïdes, de vitamines, de pigments et de constituants de cellules végétales et animales.

II.2.1. Méthodes de synthèse des pyrazolines

La première synthèse du cycle pyrazoline a été décrite par **Knorr et Blank** en 1885 par réduction du 1,3-diphényl-5 méthylpyrazole avec du sodium et de l'éthanol [94]. Dans un autre rapport, **Fischer et Knövenagel** ont synthétisé des dérivés à base de 2-pyrazoline directement par la réaction de phénylhydrazines et d'acroléine et la réaction proposée d'aldéhydes et de cétones α,β -insaturés avec des hydrazines a été acceptée comme une procédure simple et pratique pour la préparation de 2-pyrazolines jusqu'à présent [95].

Dans les premières décennies du 20^{ème} siècle, **Auwers et Heimke** ont apporté des contributions majeures à l'expansion de ce domaine et ont préparé différentes 2-pyrazolines substituées. Ils ont étudié la stabilité des intermédiaires hydrazone et la formation de pyrazoline dans les réactions composées de divers aldéhydes et cétones aromatiques et aliphatiques α,β -insaturés avec des dérivés d'hydrazine [96]. Dans la dernière décennie du 19^{ème} siècle, **Pechmann** a rapporté la synthèse de 2-pyrazolines par cycloaddition du diazométhane à la double liaison du fumarate de diméthyle [97]. Un autre exemple de cycloaddition de composés diazoïques à des oléfines activées a été démontré par **Azzarello en 1906**, en utilisant la réaction de la benzalacétone avec le diazométhane dans l'éther anhydre, et l'exactitude de cette voie de synthèse a été confirmée par **Smith et Howard en 1943** [98].

Les 2-pyrazolines sont également utilisées comme synthon dans la synthèse organique due au cycle 2-pyrazoline qui peut avoir différentes substitutions à quatre positions, dont N₁, C₃, C₄ et C₅ (**Figure I.13**, structure **B**). Il est à noter également que ce cycle peut être chiral aux positions C₄ et C₅ et, par conséquent, de nombreuses méthodes ont été rapportées pour la synthèse de 2-pyrazolines substituées [99] et 2-pyrazolines chirales, mais les principales

procédures générales disponibles pour la préparation de 2-pyrazolines de structure diverse sont les suivantes [100]:

- a) Réaction d'aldéhydes et de cétones α,β -insaturés avec des hydrazines.
- b) Réaction de α,β -énones et d'esters d'acides carboxyliques avec des diazoalcanes.
- c) Réaction des nitrilimines avec les oléfines et les α,β -énones.

II.2.2. Activités biologiques de la pyrazoline

Les pyrazolines trouvent leur application comme alcaloïdes, vitamines, pigments, etc [101]. L'antipyrine (2,3-diméthyl-1-phényl-3-pyrazolin-5-one) a été le premier dérivé de la pyrazoline utilisé dans le traitement de l'inflammation et de la douleur [102]. La présence de cette fraction dans plusieurs composés actifs a encouragé les chercheurs à concevoir et à synthétiser de nouveaux dérivés de la pyrazoline possédant une gamme étendue d'effets biologiques [91].

II.2.2.1. La pyrazoline comme agent antimicrobien

Dilesh Indorkar et al (2015) ont synthétisé des dérivés de 1-acétyl-3-(4-nitrophényl)-5-(phényl substitué)-2-pyrazoline (**S1**, **Figure I.14**) et ont évalué leur activité antimicrobienne. Dans cette étude, une série de dérivés 1,3,5-trisubstitués de la pyrazoline-2 ont été synthétisés en introduisant des anneaux furaniques considérés comme une sous-structure bioactive dans l'échafaudage des pyrazolines et testés pour leurs activités contre six champignons phytopathogènes *in-vitro*. Les essais biologiques préliminaires ont indiqué que presque tous les composés synthétisés avaient des effets variables d'inhibition de la croissance sur les champignons pathogènes testés [103].

P.M. Sivakumar et al (2010) ont synthétisé des 1, 3, 5-triphényl-2 pyrazolines (**S2**, **Figure I.14**). Les tests effectués sur ces composés confirment leur activité antibactérienne contre six micro-organismes, à savoir *Bacillus subtilis* NCIM 2718, *Staphylococcus aureus* NCIM 5021, *Salmonella typhi* NCIM 2501, *Enterobacter aerogenes* NCIM 5139, *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5029 et *Proteus vulgaris* NCIM 2813 par la méthode de dilution double en utilisant la Résazurine comme colorant indicateur [104].

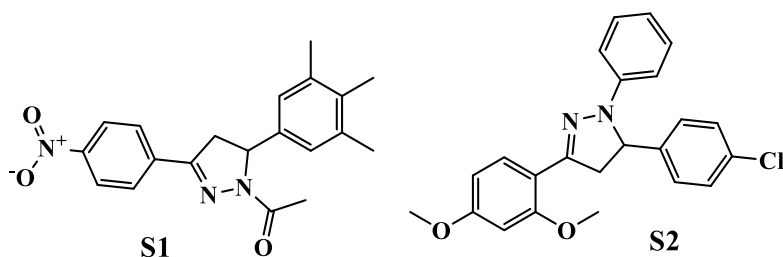


Figure I.14 : Dérivés de pyrazolines présentant une activité antimicrobienne.

II.2.2.2. La pyrazoline comme agent antituberculeux

M. Shaharyar et al ont synthétisé et rapporté l'activité antimycobactérienne in-vitro des *N1*-isonicotinoyl-3-(4'-hydroxy-3'-méthylphényl)-5-(phényl substitué)-2 pyrazolines. Parmi les composés synthétisés, le composé (5-(2-chlorophényl)-3-(4-hydroxy-3-méthylphényl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl)(pyridin-4-yl)méthanone (**S3**, **Figure I.15**) s'est avéré être l'agent le plus actif contre *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) et *M. tuberculosis* résistant à l'INH (INHR-MTB), avec une concentration minimale inhibitrice de 0,26 μm [105].

Les auteurs Mohamed Ashraf Ali et al ont synthétisé une série de 5-(4-(substitué) phényl)-3-(4-hydroxy-3-méthylphényl)-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazolyl-2-toluidino méthane thione et 5-(substitué) phényl-3-(4-hydroxy-3-méthylphényl)-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazolyl-2-méthoxyanilino méthane thione à partir de l'hydrazine hydrate, les chalcones et l'isothiocyanate d'aryle. Parmi les composés synthétisés, le composé anilino-3-(4-hydroxy-3-méthylphényl)-5-(2,6-dichlorophényl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolylméthanethione (**S4**, **Figure I.15**) s'est avéré être l'agent le plus actif contre *M. tuberculose* H37Rv [106].

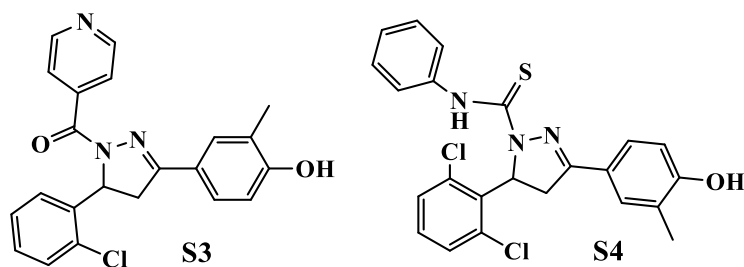


Figure I.15 : Dérivés de pyrazolines présentant une activité antituberculeuse.

II.2.2.3. La pyrazoline comme agent antipaludéen

Shilpy Aggarwal et al ont synthétisé une série de pyrazolines 1,3,5-trisubstituées (**S5**, **Figure I.16**) et ont été criblées *in-vitro* contre la souche 3D7 de *Plasmodium falciparum* sensible à la chloroquine (CQ). La plupart des composés ont montré une activité antipaludique *in-vitro* prometteuse contre la souche sensible à la CQ. L'étude RSA a montré

que la substitution de la quinoléine en position N-1 a montré une activité maximale et que les composés ayant un groupe attracteur d'électrons en position para sur le cycle phényle ont montré une meilleure activité antipaludique que le groupe libérateur d'électrons [107].

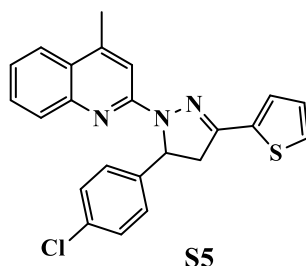


Figure I.16 : 2-[5-(4-chlorophenyl)-3-(thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl]-4-methylquinoline.

B.N.Acharya et al ont rapporté la synthèse de dérivés de pyrazolines 1,3,5-trisubstituées et ont été évalués pour leur efficacité anti-malaria *in-vitro* contre les souches de *Plasmodium falciparum* sensibles et résistantes à la chloroquine. L'activité d'inhibition de la formation de la β -hématine (BHIA50) des pyrazolines a été déterminée et corrélée à l'activité antipaludique [108].

II.2.2.4. La pyrazoline comme agent anti-inflammatoire

R.S.Kumar et al ont rapporté quelques nouveaux analogues de pyrazole à partir d'une technique de condensation utilisant l'irradiation par ultrasons. Les composés synthétisés ont été analysés pour leur activité anti-inflammatoire et le composé 2-((5-hydroxy-3-méthyl-1H-pyrazol-4-yl) (4-nitrophényl) méthyl) hydrazine carboxamide (**S6**, **Figure I.17**) a montré une meilleure activité anti-inflammatoire, comparé aux médicaments standards (Diclofenac sodium) [109].

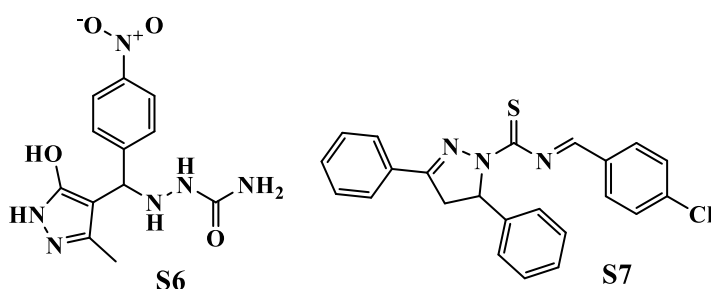


Figure I.17 : Dérivés de pyrazolines ayant une activité anti-inflammatoire.

Harathi et al ont synthétisé divers dérivés de l'amide de l'acide 3, 5 diphényl-4, 5-dihydro-pyrazole-1-carbothioïque (**S7**, **Figure I.17**) en utilisant des chalcones et des thiosemicarbazides respectifs. Ils ont évalué l'activité anti-inflammatoire des composés

synthétisés par la méthode de l'œdème de la patte de rat induit par l'albumine d'œuf et l'ont comparé à l'agent anti-inflammatoire standard Diclofenac Sodium. Les composés avec des groupes attracteurs d'électrons Cl, NO₂ ont montré une meilleure activité anti-inflammatoire [110].

II.2.2.5. La pyrazoline comme agent anticancéreux

Mohammad Abdel-Halim et al ont rapporté que des dérivés avec des échafaudages de pyrazoline 1,3,5-tri-substituée et de pyrazoline 1,3,4,5-tétra-substituée ont été synthétisés et testés pour leurs effets inhibiteurs contre les lignées de cellules tumorales humaines (p53+/+ HCT116 et p53-/-H129928) [111].

Bhat et al ont synthétisé une série de pyrazoles substitués et ont également évalué leur activité cytotoxique in-vitro contre un panel de lignées cellulaires cancéreuses humaines. Ils ont conclu que les pyrazoles tels que les 3,5-diphényl,1*H*-pyrazoles (**S8**, **Figure I.18**) sont des agents cytotoxiques puissants [112].

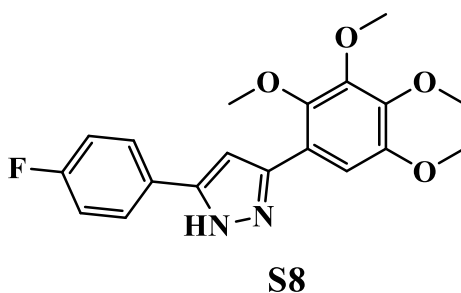


Figure I.18 : 5-(4-fluorophenyl)-3-(2,3,4,5-tetramethoxyphenyl)-1*H*-pyrazole.

II.2.2.6. La pyrazoline comme agent anticonvulsivant

Mohamed Jawed Ahsan a synthétisé le 3-substituted-*N*-aryl-6,7-dimethoxy-3a,4-dihydro-3*H*-indenopyrazole-2-carboxamide (**S9**, **Figure I.19**). Ces composés ont montré des activités anticonvulsivantes et neuroprotectrices significatives [113].

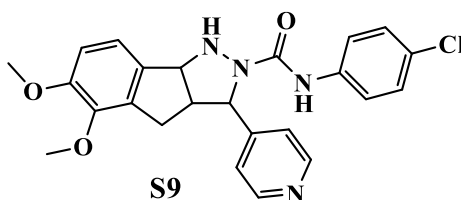


Figure I.19 : *N*-(4-chlorophenyl)-5,6-dimethoxy-3-(pyridin-4-yl)-3a,4,8b-tetrahydroindeno[1,2-c]pyrazole-2(1*H*)-carboxamide.

Nagihan Beyhan et al ont rapporté que certaines 2-Pyrazolines dérivées de chalcones avaient une activité anticonvulsive. Diverses 3,5-disubstituées-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole-1-

carbothioamides et N-3,5-trisubstituées-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole-1-carboxamides ont été évaluées pour leur activité anticonvulsivante en utilisant la crise induite par le pentylènetétrazole (PTZ) et la crise d'électrochocs maximale (CEM). Le dépistage anticonvulsivant a indiqué que parmi les composés testés, les dérivés de 2-pyrazoline-1-carboxamide portant des groupes 5-bromothiophen, 5-chlorothiophen et 2,6-dichlorophenyl ont montré une activité remarquable dans le test PTZ [114].

III. Molécules hybrides

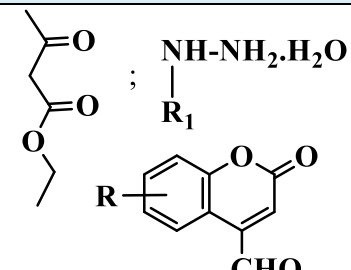
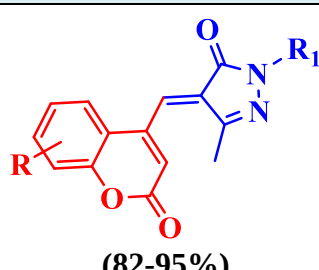
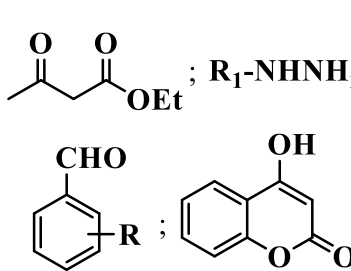
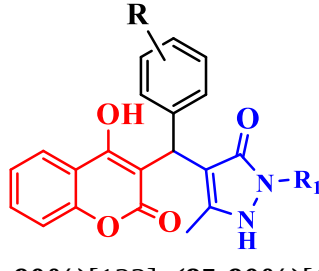
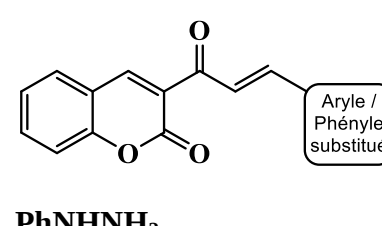
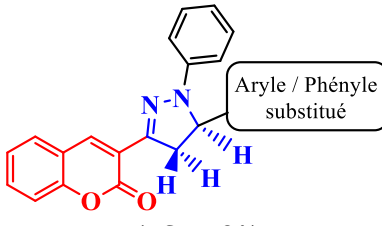
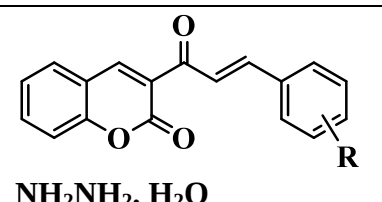
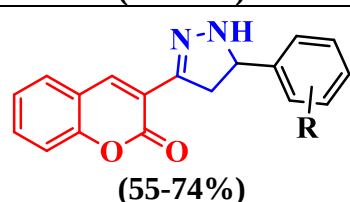
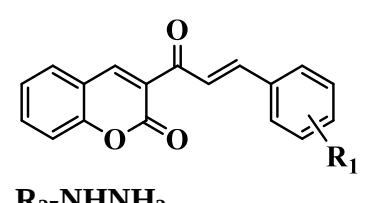
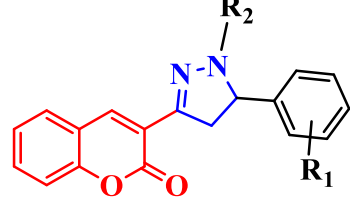
Il est bien connu que de nombreuses maladies ne sont pas causées par le défaut d'une cible biologique spécifique telle qu'une enzyme ou un récepteur, mais reposent sur une multitude de processus biochimiques et physiologiques qui se produisent souvent simultanément [115]. Des exemples de telles maladies multifactorielles sont l'hypertension idiopathique et les troubles neurodégénératifs tels que la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer (exemple : le Donépézil). De nombreux projets visent à concevoir et à obtenir des médicaments à cibles multiples pour traiter des maladies multifactorielles complexes par le biais de la polypharmacologie, car les stratégies conventionnelles "une cible, une molécule" ne permettent pas de traiter adéquatement ces états pathologiques [115]. Récemment, le concept de molécules hybrides a été l'un des sujets les plus intéressants en chimie médicinale. Son principe repose sur la combinaison de fragments pharmacophores de différentes substances bioactives pour produire un nouveau composé hybride présentant une affinité et une efficacité accrues par rapport aux médicaments parents. En outre, cette stratégie peut aboutir à des composés présentant un profil de sélectivité modifié, des modes d'action différents et/ou doubles et des effets secondaires indésirables réduits [116].

Grâce à cette approche, plusieurs groupes de recherche ont conçu et synthétisé de nombreuses molécules hybrides. Parmi les exemples les plus connus de ces molécules figurent la **ziprasidone**, la **duloxétine** et le **ladostigil** pour les maladies multifactorielles du SNC, ainsi que le **sunitinib** et le **lapatinib** pour le traitement du cancer [117]. L'hybridation ou le couplage de différents dérivés de coumarine avec diverses molécules bioactives telles que le resvératrol, l'acide α -lipoïque, les sulfonamides maléimides et la pyrazoline ont produit de nouvelles molécules hybrides, dotées de propriétés vasorelaxantes, antioxydantes et anti-inflammatoires, antiplaquettaires et anticancéreuses [118–121].

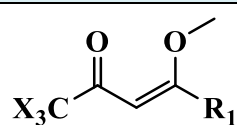
Les coumarines, les pyrazolones et les pyrazolines sont dotés de plusieurs activités biologiques. Leurs applications dans le domaine de la recherche de médicaments et

l'introduction de la stratégie d'hybridation moléculaire ont conduit à la conception d'une large gamme de molécules hybrides aux propriétés pharmacologiques intéressantes englobant deux ou trois pharmacophores. Le **tableau I.3** ci-dessous présente quelques molécules à effet thérapeutique.

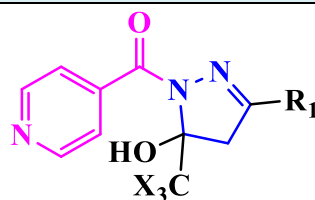
Tableau I.3 : Molécules hybrides contenant les structures coumarine, pyrazoline, pyrazolone et leurs activités biologiques.

Réactifs	Produits (Rdt %)	Activités biologiques	Réf
Molécules hybrides Coumarine-Pyrazolone			
	 (82-95%)	Anticancéreuse et anti-inflammatoire	[8]
	 (60-90%)[122]; (85-90%)[123]	Antimicrobienne et antioxydante [122] Anti-inflammatoire [123]	
Molécules hybrides Coumarine-Pyrazoline			
	 (46-71%)	Anti-inflammatoire et analgésique	[124]
	 (55-74%)	Anticancéreuse	[125]
	 (50-72%)	Antipaludique	[126]

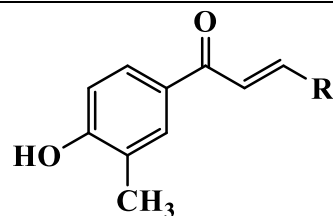
Molécules hybrides Pyrazoline-INH



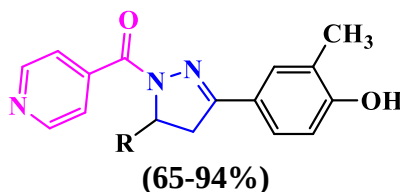
Isonicotinyl hydrazine (INH)



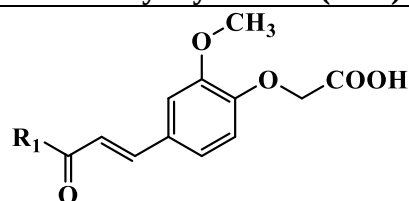
Antimycobactérienne [127]



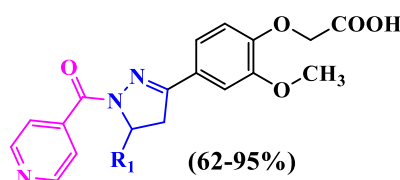
Isonicotinyl hydrazine (INH)



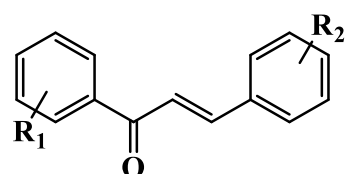
Antimycobactérienne [105]



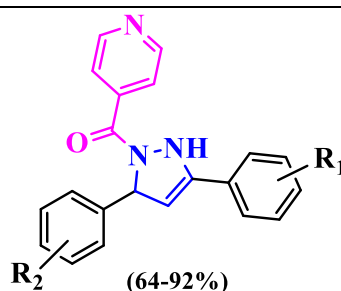
Isonicotinyl hydrazine (INH)



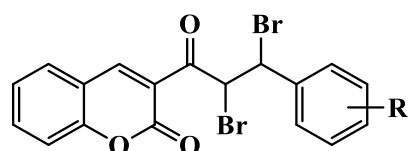
Antituberculeuse [128]



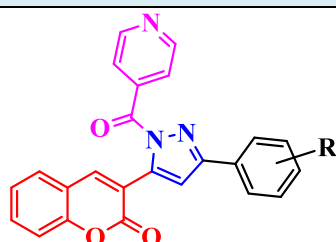
Isonicotinyl hydrazine (INH)

Antioxydante
Antimycobactérienne [129]
Antimicrobienne
Anticancéreuse

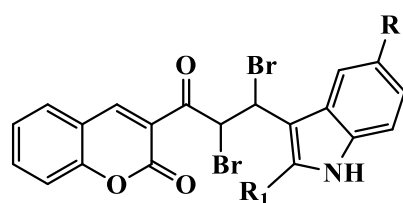
Molécules hybrides Coumarine-pyrazoline-INH



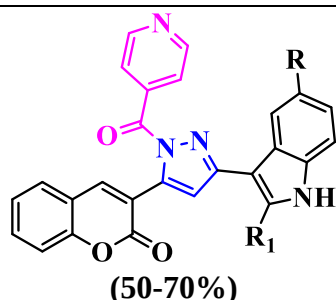
Isonicotinyl hydrazine (INH)



Antimycobactérienne [130]



Isonicotinyl hydrazine (INH)

Antioxydante
Antimycobactérienne [131]
Antimicrobienne

IV. Activité antioxydante

Le stress oxydatif est un état pathologique dans lequel les espèces réactives de l'oxygène/azote (ERO/ERN) submergent les défenses antioxydantes de l'organisme, entraînant une modification oxydative des macromolécules biologiques (c'est-à-dire lipides, protéines, ADN), des lésions tissulaires et une accélération de la mort cellulaire¹, ce qui constitue le fondement de nombreuses maladies [132]. Pour cette raison, les antioxydants, en particulier les antioxydants alimentaires, peuvent être bénéfiques pour la santé humaine en raison de leur capacité à réduire le stress oxydatif via une activité antioxydante [133].

Les espèces présumées ERO et non-radicalaires sont résumées dans **le tableau I.4** [134].

Tableau I.4 : Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et espèces non radicalaires

Espèces réactives de l'oxygène		Espèces non radicalaires	
Radical hydroxyle	$\text{HO}^\bullet$	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical superoxyde	$\text{O}_2^\bullet$	Oxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Radical hydroperoxyde	$\text{HOO}^\bullet$	Ozone	O_3
Radical lipidique	$\text{L}^\bullet$	Hydroperoxyde de lipide	LOOH
Radical peroxyde lipidique	$\text{LOO}^\bullet$	Acide hypochloreux	HOCl
Radical peroxyde	$\text{ROO}^\bullet$	Peroxynitrite	ONOO^-
Radical alkoxyle lipidique	$\text{LO}^\bullet$	Trioxyle de diazote	N_2O_3
Radical dioxyde d'azote	$\text{NO}_2^\bullet$	Acide nitreux	HNO_2
Radical oxyde nitrique	$\text{NO}^\bullet$	Chlorure de nitrile	NO_2Cl
Radical thiyle	$\text{RS}^\bullet$	Anion nitroxyle	NO^-
Radical protéique	$\text{P}^\bullet$	Cation nitrosyle	NO^+

IV.1. Les antioxydants

De nombreuses études montrent que les antioxydants jouent un rôle essentiel dans le maintien de la santé humaine, la prévention et le traitement des maladies, en raison de leur capacité à réduire le stress oxydatif. La mesure de l'activité/capacité antioxydante des aliments et des échantillons biologiques est donc essentielle non seulement pour garantir la qualité des aliments fonctionnels, mais surtout pour étudier l'efficacité des antioxydants alimentaires dans la prévention et le traitement des maladies liées au stress oxydatif.

Les antioxydants sont des substances naturelles ou synthétiques qui peuvent prévenir ou retarder les dommages cellulaires oxydatifs causés par des oxydants physiologiques ayant

des potentiels de réduction nettement positifs, couvrant les espèces réactives de l'oxygène (ERO)/les espèces réactives de l'azote (ERN) et les radicaux libres (c'est-à-dire des molécules ou des ions instables ayant des électrons non appariés) [132]. Les molécules ayant des propriétés antioxydantes peuvent être produites de manière endogène (superoxyde dismutase SOD, la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px)) ou ingérées de manière exogène (vitamines E et C) par l'alimentation ou les compléments alimentaires [134].

IV.2. Évaluation de la capacité antioxydante

Les diverses méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante se répartissent en trois catégories distinctes, à savoir la spectrométrie, les essais électrochimiques et la chromatographie [134], comme présenté dans le **tableau I.5**.

Tableau I.5 : Différentes techniques utilisées pour mesurer l'activité antioxydante [134,135]

Techniques	Test de capacité antioxydante	Détermination du produit final
Spectrométrie	ORAC	Perte de la fluorescence de la fluorescéine
	HORAC	Perte de la fluorescence de la fluorescéine
	TRAP	Extinction de la chimioluminescence
	CUPRAC	Colorimétrie
	FRAP	Colorimétrie
	PFRAP	Colorimétrie
	ABTS	Colorimétrie
	DPPH	Colorimétrie
Analyse fluorimétrique		Enregistrement de la fluorescence/spectres d'excitation/émission
Technique électrochimique	Voltamétrie	Mesure du courant du pic cathodique/anodique
	Ampérométrie	Mesure du courant généré par l'oxydation/réduction d'un analyte électroactif.
	Biampérométrie	Mesure du courant circulant entre deux électrodes de travail identiques, à faible différence de potentiel et immergées dans une solution contenant l'échantillon analysé et un couple redox réversible.
Chromatographie	Chromatographie en phase gazeuse	Détection par ionisation de flamme ou conductivité thermique
	Haut de gamme performance chromatographie liquide	Détection UV-Vis (par exemple, réseau de diodes), détection fluorimétrique, spectrométrie de masse ou détection électrochimique.

IV.2.1. Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Parmi toutes les méthodes disponibles, la méthode DPPH a été largement appliquée pour estimer l'activité antioxydante. La méthode présente l'avantage d'être rapide, simple et peu coûteuse et fournit des informations de première main sur la capacité antioxydante globale du système d'essai.

Le test de neutralisation du DPPH est basé sur le transfert d'électrons des antioxydants afin de neutraliser le radical DPPH. La réaction s'accompagne d'un changement de couleur du DPPH mesuré à 517 nm, et la décoloration agit comme un indicateur de l'activité antioxydante (**Figure I.20**) [136].

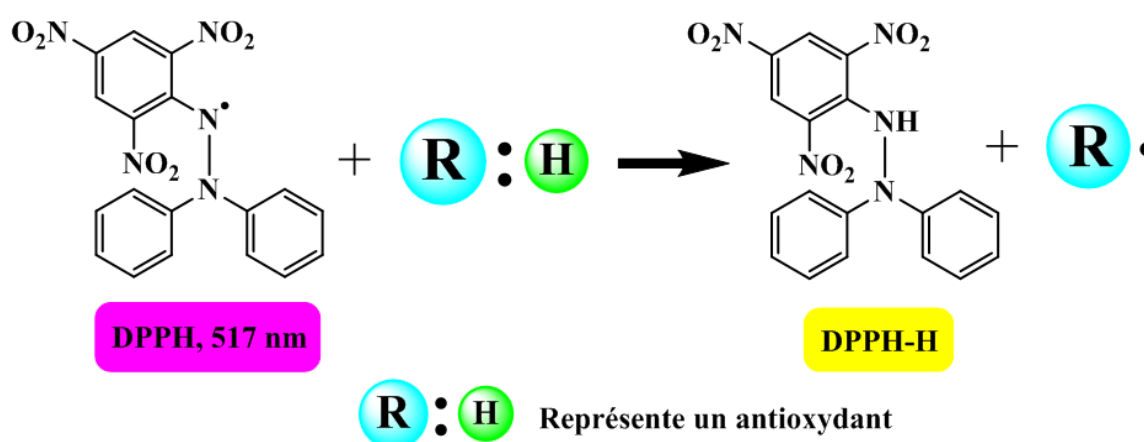


Figure I.20 : Mécanisme de réaction du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) avec un antioxydant

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage d'inhibition selon la relation (1) suivante :

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

Avec :

A_0 : Absorbance à 517 nm du standard (contient tous les éléments mais sans aucun échantillon).

A_1 : Absorbance à 517 nm de l'échantillon.

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la concentration inhibitrice CI_{50} , qui est définie comme la concentration efficace de l'antioxydant nécessaire pour réduire la concentration initiale de DPPH de 50%.

V. Activité Antifongique

Les agents pathogènes fongiques sont de plus en plus proches et capables de provoquer de graves infections systémiques et locales chez les êtres humains. Bien qu'il existe quelques médicaments antifongiques disponibles sur le marché, la plupart d'entre eux ne parviennent pas à traiter le nombre de cas de maladie et à réduire la charge des infections fongiques, ces médicaments ne sont pas efficaces, principalement en raison de leur association à un certain nombre d'effets secondaires et au développement de souches résistantes aux médicaments [54,137]. Les échinocandines sont la seule nouvelle classe de médicaments antifongiques à avoir fait son apparition en clinique depuis plus de 30 ans [138].

Par conséquent, le développement de nouveaux agents antifongiques plus efficaces, plus sûrs et plus abordables, qui sont non seulement actifs contre les souches fongiques et les souches résistantes aux médicaments, mais qui possèdent également un nouveau mode d'action, est une priorité absolue dans le secteur médical [139].

V.1. Infections fongiques

Les infections fongiques constituent une menace permanente et grave pour la santé et la vie humaines. Les infections fongiques médicalement importantes peuvent être classées en trois grandes catégories : i) les mycoses superficielles, ii) les mycoses sous-cutanées et iii) les mycoses systémiques (invasives) causées par des champignons pathogènes et opportunistes [140]. Les trois principaux agents pathogènes opportunistes responsables de la plupart de ces infections sont *Candida spp*, *Aspergillus spp* et *Cryptococcus neoformans* [140]. *Candida spp.* (73,4 %) étaient les agents pathogènes les plus courants, suivis par *Aspergillus spp.* (13,3 %) et d'autres levures (6,2 %) [141].

Aspergillus et *Candida spp.* représentent la majorité des infections documentées. Les tendances épidémiologiques récentes indiquent une évolution vers des infections par les *Aspergillus spp.* et les *Candida spp. non albicans*, ainsi que par des champignons auparavant peu courants qui présentent souvent une sensibilité réduite aux agents antifongiques actuels. Cliniquement, la candidose et l'aspergillose représentent entre 80 % et 90 % des infections fongiques systémiques chez les patients immunodéprimés [142].

V.2. Méthode d'évaluation de l'activité antifongique

Diverses méthodes de laboratoire peuvent être utilisées pour évaluer ou cribler l'activité antimicrobienne *in-vitro* d'un extrait ou d'un composé pur. Les méthodes les plus

connues et les plus fondamentales sont la méthode de diffusion sur disque et la méthode de dilution en bouillon ou en gélose [143].

Le test de diffusion sur disque d'agar, mis au point en 1940 [144], est la méthode officielle utilisée dans de nombreux laboratoires de microbiologie clinique pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens de routine. Dans cette procédure bien connue, des plaques de gélose sont inoculées avec un inoculum standardisé du micro-organisme à tester. Ensuite, des disques de papier wattman (d'environ 6 mm de diamètre), contenant le composé à tester à une concentration souhaitée, sont placés sur la surface de la gélose. Les boîtes de Pétri sont incubées dans des conditions de croissance appropriées. En général, l'agent antimicrobien diffuse dans la gélose et inhibe la germination et la croissance du micro-organisme testé, puis les diamètres des zones de croissance d'inhibition sont mesurés (**Figure I.21**) [143].

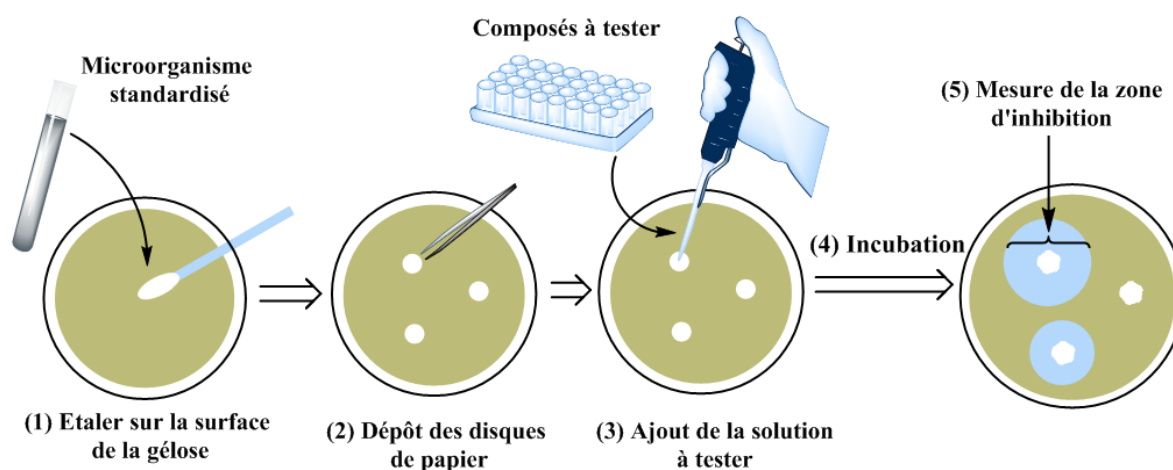


Figure I.21: Schéma de la méthode de diffusion sur disque de gélose [145].

VI. Docking moléculaire

La mécanique moléculaire est une méthode générale permettant de décrire le système réactionnel des molécules et de prédire leurs propriétés physiques microscopiques. Au cours des vingt dernières années, le développement de la technologie de simulation moléculaire (SM) a présenté des progrès significatifs, cette technologie comprend la modélisation de l'homologie, le docking moléculaire et la simulation de la dynamique moléculaire et combine le calcul de l'énergie libre [146]. Parmi ces méthodes, le docking moléculaire est la plus utilisée dans la recherche en modélisation moléculaire [146].

Le docking moléculaire est une technique qui permet de prédire l'orientation préférée, l'affinité et l'interaction d'un ligand dans le site de liaison d'une protéine [147]. Le processus de docking implique principalement une correspondance spatiale et une correspondance énergétique entre le ligand et le récepteur pour une conformation optimale et se concentre sur la concordance. En outre, pendant le processus de liaison du ligand au récepteur, la structure du site de liaison change constamment jusqu'à ce qu'une liaison stable soit établie avec succès. Ce n'est alors qu'une distribution des charges et la configuration du système de liaison peuvent être déterminées. Les nombreux processus interactifs entre les récepteurs et les ligands comprennent la liaison hydrogène, l'interaction électrostatique, les forces de van der Waals et l'interaction hydrophobe [146].

En général, la liaison hydrogène est produite par une liaison covalente des atomes d'hydrogène avec des atomes plus électronégatifs, comme l'oxygène et l'azote [148]. L'interaction électrostatique, y compris la gravité électrostatique et la répulsion électrostatique, manque de directionnalité spatiale. Les forces de van der Waals repoussent ou attirent les molécules, qui sont nettement plus faibles que les liaisons chimiques. L'interaction hydrophobe fait référence au phénomène de regroupement des groupes hydrophobes pour éviter l'eau et l'intensité de ces forces [146].

VI.1. Processus de docking

Le procédé de docking peut être divisé en trois parties principales : (1) la préparation des ligands et des macromolécules. Cette préparation est effectuée sur la base de champs de force permettant la représentation de surfaces et de cavités comme sites potentiels de ligands ; (2) la définition du type de docking : rigide ou flexible ; et (3) la définition de la stratégie de recherche de conformations de ligands : systématique ou stochastique [149]. Les différentes fonctions de notation et les algorithmes de recherche appliqués au docking moléculaire ont été mis en évidence dans la **figure I.22**.

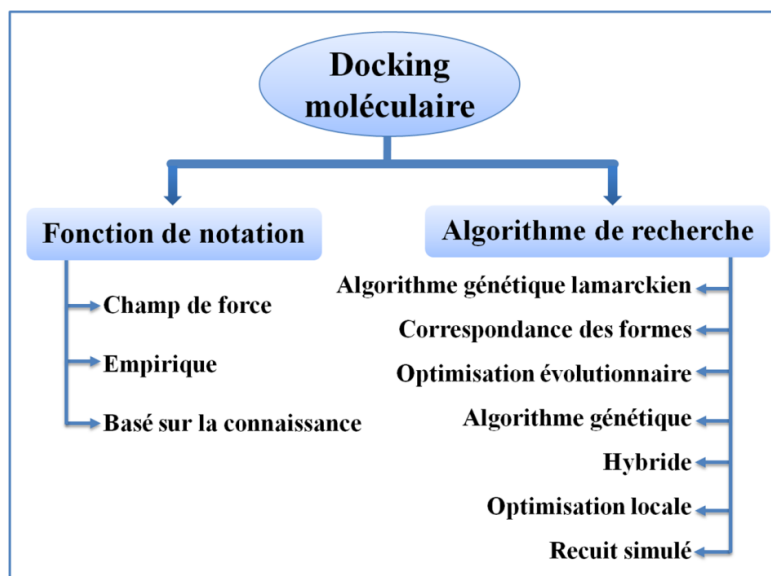


Figure I.22 : Algorithmes de recherche et fonctions de notation utilisés dans le docking moléculaire [149].

Plusieurs outils de calcul comme AutoDock, AutoDock Vina, Gilde, DOCK, GOLD, FlexX et Surflex, et de nombreux serveurs de docking, comme ZDOCK, HDOCK, ClusPro et SwissDock, sont disponibles pour exécuter les procédures de docking moléculaire [150]. Bien que les étapes de base des processus de docking soient plus ou moins identiques, ces programmes de docking varient fondamentalement en ce qui concerne l'algorithme de docking, la stratégie de recherche de ligands et les techniques de fonction de notation [151].

VI.2. Applications du docking moléculaire

Le docking est le plus souvent employé pour la découverte de médicaments, car la majorité des médicaments sont composés de minuscules composés organiques [152]. Le docking moléculaire peut être employé pour :

▪ Identification de la cible

Le docking, associé à une fonction de score, permet de cribler rapidement de vastes bases de données de médicaments possibles *in silico* afin de trouver des composés capables de se lier à une cible d'intérêt particulière [153].

▪ Optimisation des pistes

Le docking peut être utilisé pour anticiper l'emplacement et la position relative de l'interaction d'un ligand avec une protéine (également appelée mode ou pose de liaison). Ces données peuvent être utilisées pour développer des analogues plus puissants et sélectifs [152].

- **Biorémédiation**

Le docking protéine-ligand peut également être utilisé pour prédire les polluants qui peuvent être dégradés par des enzymes [154].

VII. Conclusion

Nous avons démontré à travers cette partie l'intérêt que suscite les hétérocycles azotés et oxygénés ainsi que leur grande importance dans le domaine thérapeutique. Nous avons présenté une collection de travaux récents qui mettent en évidence le large éventail d'activités pharmacologiques attribuables aux coumarines, pyrazolones et pyrazolines. Ainsi que leurs différentes méthodes de synthèse et la possibilité de modifier facilement ces échafaudages naturels pour réaliser des études sur les relations structure-activité. La stratégie d'hybridation moléculaire visant à synthétiser des produits hautement fonctionnels est l'une des méthodes qui offrent la possibilité de créer de nouveaux composés multicycliques avec une activité biologique nouvelle ou améliorée.

Actuellement, le docking moléculaire est devenu un outil de plus en plus important pour la découverte de médicaments, il est couramment utilisé afin d'étudier la cible biologique des médicaments et réduire ainsi les essais expérimentaux.

Références bibliographiques

- [1] U. Bachor, M. Maczyński, Selected β 2-, β 3-and β 2,3-amino acid heterocyclic derivatives and their biological perspective, *Molecules*. 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26020438>.
- [2] O. Ebenezer, M.A. Jordaan, G. Carena, T. Bono, M. Shapi, J.A. Tuszynski, An Overview of the Biological Evaluation of Selected Nitrogen-Containing Heterocycle Medicinal Chemistry Compounds, *International Journal of Molecular Sciences*. 23 (2022) 1–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms23158117>.
- [3] R.M. Jebir, Y.F. Mustafa, Natural Coumarin-Lead Compounds: A Review of Their Medicinal Potentials, 18 (2021).
- [4] N. Kerru, L. Gummidi, S. Maddila, K.K. Gangu, S.B. Jonnalagadda, A review on recent advances in nitrogen-containing molecules and their biological applications, *Molecules*. 25 (2020) 1–42. <https://doi.org/10.3390/molecules25081909>.
- [5] Y.L. Fan, X. Ke, M. Liu, Coumarin–triazole Hybrids and Their Biological Activities, *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 55 (2018) 791–802. <https://doi.org/10.1002/jhet.3112>.
- [6] F. Shen, Z. Wang, S. Wu, S. Ren, R. Man, B. Wang, H. Zhu, Synthesis of novel hybrids of pyrazole and coumarin as dual inhibitors of COX-2 and 5-LOX, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 27 (2017) 3653–3660. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.07.020>.
- [7] R. Kenchappa, Y.D. Bodke, A. Chandrashekar, M. Aruna Sindhe, S.K. Peethambar, Synthesis of coumarin derivatives containing pyrazole and indenone rings as potent antioxidant and antihyperglycemic agents, *Arabian Journal of Chemistry*. 10 (2017) S3895–S3906. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.029>.
- [8] R.C. Kulkarni, J.M. Madar, S.L. Shastri, F. Shaikh, N.S. Naik, R.B. Chougale, L.A. Shastri, S.D. Joshi, S.R. Dixit, V.A. Sunagar, Green synthesis of coumarin-pyrazolone hybrids: In vitro anticancer and anti-inflammatory activities and their computational study on COX-2 enzyme, *Chemical Data Collections*. 17 (2018) 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2018.11.004>.
- [9] S. Mamidala, S.R. Peddi, R.K. Aravilli, P.C. Jilloju, V. Manga, R.R. Vedula, Microwave irradiated one pot, three component synthesis of a new series of hybrid coumarin based thiazoles: Antibacterial evaluation and molecular docking studies, *Journal of Molecular Structure*. 1225 (2021) 129114. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129114>.
- [10] L.R. Singh, S.R. Avula, S. Raj, A. Srivastava, G.R. Palnati, C.K.M. Tripathi, M. Pasupuleti, K. V. Sashidhara, Coumarin-benzimidazole hybrids as a potent antimicrobial agent: Synthesis and biological elevation, *Journal of Antibiotics*. 70 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.70>.
- [11] K.M. Amin, A.A.M. Eissa, S.M. Abou-Seri, F.M. Awadallah, G.S. Hassan, Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-pyrazoline hybrids endowed with phenylsulfonyl moiety as antitumor agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 60 (2013) 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.12.004>.

- [12] L. Saher, M. Makhoulfi-Chebli, L. Dermeche, S. Dermeche, 10- (4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2 H -pyran-3-yl) -3-methyl-1 H , 10 H - pyrano [4 , 3- b] chromen-1-ones from a pseudo-multicomponent reaction and evaluation of their antioxidant activity 10- (4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2 H -pyran-3-yl) -3-methyl-1 H , Tetrahedron. 74 (2018) 872–879. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.01.009>.
- [13] A. Benazzouz, M. Makhoulfi-Chebli, S.M. Hamdi, B. Boutemour-Kheddis, A.M.S. Silva, M. Hamdi, Study of novel fluorescent coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones dyads. Estimation of ground- and excited-state dipole moments from a solvatochromic shift, Journal of Molecular Liquids. 219 (2016) 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.02.095>.
- [14] A. Benazzouz-Touami, D. Hikem-Oukacha, K.O. Lamara, S. Halit, S. Terrachet-Bouaziz, M. Makhoulfi-Chebli, Synthesis, Biological activities and Molecular Docking study of 3-(3-oxobutanoyl)-2H-chromen-2-one derivatives, Chemical Data Collections. 36 (2021) 100792. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2021.100792>.
- [15] K.N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity, BioMed Research International. 2013 (2013) 1–14. <https://doi.org/10.1155/2013/963248>.
- [16] J.R.S. Hoult, M. Payá, Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential, General Pharmacology. 27 (1996) 713–722. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(95\)02112-4](https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)02112-4).
- [17] S.M. Yang, G.Y. Shim, B.G. Kim, J.H. Ahn, Biological synthesis of coumarins in Escherichia coli, Microbial Cell Factories. 14 (2015) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0248-y>.
- [18] T.M. Costa, L.B.B. Tavares, D. de Oliveira, Fungi as a source of natural coumarins production, Applied Microbiology and Biotechnology. 100 (2016) 6571–6584. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7660-z>.
- [19] S.F. Jasim, Y.F. Mustafa, A review on coumarin backbone: An attractive scaffold for promising bioactive compounds, Iraqi Journal of Pharmacy. 18 (2022) 104–125. <https://doi.org/10.33899/iphr.2022.170402>.
- [20] F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana, E. Uriarte, Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry : Occurrence , Synthesis and Biological Activity, Current Medicinal Chemistry. 12 (2005) 887–916. <https://doi.org/doi:10.2174/0929867053507315>.
- [21] A.A. Al-Amiery, A.Y. Musa, A.A.H. Kadhum, A.B. Mohamad, The Use of Umbelliferone in the Synthesis of New Heterocyclic Compounds, Molecules. 16 (2011) 6833–6843. <https://doi.org/10.3390/molecules16086833>.
- [22] O.M. Abdel, K.M. Amin, N.A. Abdel-latif, T.K. Mohamed, E.Y. Ahmed, T. Maher, Synthesis and antitumor activity of some new xanthotoxin derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry. 44 (2009) 2967–2974. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.01.006>.
- [23] W.D. Wulff, J.S. McCallum, F. Kunng, Two Regiocomplementary Approaches to

- Angular Furanocoumarins with Chromium Carbene Complexes: Synthesis of Sphondin, Thiosphondin, Heratomin, and Angelicin, *Journal of the American Chemical Society*. 110 (1988) 7419–7434. <https://doi.org/doi:10.1021/ja00230a023>.
- [24] P. Magiatis, E. Melliou, A. Skaltsounis, S. Mitaku, P. Renard, A. Pierre, Synthesis and Cytotoxic Activity of Pyranocoumarins of the Seselin and Xanthyletin Series, *Journal Of Natural Products*. 61 (1998) 982–986. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/np9800295>.
- [25] J. Cao, S. Shen, P. Yang, J. Qu, A Catalyst-Free One-Pot Construction of Skeletons of 5 - Methoxyseselin and Alloxanthoxyletin in Water, *Organic Letters*. 15 (2013) 3856–3859. <https://doi.org/doi:10.1021/ol401581p>.
- [26] D.A. Links, J. Dong, Highly enantioselective synthesis of Warfarin and its analogs catalysed by primary amine – phosphinamide bifunctional catalysts †‡, *Organic and Biomolecular Chemistry*. 10 (2012) 1–7. <https://doi.org/10.1039/c2ob26334c>.
- [27] J.K. Augustine, A. Bombrun, B. Ramappa, C. Boodappa, An efficient one-pot synthesis of coumarins mediated by propylphosphonic anhydride (T3P) via the Perkin condensation, *Tetrahedron Letters*. 53 (2012) 4422–4425. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.06.037>.
- [28] M.M. Heravi, S. Khaghaninejad, M. Mostofi, Pechmann reaction in the synthesis of coumarin derivatives, in: *Advances in Heterocyclic Chemistry*, Elsevier, 2014: pp. 1–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800171-4.00001-9>.
- [29] R.H. Vekariya, H.D. Patel, Recent advances in the synthesis of coumarin derivatives via Knoevenagel condensation: A review, *Synthetic Communications*. 44 (2014) 2756–2788. <https://doi.org/10.1080/00397911.2014.926374>.
- [30] L.N. Dutta, M. Bhattacharyya, A.K. Sarkar, A study of the Reformatsky reaction on formylcoumarins, *Canadian Journal of Chemistry*. 73 (1995) 1556–1562. <https://doi.org/10.1139/v95-193>.
- [31] T. Harayama, K. Nakatsuka, H. Nishioka, K. Murakami, N. Hayashida, H. Ishii, Convenient Synthesis of a Simple Coumarin from Salicylaldehyde and Wittig Reagent. II: Synthesis of Bromo- and Methoxycarbonylcoumarins, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 42 (1994) 2170–2173. <https://doi.org/doi:10.1248/cpb.42.2170>.
- [32] K. Kasperkiewicz, M.B. Ponczek, J. Owczarek, P. Guga, E. Budzisz, Antagonists of Vitamin K-popular coumarin drugs and new synthetic and natural coumarin derivatives, *Molecules*. 25 (2020) 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules25061465>.
- [33] Y.K. Al-Majedy, A.A.H. Kadhum, A.A. Al-Amiery, A.B. Mohamad, Coumarins: The antimicrobial agents, *Systematic Reviews in Pharmacy*. 8 (2017) 62–70. <https://doi.org/10.5530/srp.2017.1.11>.
- [34] J. Grover, S.M. Jachak, Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development, *RSC Advances*. 5 (2015) 38892–38905. <https://doi.org/10.1039/c5ra05643h>.
- [35] S. Randelović, R. Bipat, A Review of Coumarins and Coumarin-Related Compounds

- for Their Potential Antidiabetic Effect, *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*. 14 (2021) 1–9. <https://doi.org/10.1177/117955142111042023>.
- [36] T. Al-Warhi, A. Sabt, E.B. Elkaeed, W.M. Eldehna, Recent advancements of coumarin-based anticancer agents: An up-to-date review, *Bioorganic Chemistry*. 103 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104163>.
- [37] D. Srikrishna, A Review on Pharmacological Properties of Coumarins, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 18 (2017) 113–141. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160801094919>.
- [38] Hiran Kanti Santra, D. Banerjee, Natural Products as Fungicide and Their Role in Crop Protection, in: *Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture*, 2020: pp. 131–219.
- [39] R. Mark, X. Lyu, J.J.L. Lee, R. Parra-saldívar, W.N. Chen, Sustainable production of natural phenolics for functional food applications, *Journal of Functional Foods*. 57 (2019) 233–254. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.008>.
- [40] T.M. Pereira, D.P. Franco, F. Vitorio, A.E. Kummerle, Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Years, *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 18 (2018) 124–148. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180329115523>.
- [41] A.H.M.E. Wahy, A.R. Ismail, M.T.H.A. Kana, N.A. Negm, Synthesis and characterization of novel bis-(4-methylcoumarin) derivatives as photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 77 (2017) 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.05.006>.
- [42] A. Couttolenc, Á. Díaz-Porras, C. Espinoza, M.E. Medina, Á. Trigos, On the primary and secondary antioxidant activity from hydroxy-methylcoumarins: experimental and theoretical studies, *Journal of Physical Organic Chemistry*. 33 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1002/poc.4025>.
- [43] V. Thavasi, L.P. Leong, R.P.A. Bettens, Investigation of the influence of hydroxy groups on the radical scavenging ability of polyphenols, *Journal of Physical Chemistry A*. 110 (2006) 4918–4923. <https://doi.org/10.1021/jp057315r>.
- [44] Q. Li, L. Wei, J. Zhang, G. Gu, Z. Guo, Significantly enhanced antioxidant activity of chitosan through chemical modification with coumarins, *Polymer Chemistry*. 10 (2019) 1480–1488. <https://doi.org/10.1039/c8py01790e>.
- [45] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The Hallmarks of Cancer, *Cell*. 100 (2000) 57–70.
- [46] B.A. Pierce, *Genetics: A Conceptual Approach*, 3rd ed., W. H. Freeman and Company, 2010.
- [47] E.H. Maleki, A.R. Bahrami, H. Sadeghian, M.M. Matin, Discovering the structure–activity relationships of different O-prenylated coumarin derivatives as effective anticancer agents in human cervical cancer cells, *Toxicology in Vitro*. 63 (2020) 104745. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104745>.

- [48] A. Herrera-R, W. Castrillón, E. Otero, E. Ruiz, M. Carda, R. Agut, T. Naranjo, G. Moreno, M. Elena, M. Wilson, Synthesis and antiproliferative activity of 3- and 7-styrylcoumarins, *Medicinal Chemistry Research*. 27 (2018) 1893–1905. <https://doi.org/10.1007/s00044-018-2202-0>.
- [49] A. Herrera-R, T.W. Naranjo, M. Elena, M. Gustavo, M.A. Yepes, W. Cardona-g, Styrylcoumarin 7-SC2 induces apoptosis in SW480 human colon adenocarcinoma cells and inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in BALB / c mice, *Medicinal Chemistry Research*. 29 (2020) 377–395. <https://doi.org/10.1007/s00044-019-02487-2>.
- [50] M. Bassetti, M. Merelli, C. Temperoni, A. Astilean, New antibiotics for bad bugs : where are we ?, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 12 (2013) 1–15. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-22>.
- [51] E.D. Brown, G.D. Wright, Antibacterial drug discovery in the resistance era, *Nature*. 529 (2016) 336–343. <https://doi.org/10.1038/nature17042>.
- [52] M.M. Cowan, Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (1999) 564–582. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>.
- [53] S.M. De Souza, F.D. Monache, A. Sma, Antibacterial Activity of Coumarins, *A Journal of Biosciences*. 60 (2005) 693–700.
- [54] G.D. Brown, G.D. Brown, D.W. Denning, N.A.R. Gow, S.M. Levitz, M.G. Netea, T.C. White, Hidden Killers : Human Fungal Infections, *ScienceTranslational Medicine*. 4 (2012) 1–10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>.
- [55] Y. Shi, C. Zhou, Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21 (2011) 956–960. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.12.059>.
- [56] M.H. Shaikh, D.D. Subhedar, F.A.K. Khan, J.N. Sangshetti, B.B. Shingate, 1,2,3-Triazole incorporated coumarin derivatives as a potential antifungal and antioxidant agents, *Chinese Chemical Letters*. 27 (2015) 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2015.11.003>.
- [57] A. Analysis, E. Assay, S. V Tiwari, J.A.S. Id, M.P. Vazquez-tato, A.P. Sarkate, K.S. Karnik, A.P.G. Nikalje, Facile Synthesis of Novel Coumarin Derivatives, Antimicrobial Analysis, Enzyme Assay, Docking Study, ADMET Prediction and Toxicity Study, *Molecules*. 22 (2017) 1172. <https://doi.org/10.3390/molecules22071172>.
- [58] M. Maleki, Z. Norouzi, A. Maleki, COVID-19 Infection : A Novel Fatal Pandemic of the World in 2020, in: *Practical Cardiology*, 2nd ed., Elsevier Inc., 2020: pp. 731–735. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-80915-3.00003-X>.
- [59] S. Mishra, A. Pandey, S. Manvati, Coumarin: An emerging antiviral agent, *Heliyon*. 6 (2020) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03217>.
- [60] E. Thomas, L.E. Stewart, B.A. Darley, A.M. Pham, I. Esteban, S.S. Panda, Plant-Based Natural Products and Extracts: Potential Source to Develop New Antiviral Drug

- Candidates, Molecules. 26 (2021) 1–56.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules26206197>.
- [61] V. V. Teplova, E.P. Isakova, O.I. Klein, D.I. Dergachova, N.N. Gessler, Y.I. Deryabina, Natural Polyphenols: Biological Activity, Pharmacological Potential, Means of Metabolic Engineering (Review), *Applied Biochemistry and Microbiology*. 54 (2018) 221–237. <https://doi.org/10.1134/S0003683818030146>.
- [62] Y.P. Liu, G. Yan, Y.T. Xie, T.C. Lin, W. Zhang, J. Li, Y.J. Wu, J.Y. Zhou, Y.H. Fu, Bioactive prenylated coumarins as potential anti-inflammatory and anti-HIV agents from *Clausena lenis*, *Bioorganic Chemistry*. 97 (2020) 103699. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103699>.
- [63] L. Chen, H. Deng, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang, L. Zhao, Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs, *Oncotarget*. 9 (2018) 7204–7218. <https://doi.org/doi:10.18632/oncotarget.23208>.
- [64] P. Srivastava, V.K. Vyas, B. Variya, P. Patel, G. Qureshi, M. Ghate, Synthesis, anti-inflammatory, analgesic, 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition activities, and molecular docking study of 7-substituted coumarin derivatives, *Bioorganic Chemistry*. 67 (2016) 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.06.004>.
- [65] D. Wardrop, D. Keeling, The story of the discovery of heparin and warfarin, *British Journal of Haematology*. 141 (2008) 757–763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07119.x>.
- [66] F. Kamali, M. Pirmohamed, The future prospects of pharmacogenetics in oral anticoagulation therapy, *British Journal of Clinical Pharmacology*. 61 (2006) 746–751. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2006.02679.x>.
- [67] A. Trailokya, Acenocoumarol in Thromboembolic Disorders, *Cardiovascular Pharmacology: Open Access*. 04 (2015). <https://doi.org/10.4172/2329-6607.1000157>.
- [68] Ş.G. Küçüküzümlü, S. Şenkardeş, Recent Advances in Bioactive Pyrazoles, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 97 (2015) 786–815. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.059>.
- [69] P.A. Lapchak, A critical assessment of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials : is edaravone an effective neuroprotective therapy ?, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 11 (2010) 1753–1763. <https://doi.org/https://doi.org/10.1517/14656566.2010.493558>.
- [70] F. Meiattini, The 4-Hydroxybenzoate/4-Aminophenazone Chromogenic System Used in the Enzymic Determination of Serum Cholesterol, *Clinical Chemistry*. 24 (1978) 2161–2165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/clinchem/24.12.2161>.
- [71] B. Psaila, L. Kovaleva, B. Meddeb, J. Kloczko, H. Hassani, D. Ph, B. Mayer, M. Sc, J.M. Jenkins, M. Sc, Eltrombopag for the Treatment of Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura, *The New Engl and Journal of Medicine Original*. 357 (2007) 2237–2247. <https://doi.org/DOI:10.1056/NEJMoa073275>.
- [72] J.G. Mchutchison, G. Dusheiko, M.L. Shiffman, M. Rodriguez-torres, S. Sigal, M.

- Bourliere, T. Berg, S.C. Gordon, F.M. Campbell, B. Sc, D. Theodore, N. Blackman, D. Ph, J. Jenkins, M. Sc, N.H. Afdhal, Eltrombopag for Thrombocytopenia in Patients with Cirrhosis Associated with Hepatitis C, *The New England Journal of Medicine*. 357 (2007) 2227–2236. <https://doi.org/doi:10.1056/nejmoa073255>.
- [73] F.G. Freitag, R. Cady, F. Diserio, A. Elkind, R.M. Gallagher, J. Goldstein, J.A. Klapper, A.M. Rapoport, C. Sadowsky, J.R. Saper, T.R. Smith, Comparative Study of a Combination of Isometheptene Mucate, Dichloralphenazone With Acetaminophen and Sumatriptan Succinate in the Treatment of Migraine, Headache: *The Journal of Head and Face Pain*. 41 (2001) 391–398. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1526-4610.2001.111006391.x>.
- [74] M. Himly, B. Jahn-Schmid, K. Pittertschatscher, B. Bohle, K. Grubmayr, F. Ferreira, H. Ebner, C. Ebner, Ig E-mediated immediate-type hypersensitivity to the pyrazolone drug propyphenazone, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 111 (2003) 882–888. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.163>.
- [75] M. Memoranda, Trial of Nifenazone (“Thylin”) Brit., *British Medical Journal*. 1 (1964) 1553–1554. <https://doi.org/doi:10.1136/bmj.1.5397.1553>.
- [76] W.S. Hamama, H.G. El-gohary, N. Kuhnert, H.H. Zoorob, Chemistry of Pyrazolinones and their Applications, *Current Organic Chemistry*. 16 (2012) 373–399. <https://doi.org/10.2174/138527212799499921>.
- [77] S. Liu, X. Bao, B. Wang, Pyrazolone: a powerful synthon for asymmetric diverse derivatizations, *Chemical Communications*. 54 (2018) 1–18. <https://doi.org/10.1039/C8CC06196C>.
- [78] Z. Zhao, X. Dai, C. Li, X. Wang, J. Tian, Y. Feng, J. Xie, C. Ma, Z. Nie, P. Fan, M. Qian, X. He, S. Wu, Y. Zhang, X. Zheng, Pyrazolone structural motif in medicinal chemistry: Retrospect and prospect, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 186 (2020) 111893. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111893>.
- [79] A.M. Akondi, M.L. Kantam, R. Trivedi, J. Bharatam, S.P.B. Vemulapalli, S.K. Bhargava, S.K. Buddana, R.S. Prakasham, Ce/SiO₂ composite as an efficient catalyst for the multicomponent one-pot synthesis of substituted pyrazolones in aqueous media and their antimicrobial activities, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 411 (2016) 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2015.11.004>.
- [80] S. Adhikari, M. Singh, P. Sharma, S. Arora, Pyrazolones as a potential anticancer scaffold: Recent trends and future perspectives, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 11 (2021) 26–37. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.11s103>.
- [81] K.K. Sivakumar, A. Rajasekaran, P. Senthilkumar, P.P. Wattamwar, Conventional and Microwave Assisted Synthesis of Pyrazolone Mannich Bases Possessing Anti-Inflammatory, Analgesic, Ulcerogenic Effect and Antimicrobial Properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 24 (2014) 2940–2944. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.04.067>.
- [82] F. Tok, B. Koçyiğit-Kaymakçioğlu, B.N. Sağlık, S. Levent, Y. Özkay, Z.A. Kaplancıklı, Synthesis and biological evaluation of new pyrazolone Schiff bases as monoamine oxidase and cholinesterase inhibitors, *Bioorganic Chemistry*. 84 (2019)

- 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.11.016>.
- [83] S. Yousuf, K.M. Khan, U. Salar, S. Chigurupati, M. Taj, A. Wadood, M. Aldubayan, V. Vijayan, M. Riaz, S. Perveen, 2'-Aryl and 4'-arylidene substituted pyrazolones: As potential α -amylase inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 159 (2018) 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.052>.
- [84] M.A.M. Abdel Reheim, S.M. Baker, Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activity of novel fused pyrazolo[3,4-c]pyridazine, pyrazolo[3,4-d]pyrimidine, thieno[3,2-c]pyrazole and pyrazolo[3',4':4,5]thieno[2,3-d]pyrimidine derivatives, *Chemistry Central Journal*. 11 (2017) 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0339-4>.
- [85] H.E. Gaffer, S. Abdel-Fattah, H.A. Etman, E. Abdel-Latifb, Synthesis and Antioxidant Activity of Some New Thiazolyl–Pyrazolone Derivatives, *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 54 (2016) 331–340. <https://doi.org/10.1002/jhet.2588>.
- [86] A. Kimata, H. Nakagawa, R. Ohyama, T. Fukuuchi, S. Ohta, T. Suzuki, N. Miyata, New series of antiprion compounds: Pyrazolone derivatives have the potent activity of inhibiting protease-resistant prion protein accumulation, *Journal of Medicinal Chemistry*. 50 (2007) 5053–5056. <https://doi.org/10.1021/jm070688r>.
- [87] R. Tripathy, A. Reiboldt, P.A. Messina, M. Iqbal, J. Singh, E.R. Bacon, T.S. Angeles, S.X. Yang, M.S. Albom, C. Robinson, H. Chang, B.A. Ruggeri, J.P. Mallamo, Structure-guided identification of novel VEGFR-2 kinase inhibitors via solution phase parallel synthesis, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 16 (2006) 2158–2162. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.01.063>.
- [88] S.S. Mahajan, M. Scian, S. Sripathy, J. Posakony, U. Lao, T.K. Loe, V. Leko, A. Thalhofer, A.D. Schuler, A. Bedalov, J.A. Simon, Development of pyrazolone and isoxazol-5-one cambinol analogues as sirtuin inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*. 57 (2014) 3283–3294. <https://doi.org/10.1021/jm4018064>.
- [89] V.K. Merugumolu, R.B. Chandrashekarappa, Synthesis and anti-depressant evaluation of novel pyrazolone derivatives, *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 11 (2016) 558–563. <https://doi.org/10.3329/BJP.V11I2.25859>.
- [90] I. Alkorta, J. Elguero, I. De Química, M. Csic, J. De Cierva, E.- Madrid, THE TAUTOMERISM OF PYRAZOLINES (DIHYDROPYRAZOLES) I., 60 (2015) 2966–2970. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072015000200022>.
- [91] B. Nehra, S. Rulhania, S. Jaswal, B. Kumar, G. Singh, V. Monga, Recent advancements in the development of bioactive pyrazoline derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 205 (2020) 112666. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112666>.
- [92] A.M.S. Silva, J.A.S. Cavaleiro, T. Patonay, A. Lévai, Synthesis of spiro-1-pyrazolines by the 1,3-dipolar cycloaddition of exocyclic α,β -unsaturated ketones with diazomethane, *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 36 (1999) 1215–1222. <https://doi.org/doi:10.1002/jhet.5570360517>.
- [93] G. Toth, A. Szollosy, A. Lévai, G. Kotovych, Synthesis and Stereochemistry of Spi

- ropyrazolines, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. (1986) 1895–1898. <https://doi.org/DOI>
<https://doi.org/10.1039/P29860001895>.
- [94] B. Ludwig Knorr, Ludwig Knorr: Einwirkung von Acetessigester auf Phenylhydrazin, Detsch Chem Ges. 16 (1883) 2597–2599.
- [95] E. Fischer, O. Knoevenagel, Ueber die Verbindungell des phenylhydrazins mit Acrolein, Mesityloxyd urid Allylbromid, Justus Liebigs Ann Chem. 239 (1887) 194–206.
- [96] K. V. Auwers, P. Heimke, Zur Spektrochemie der Pyrazoline, Justus Liebig's Annalen Der Chemie. 458 (1927) 175–186. <https://doi.org/10.1002/jlac.19274580111>.
- [97] H. v. Pechmann, Ueber Diazomethan, Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft. 27 (1894) 1888–1891. <https://doi.org/10.1002/cber.18950280289>.
- [98] L.I. Smith, K.L. Howard, The Action of Aliphatic Diazo Compounds upon α,β -Unsaturated Ketones. cis- and trans-Dibenzoyl ethylene, Journal of the American Chemical Society. 65 (1943) 159–164. <https://doi.org/10.1021/ja01242a008>.
- [99] N.A.A. Elkanzi, Review on Synthesis of pyrazole and pyrazolines, International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 4 (2013) 17–26.
- [100] T. Vahedpour, M. Hamzeh-Mivehroud, S. Hemmati, S. Dastmalchi, Synthesis of 2-Pyrazolines from Hydrazines: Mechanisms Explained, ChemistrySelect. 6 (2021) 6483–6506. <https://doi.org/10.1002/slct.202101467>.
- [101] M. Yusuf, P. Jain, Synthetic and biological studies of pyrazolines and related heterocyclic compounds, Arabian Journal of Chemistry. 7 (2011) 553–596. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.09.013>.
- [102] B. Dipankar, P. Panneerselvam, B. Asish, Synthesis, characterization and evaluation of analgesic, anti-inflammatory, ulcerogenic potential of some 2-pyrazoline derivatives, Der Pharma Chemica. 4 (2012) 1679–1688.
- [103] D. Indorkar, O.P. Chourasia, S.N. Limaye, Synthesis and Characterization of some new Synthesis of 1-acetyl-3-(4-nitrophenyl)-5-(substituted phenyl) pyrazoline Derivative and antimicrobial activity, Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 4 (2015) 670–678.
- [104] P.M. Sivakumar, S. Ganesan, P. Veluchamy, M. Doble, Novel chalcones and 1,3,5-triphenyl-2-pyrazoline derivatives as antibacterial agents, Chemical Biology and Drug Design. 76 (2010) 407–411. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2010.01020.x>.
- [105] M. Shaharyar, A.A. Siddiqui, M.A. Ali, D. Sriram, P. Yogeeswari, Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of N1-nicotinoyl-3-(4'-hydroxy-3'-methyl phenyl)-5-[(sub)phenyl]-2-pyrazolines, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 16 (2006) 3947–3949. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.05.024>.
- [106] M.A. Ali, M. Shaharyar, A.A. Siddiqui, Synthesis, structural activity relationship and anti-tubercular activity of novel pyrazoline derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry. 42 (2007) 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.08.004>.

- [107] S. Aggarwal, D. Paliwal, D. Kaushik, G.K. Gupta, A. Kumar, Synthesis, Antimalarial Evaluation and SAR Study of Some 1,3,5- Trisubstituted Pyrazoline Derivatives, *Letters in Organic Chemistry*. 16 (2019) 807–817. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/1570178616666190212145754>.
- [108] B.N. Acharya, D. Saraswat, M. Tiwari, A.K. Shrivastava, R. Ghorpade, S. Bapna, M.P. Kaushik, Synthesis and antimalarial evaluation of 1, 3, 5-trisubstituted pyrazolines, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 45 (2010) 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.10.023>.
- [109] R. Surendra Kumar, I.A. Arif, A. Ahamed, A. Idhayadhulla, Anti-inflammatory and antimicrobial activities of novel pyrazole analogues, *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23 (2016) 614–620. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.07.005>.
- [110] P. Harathi, V.V.S. Rajendra Prasad, D. Satyavati, S. Subramanian, V. Boya, P. Gali, Synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of novel pyrazole derivatives, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 8 (2015) 83–87.
- [111] M. Abdel-Halim, A.B. Keeton, E. Gurpinar, B.D. Gary, S.M. Vogel, M. Engel, G.A. Piazza, F.M. Boeckler, R.W. Hartmann, A.H. Abadi, Trisubstituted and tetrasubstituted pyrazolines as a novel class of cell-growth inhibitors in tumor cells with wild type p53, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 21 (2013) 7343–7356. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.055>.
- [112] B.A. Bhat, K.L. Dhar, S.C. Puri, A.K. Saxena, M. Shanmugavel, G.N. Qazi, Synthesis and biological evaluation of chalcones and their derived pyrazoles as potential cytotoxic agents, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 15 (2005) 3177–3180. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.03.121>.
- [113] M.J. Ahsan, Anticonvulsant activity and neuroprotection assay of 3-substituted-N-aryl-6,7-dimethoxy-3a,4-dihydro-3H-indeno[1,2-c]pyrazole-2-carboxamide analogues, *Arabian Journal of Chemistry*. 10 (2017) S2762–S2766. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.023>.
- [114] N. Beyhan, B. Kocyigit-Kaymakcioglu, S. Gümrü, F. Aricioglu, Synthesis and anticonvulsant activity of some 2-pyrazolines derived from chalcones, *Arabian Journal of Chemistry*. 10 (2017) S2073–S2081. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.037>.
- [115] M. Decker, Introduction, in: M. Decker (Ed.), *Design of Hybrid Molecules for Drug Development*, 1st ed., 2017: pp. 1–339.
- [116] C. Viegas-junior, A. Danuello, S. Bolzani, E.J. Barreiro, C. Alberto, M. Fraga, Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes, *Current Medicinal Chemistry*. 14 (2007) 1829–1852. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/092986707781058805>.
- [117] S. Sandhu, Y. Bansal, O. Silakari, G. Bansal, Coumarin Hybrids As Novel Therapeutic Agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 22 (2014) 1–36. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.05.032>.
- [118] S. Vilar, E. Quezada, L. Santana, E. Uriarte, M. Ya, N. Fraiz, C. Alcaide, E. Cano, F. Orallo, Design , synthesis , and vasorelaxant and platelet antiaggregatory activities of

- coumarin – resveratrol hybrids, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 16 (2006) 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.10.013>.
- [119] H.Y. Song, M.H. Ngai, Z.Y. Song, P.A. Macary, M.J. Lear, J. Hobley, M.J. Lear, Practical synthesis of maleimides and coumarin-linked probes for protein and antibody labelling via reduction of native disulfides, *Organic & Biomolecular Chemistry*. 7 (2009) 3400–3406. <https://doi.org/10.1039/b904060a>.
- [120] Q. Wei, J.-Y. Ning, X. Dai, Y.-D. Gao, L. Su, B.-X. Zhao, J.-Y. Miao, Discovery of novel HSP90 inhibitors that induced apoptosis and impaired autophagic flux in A549 lung cancer cells, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 145 (2018) 551–558. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.024>.
- [121] G. Melagraki, A. Afantitis, O. Igglessi-Markopoulou, A. Detsi, M. Koufaki, C. Kontogiorgis, D.J. Hadjipavlou-Litina, Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44 (2009) 3020–3026. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.12.027>.
- [122] H. Jelali, A. Chakchouk-Mtibaa, L. Baklouti, H. Bilel, Y. Bathich, L. Mellouli, N. Hamdi, Development of new multicomponent reactions in eco-friendly media-greener reaction and expeditious synthesis of novel bioactive benzylpyranocoumarins, *Journal of Chemistry*. 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/8693614>.
- [123] A. Saha, S. Payra, S.K. Verma, M. Mandal, S. Thareja, S. Banerjee, In silico binding affinity to cyclooxygenase-II and green synthesis of benzylpyrazolyl coumarin derivatives, *RSC Advances*. 5 (2015) 100978–100983. <https://doi.org/10.1039/c5ra16643h>.
- [124] S. Khode, V. Maddi, P. Aragade, M. Palkar, P.K. Ronad, S. Mamledesai, A.H.M. Thippeswamy, D. Satyanarayana, Synthesis and pharmacological evaluation of a novel series of 5-(substituted)aryl-3-(3-coumarinyl)-1-phenyl-2-pyrazolines as novel anti-inflammatory and analgesic agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44 (2009) 1682–1688. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.09.020>.
- [125] A.S. Lunkad, R.L. Sawant, Synthesis of some new derivatives of coumarin containing pyrazoline and investigation against human lung cancer cell line, *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*. 08 (2021) 3028–3036.
- [126] W. Akhtar, M.F. Khan, G. Verma, M. Akhter, Coumarin-Pyrazoline Derivatives: Their One-Pot Microwave Assisted Synthesis and Antimalarial Activity, *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*. 3 (2017) 5–9. <https://doi.org/10.21088/jpmc.2395.6615.3117.1>.
- [127] P.E. Almeida da Silva, D.F. Ramos, H.G. Bonacorso, A.I. de la Iglesia, M.R. Oliveira, T. Coelho, J. Navarini, H.R. Morbidoni, N. Zanatta, M.A.P. Martins, Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of 3-substituted 5-hydroxy-5-trifluoro[chloro]methyl-4,5-dihydro-1H-1-(isonicotinoyl) pyrazoles, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 32 (2008) 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.03.019>.
- [128] M.A. Ali, M.S. Yar, M. Kumar, G.S. Pandian, Synthesis and antitubercular activity of substituted novel pyrazoline derivatives, *Natural Product Research*. 21 (2007) 575–579.

- <https://doi.org/10.1080/14786410701369367>.
- [129] J.D. Bhirud, R.D. Patil, H.P. Narkhede, Sulfamic acid catalyzed synthesis of new 3,5-[(sub)phenyl]-1H-pyrazole bearing N1-isonicotinoyl: And their pharmacological activity evaluation, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 30 (2020) 127558. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127558>.
- [130] P. Aragade, M. Palkar, P. Ronad, D. Satyanarayana, Coumarinyl pyrazole derivatives of INH: Promising antimycobacterial agents, *Medicinal Chemistry Research*. 22 (2013) 2279–2283. <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0222-8>.
- [131] A.S. Rathod, S.S. Godipurge, J.S. Biradar, Synthesis of Indole, Coumarinyl and Pyridinyl Derivatives of Isoniazid As Potent Antitubercular and Antimicrobial Agents and Their Molecular Docking Studies, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 9 (2017) 233–240. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i12.21970>.
- [132] R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, E. Çapanoğlu, Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64 (2016) 997–1027. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>.
- [133] and R.T. Yong Sun, Cheng Yang, Nomenclature and general classification of antioxidant activity/capacity assays, in: F.S. Resat Apak, Esra Capanoglu (Ed.), *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity*, 1st ed., 2018: p. 354.
- [134] I.G. Munteanu, C. Apetrei, Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review, *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (2021) 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
- [135] H.A. Moharram, M.M. Youssef, Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review, *Alexandria Journal of Food Science and Technology*. 11 (2014) 31–42. <https://doi.org/10.12816/0025348>.
- [136] M.C. Foti, Use and Abuse of the DPPH• Radical, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63 (2015) 8765–8776. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03839>.
- [137] D. Sanglard, Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs, *Current Opinion in Microbiology*. 5 (2002) 379–385. [https://doi.org/doi:10.1016/s1369-5274\(02\)00344-2](https://doi.org/doi:10.1016/s1369-5274(02)00344-2).
- [138] C. Lacroix, M. Dubach, M. Feuilhade, Les échinocandines: Une nouvelle classe d'antifongiques, *Medecine et Maladies Infectieuses*. 33 (2003) 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(03\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(03)00059-3).
- [139] T. Roemer, D.J. Krysan, Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches, *Cold Spring Harb Perspect Med*. 4 (2014) 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019703>.
- [140] R.K. Sharma, D. Katiyar, Recent Advances in the Development of Coumarin Derivatives as Antifungal Agents, in: N.S. Karuna Singh (Ed.), *Recent Trends in Human and Animal Mycology*, 1st ed., Springer Singapore, 2019: pp. 235–263.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-13-9435-5>.
- [141] N. Azie, D. Neofytos, M. Pfaller, H. Meier-kriesche, S. Quan, D. Horn, The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance ® registry and invasive fungal infections : update 2012, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 73 (2012) 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.012>.
- [142] M.K. Kathiravan, A.B. Salake, A.S. Chothe, P.B. Dudhe, R.P. Watode, M.S. Mukta, S. Gadhwe, The biology and chemistry of antifungal agents: A review, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20 (2012) 5678–5698. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.045>.
- [143] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibnsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6 (2016) 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- [144] N. G. Heatley, A Method for the Assay of Penicillin, *Biochemical Journal*. 38 (1944) 61–65. <https://doi.org/doi:10.1042/bj0380061>.
- [145] M.G. Correa, F.B. Martínez, C.P. Vidal, C. Streitt, J. Escrig, C.L. De Dicastillo, Antimicrobial metal-based nanoparticles: a review on their synthesis, types and antimicrobial action, *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 11 (2020) 1450–1469. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.129>.
- [146] X. Tao, Y. Huang, C. Wang, F. Chen, L. Yang, L. Ling, Z. Che, X. Chen, Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review, *International Journal of Food Science and Technology*. 55 (2019) 33–45. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14325>.
- [147] T. Lengauer, M. Rarey, Computational methods for biomolecular docking, *Current Opinion in Structural Biology*. 6 (1996) 402–406. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(96\)80061-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(96)80061-3).
- [148] W.W. Cleland, The low-barrier hydrogen bond in enzymic catalysis, *Advances in Physical Organic Chemistry*. 44 (2010) 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0065-3160\(08\)44001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3160(08)44001-7).
- [149] S. Agnihotry, R.K. Pathak, A. Srivastav, P.K. Shukla, B. Gautam, Molecular Docking and Structure-Based Drug Design, in: D.B. Singh (Ed.), *Computer-Aided Drug Design*, 1st ed., Springer Singapore, 2020: pp. 1–306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-15-6815-2>.
- [150] A. Tiwari, S. Singh, Computational approaches in drug designing, in: R.K.P. Dev Bukhsh Singh (Ed.), *Bioinformatics Methods and Applications*, 1st ed., Stacy Masucci, 2021: pp. 1–490. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2020-0-03034-3>.
- [151] K. Roy, S. Kar, R.N. Das, Other Related Techniques, 2015. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801505-6.00010-7>.
- [152] K. Raval, T. Ganatra, Basics, types and applications of molecular docking: A review, *IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology*. 7 (2022) 12–16. <https://doi.org/10.18231/j.ijcaap.2022.003>.

- [153] L.G. Ferreira, R.N. Santos, G. Oliva, A.D. Andricopulo, Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies, *Molecules*. 20 (2015) 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- [154] P.S. Suresh, A. Kumar, R. Kumar, V.P. Singh, An Insilco approach to bioremediation: Laccase as a case study, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 26 (2008) 845–849. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2007.05.005>.

Partie II

*Réaction catalysée par le dodécylbenzènesulfonate de sodium pour la synthèse
verte des dérivés de la Benzylpyrazolylcoumarine.*

Étude du mécanisme, de l'activité biologique et calculs théoriques

Chapitre 1

*Synthèse des dérivés benzylpyrazolylcoumarines catalysés par le
dodécylbenzènesulfonate de sodium (DBSS).*

*Étude du mécanisme réactionnel mis en jeu et interprétation théorique des
résultats obtenus*

La découverte de nouvelles réactions, capables de former des liaisons multiples en une seule étape, avec de bons rendements, tout en étant respectueuses de l'environnement, est devenue un défi important pour les chimistes. Ainsi, les réactions multicomposants (RMC [1], qui répondent à ces critères, jouent un rôle innovant et font l'objet d'une attention particulière en chimie combinatoire permettant l'élaboration de structures complexes présentant des aspects biologiques intéressants à partir de matières premières simples et facilement disponibles. La plupart de ces réactions nécessitent des solvants organiques comme milieu réactionnel ; bien que les préoccupations environnementales actuelles imposent l'utilisation de l'eau comme solvant [2], les solvants organiques sont encore utilisés en raison de la solubilité limitée de la plupart des composés organiques dans l'eau. Il a récemment été démontré que l'incorporation de tensioactifs dans des mélanges aqueux peut améliorer la réactivité des réactions médiées par l'eau via la formation de particules colloïdales. L'utilisation de tensioactifs comme catalyseurs dans les réactions organiques a été particulièrement intéressante, et a été étudiée dans un certain nombre de transformations synthétiques multicomposants dans l'eau du à leurs double fonction : à la fois comme catalyseur pour activer les molécules réactives et comme tensioactif pour former des agrégats micellaires afin d'augmenter la vitesse de réaction ou d'améliorer la régio- et chimio-sélectivité de la réaction [3]. De plus, à la fin de la réaction, les tensioactifs sont éliminés par l'eau sans utiliser de solvant organique [4].

Les dérivés de la benzylcoumarine et de la pyrazolone sont largement répandus dans la nature et présentent diverses propriétés biologiques [5–11]. Compte tenu de leurs propriétés intéressantes et de leurs caractéristiques structurales, la fusion des deux fragments 3-benzylcoumarine et pyrazolone conduisant à la molécule benzylpyrazolylcoumarine devrait être plus attrayante sur le plan biologique.

Le développement d'un protocole général pour les réactions multicomposants utilisant un catalyseur vert conduisant au composé benzylpyrazolylcoumarine a déjà fait l'objet de quelques travaux utilisant divers catalyseurs [12–15]. Bien que chacun de ces protocoles de synthèse de ces composés biologiquement actifs ait ses avantages, certains d'entre eux présentent des inconvénients. Des catalyseurs coûteux ou odorants, des catalyseurs ou des solvants toxiques, des obstacles importants à l'application à grande échelle des catalyseurs introduits et des déchets gênants à éliminer. Par conséquent, le développement de méthodologies simples et respectueuses de l'environnement pour la synthèse de dérivés pyrazole utilisant des catalyseurs plus efficaces et plus sûrs est très demandé afin d'éviter ces limitations. Cependant, l'utilisation du dodécylbenzènesulfonate de sodium (DBSS) comme

catalyseur en milieu aqueux pour la synthèse de la benzylpyrazolylcoumarine n'a pas été rapportée dans la littérature. Le DBSS a été utilisé dans un certain nombre de réactions organiques comme un bon catalyseur [16,17].

Nous rapportons dans ce chapitre, une voie de synthèse efficace et respectueuse de l'environnement des dérivés de la benzylpyrazolylcoumarine **5a-i** via une réaction de condensation en un pot de l'acétoacétate d'éthyle **1**, de l'hydrazine hydrate **2**, de l'aldéhyde aromatique **3** et de la 4-hydroxycoumarine **4** en présence de DBSS comme catalyseur (Schéma II.1).

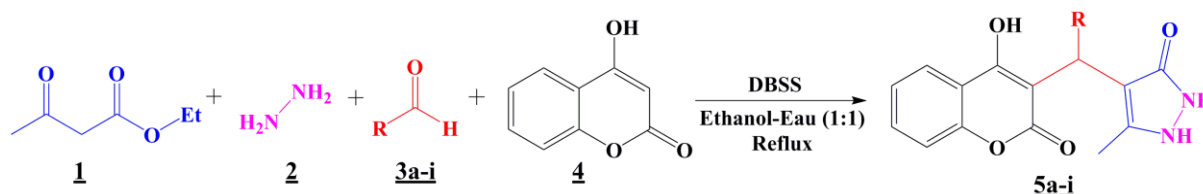


Schéma II.1 : Synthèse des dérivés benzylpyrazolylcoumarines **5a-i** en utilisant le DBSS comme catalyseur

I. Optimisation des conditions de réaction

Suite à nos études sur la recherche de nouvelles voies de synthèse de composés hétérocycliques biologiquement actifs, nous avons développé une réaction à plusieurs composants en une seule étape. En utilisant quatre réactifs (4-hydroxycoumarine, acétoacétate d'éthyle, hydrazine hydrate et benzaldéhyde) en présence de x mol% de SDBS dans un mélange de deux solvant Ethanol-eau (1 :1) sous reflux pour la synthèse des dérivés 4-((4-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)(phenyl)methyl)-5-methyl-1,2-dihydro-3*H*-pyrazol-3-one (**5a-i**).

1) Essai 1

La première réaction de synthèse a été initiée avec des quantités stoechiométriques des quatre réactifs (acétoacétate d'éthyle, hydrazine, benzaldéhyde et 4-hydroxycoumarine) en présence de 2 mol % de SDBS dans un mélange de solvant éthanol-eau 1:1 et sous reflux à 100°C. Après 2 heures de temps, un mélange de trois produits difficiles à séparer à savoir la benzylpyrazolyl-coumarine **5** attendue ainsi que deux autres produits le dérivé de la bis-pyrazolone **3C** et le dérivé de la bis-coumarine **4B** (Schéma II.2).

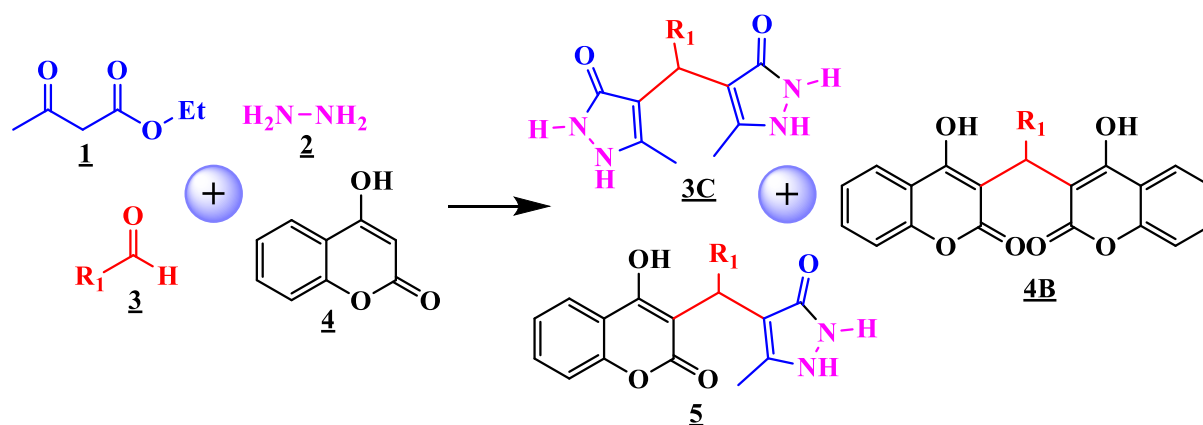


Schéma II.2 : Réaction multicomposants des quatre réactifs 4-hydroxycoumarine, hydrate d'hydrazine, acétoacétate d'éthyle, et dérivés d'aldéhydes.

Ce résultat nous a permis de constater qu'il y pourrait y avoir deux voies de réaction compétitives pour la formation de 4-((4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)(phenyl)methyl)-5-methyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one 5 (benzylpyrazolyl-coumarine). Le **schéma II.2** illustre les différentes voies de réaction possibles.

Dans un premier temps, le dérivé d'hydrazine **2** est mis en réaction avec l'acétoacétate d'éthyle **1** pour générer l'intermédiaire pyrazolone **3A**, qui subit une condensation de Knoevenagel avec un dérivé aldéhyde aromatique pour donner l'adduit **3B**. Dans l'étape d'addition de Michael, la cétone α , β -insaturé formée **3B** va réagir avec la 4-hydroxycoumarine **4** pour donner le produit désiré **5**, mais aussi la formation de la bis-pyrazolone **3C** par addition de **3A** sur **3B**. Alternativement, une réaction de Knoevenagel se fait entre la 4-hydroxycoumarine **4** et le dérivé d'aldéhyde **3** et forme un adduit de Knoevenagel **4A**. Dans l'étape suivante, la pyrazolone **3A** et le produit d'addition de Knoevenagel **4A** subissent une addition de Michael et forme le produit final **5**. Cependant, au cours de cette procédure, **4A** peut également réagir avec la 4-hydroxycoumarine **4** (1,4-addition) pour donner le dérivé de la bis-coumarine **4B**.

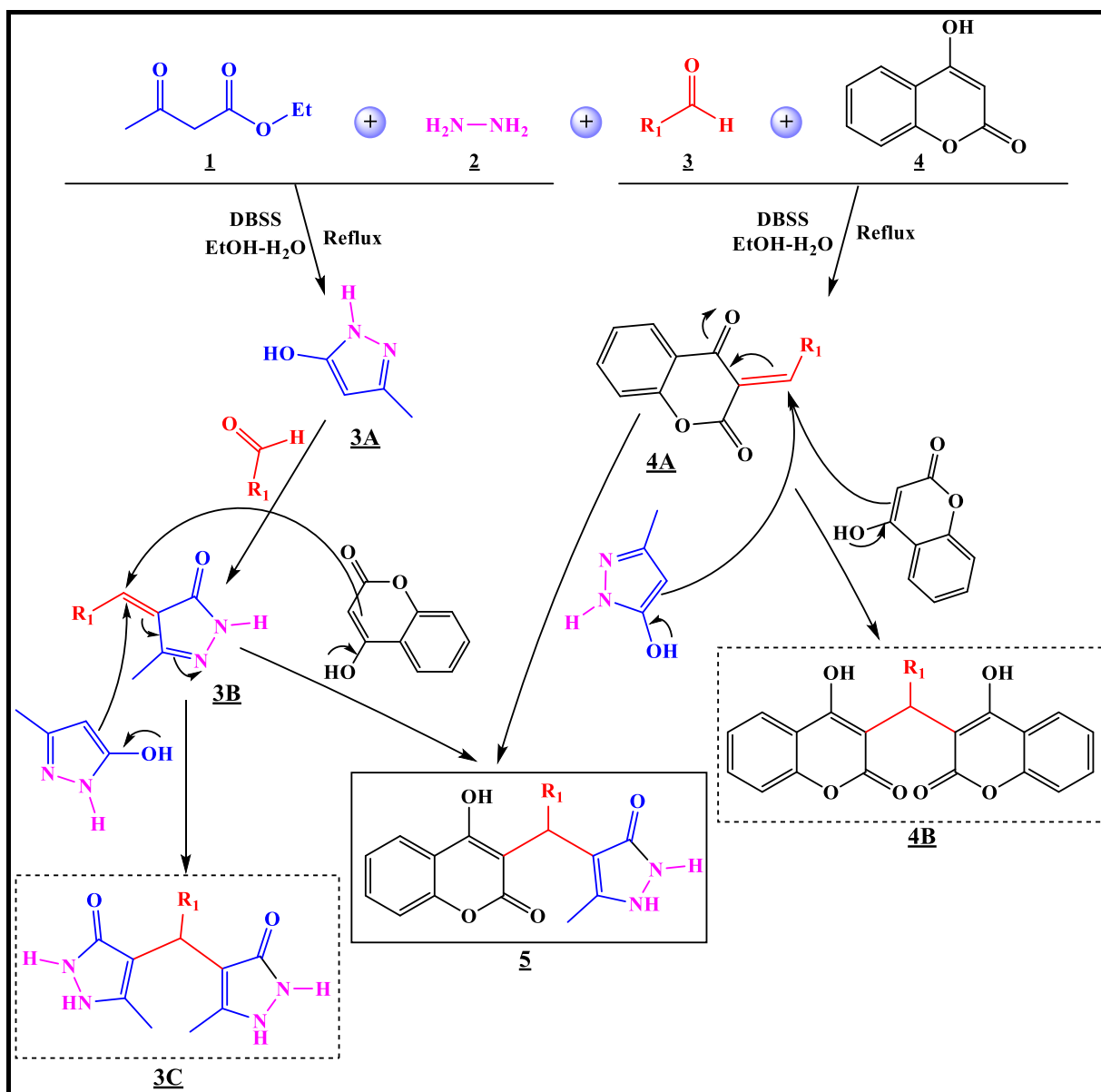


Schéma II.3 : Mécanisme plausible pour la synthèse des benzylpyrazolylcoumarines **5a-i**

Afin de contourner la formation des deux autres produits **3C** et **4B**, d'autres essais de synthèse ont été réalisés :

2) Essai 2

Dans le deuxième essai, des quantités stœchiométriques d'acétoacétate d'éthyle **1**, de dérivé d'hydrazine **2** ont été portées au reflux dans un mélange éthanol-eau (1 :1) en utilisant 2 % molaire de SDBS pendant 10 mn. Puis le dérivé d'aldéhyde **3** et la 4-hydroxycoumarine **4** ont été ajoutée simultanément. La cinétique de la réaction a été suivie par CCM. Dans ce cas, le produit désiré **5** et le produit **3C** ont été obtenus (**Schéma II.4**).

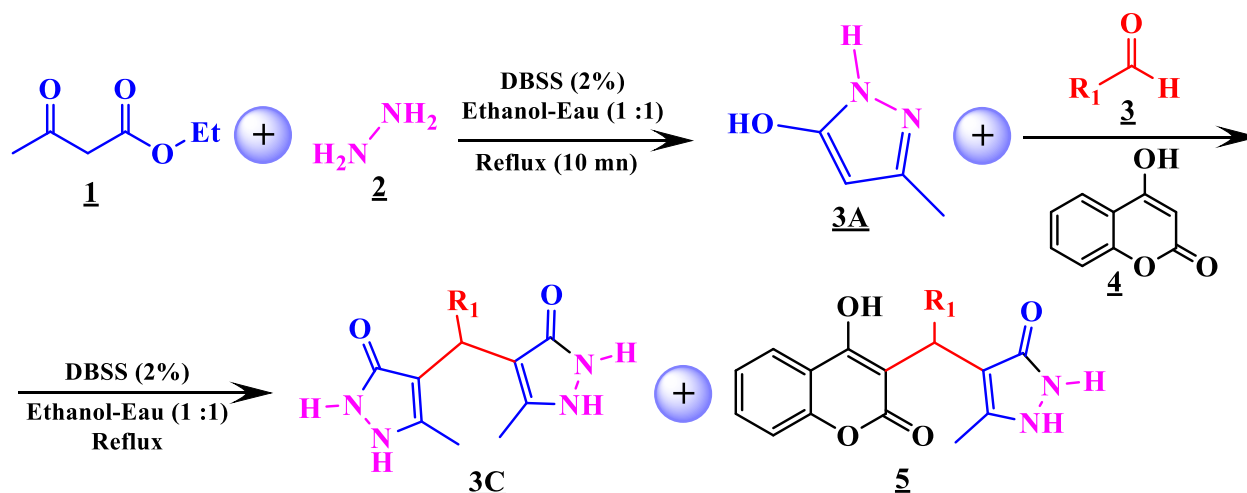


Schéma II.4 : Produits susceptibles de se formés avec la 1ère méthode.

3) Essai 3

Dans un troisième essai (**Schéma II.5**), l'acétoacétate d'éthyle **1**, le dérivé d'hydrazine **2** et le dérivé d'aldéhyde **3** en quantités stœchiométriques ont été ajoutés en même temps. Le mélange porté au reflux de l'éthanol-eau (1 :1) en utilisant 2 % molaire de SDBS pendant 1 heure, conduit à la formation de l'intermédiaire **3B**. Ensuite la 4-hydroxycoumarine **4** a été ajouté en maintenant le reflux jusqu'à achèvement de la réaction (suivie par CCM).

L'analyse par spectroscopie de masse pour le produit obtenue avec le 4-Chlorobenzaldéhyde montre l'obtention de deux produits différents par apparition de deux pics à m/z 383 $[M+H]^+$ correspondant au dérivé benzylpyrazolylcoumarine (produit majoritaire) et un autre pic à m/z 319 $[M+H]^+$ correspondant au produit minoritaire dérivé de la bis-pyrazolone **3C** ($R_1 = 4\text{-ClC}_6\text{H}_4$) (voir spectre de masse en annexe **Figure 6**).

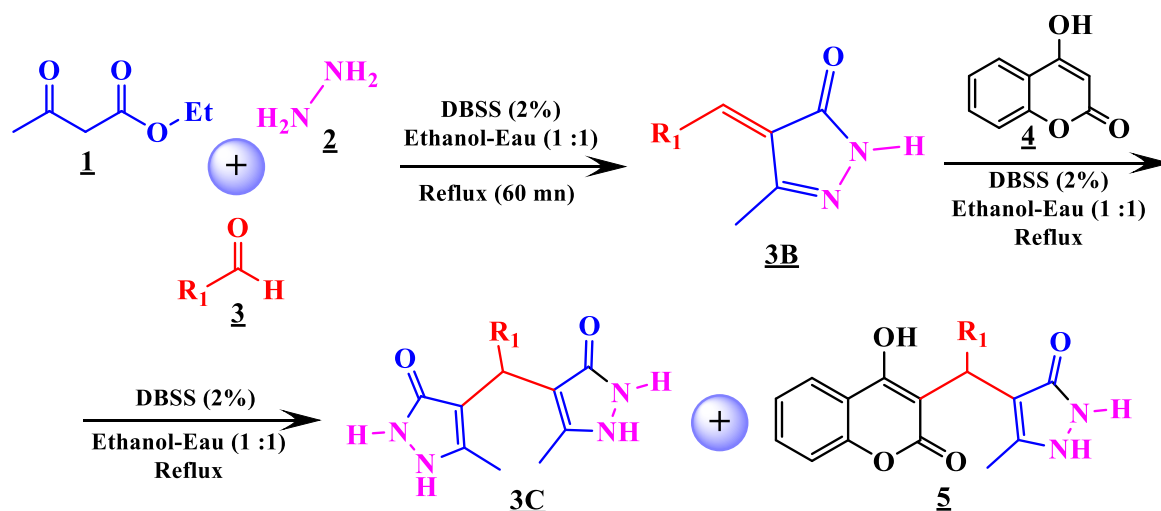


Schéma II.5 : Produits susceptibles de se formés avec la 2ème méthode.

4) Essai 4

La méthode efficace qui a conduit exclusivement à la formation du composé **5** désiré, consiste en initiant la réaction par l'addition d'un mélange d'acétoacétate d'éthyle **1** et de l'hydrazine **2** seulement, en présence de 2 % molaire de DBSS à reflux dans un mélange éthanol-eau (1 :1). La réaction est suivie par CCM jusqu'à la formation totale du composé **3A**, ensuite le dérivé d'aldéhyde **3** et la 4-hydroxycoumarine **4** ont été ajoutés simultanément au mélange réactionnel après les avoir dissous dans l'éthanol séparément.

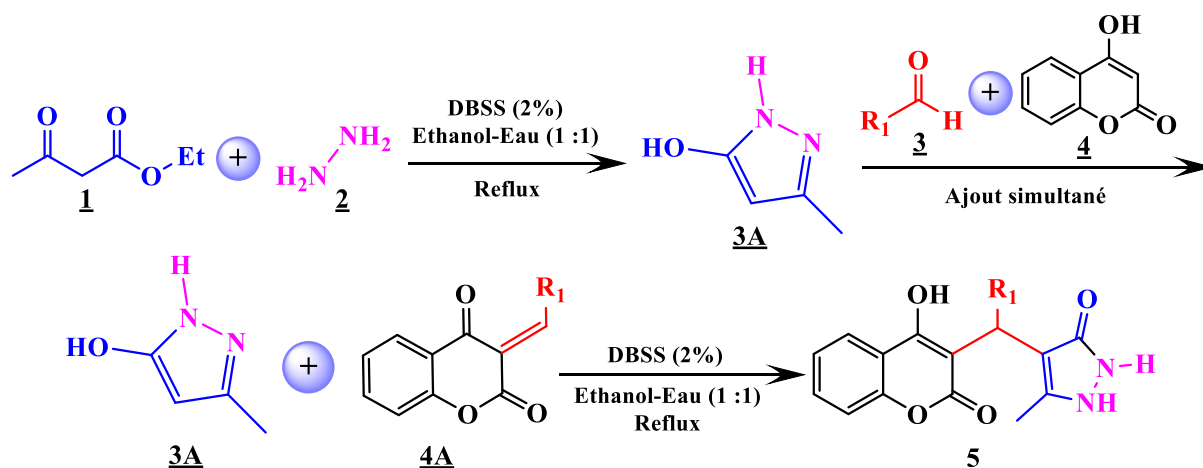
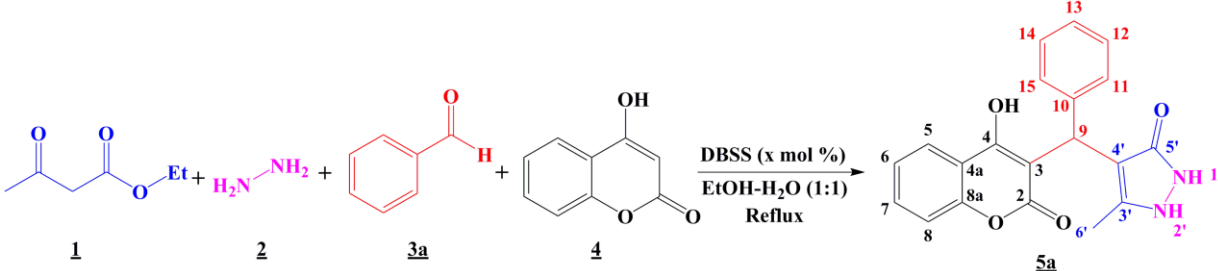


Schéma II.6 : Méthode de synthèse des dérivés benzylpyrazolylcoumarines **5**

I.1. Effet de la quantité du catalyseur sur la réaction

Pour étudier l'influence de la quantité du catalyseur sur le rendement de la réaction et afin d'optimiser les meilleures conditions, différentes quantités de DBSS ont été testées sous reflux d'éthanol-eau (1 :1) (Tableau II.1, entrées 1-4).

Tableau II.1 : Optimisation de la quantité de DBSS (mol %) pour la synthèse de la benzylpyrazolylcoumarine **5a**^a.

			
Entrée	Catalyseur (mol %)	Temps (h)	Rendement (%)
1	1	2	58
2	2	2	62
3	3	2	65
4	5	2	45

^a**Conditions de la réaction:** 4-hydroxycoumarine (5 mmol), acétoacétate d'éthyl (5 mmol), hydrazine hydrate (5 mmol), benzaldéhyde (5 mmol) et DBSS (x mol%), en utilisant un mélange éthanol-eau (1:1) comme solvant.

Le meilleur résultat a été observé lorsque 3 mol% de DBSS ont été appliqués, le produit désiré a été manifestement obtenu avec un rendement satisfaisant (65 %). Lorsque la quantité de DBSS a été variée de 1% à 3%, le rendement passe de 58% à 65%, respectivement par contre l'augmentation de la quantité de DBSS à 5% engendre la diminution du rendement. Ainsi, 2 mol% de DBSS ont été choisis comme quantité catalytique pour une optimisation supplémentaire des conditions de réaction (**Tableau II.1**, entrée 2), car aucune augmentation considérable n'a été trouvée dans le rendement en utilisant 2 à 3 mol% de DBSS.

I.2. Étude de l'effet du substituant de l'aldéhyde

Après des études mécanistiques réussies et l'optimisation des conditions de réaction, nous avons étendu notre méthodologie à l'utilisation de divers aldéhydes dans la synthèse à quatre composants des benzylpyrazolylcoumarines catalysée par le DBSS (2 mol%) dans l'éthanol-eau (1 :1), sous reflux.

Les aldéhydes aromatiques portant à la fois des groupes fonctionnels donneurs et récepteurs d'électrons ont subi avec succès la condensation et les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau II.2**.

Tableau II.2: Synthèse catalysée par le DBSS (2 mol %) des dérivés de la benzylpyrazolylcoumarine **5a-i**

Entré	R	Composé	Rendement (%)	P.f (°C)	
				Trouvé	Reporté
1	C ₆ H ₅ -	5a	65	230-232	229-230[12]
2	4-OCH ₃ C ₆ H ₄ -	5b	25	203-205	202-204[12]
3	4-ClC ₆ H ₄ -	5c	20	225-230	-
4	4-NO ₂ C ₆ H ₄ -	5d	36	233-235	237-239[18]
5	2-OHC ₆ H ₄ -	5e	16	220-223	221-223[18]
6	3-OHC ₆ H ₄ -	5f	53	210-213	217-219[18]
7	-CH=CH-C ₆ H ₅	5g	27	230-233	-
8	2,4-(Cl) ₂ -C ₆ H ₃ -	5h	24	215-220	-
9	2,6-(Cl) ₂ -C ₆ H ₃ -	5i	23	148-150	-

D'après les résultats obtenus, le substituant lié au noyau aromatique diminue drastiquement le rendement du composé **5** et cela quelque soit sa nature électro-donneur ou électro-attracteur.

II. Caractérisations spectroscopiques des produits **5a-i**

II.1. Étude par spectrométrie de masse GC-MS du composé **5a**

Le spectre de masse réalisé par la méthode GC-MS du composé **5a** (voir spectre de masse en annexe **Figure 1**) indique la présence d'un pic à $m/z = 347$ qui correspond à l'ion moléculaire $(M+2)^+$, qui est en accord avec la formule brute C₂₀H₁₆N₂O₄. Sur le spectre nous observons également les pics des différents fragments que peut donner la molécule (**Figure II.1**).

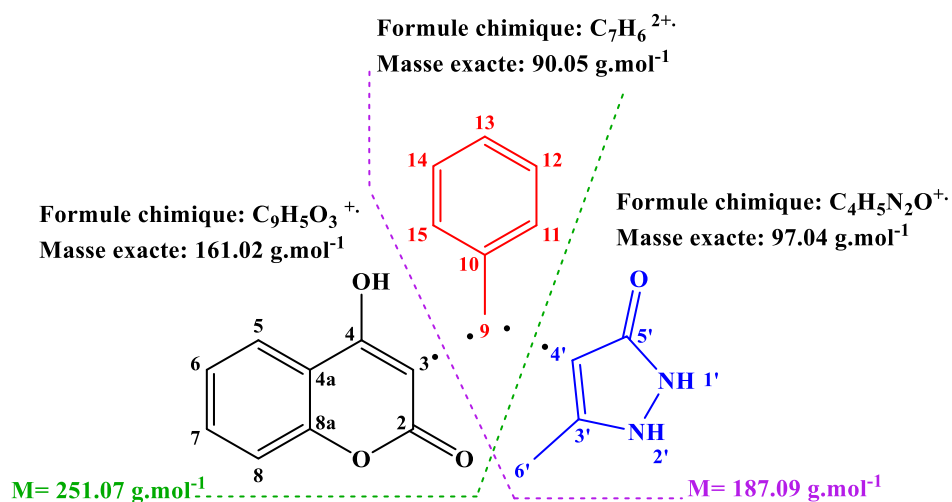
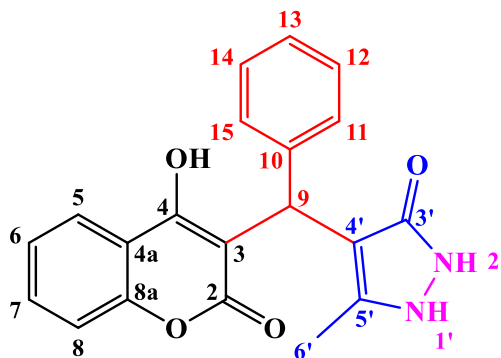


Figure II.1 : Différents fragments donnés par la molécule 5a

II.2. Étude par spectroscopie RMN 1H de 5a

Le spectre RMN 1H du composé 5a présente deux signaux singulets à 2,29 et 5,61 ppm correspondant aux protons du méthyle CH_3-6' et H-9 respectivement. Les protons aromatiques des deux noyaux coumarine et phényle apparaissent entre 7,11 et 7,81 ppm. Un pic large apparaît à 12,69 ppm correspondant au groupement OH de la 4-hydroxycoumarine. Dans le **tableau II.3** ci-dessous sont reportés les résultats du spectre RMN du proton du composé 5a.



4-((4-hydroxy-2-oxo-2H-chromèn-3-yl)(phényl)méthyl)-5-méthyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one (5a).

Tableau II.3 : Résultats de l'analyse RMN ^1H à 400 MHz du composé **5a**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,29	s (3H)	CH_3 (6')
5,61	s (1H)	H (9)
7,11-7,16	m (3H)	H(7)-H(8)-H (13)
7,21-7,32	m (4H)	H(11)-H(12) -H(14) et H(15)
7,53-7,57	t (1H)	H(6)
7,81	d (1H)	H(5)
12,69	Large	OH (4)

II.3. Étude par spectroscopie RMN ^{13}C de **5a**

Le spectre RMN ^{13}C révèle tous les pics correspondants aux carbones du composé **5a**. Les signaux qui apparaissent à $\delta=10,54$ ppm et $\delta=33,82$ ppm sont attribuables aux deux carbones C-6' du groupement CH_3 et C-9 respectivement. À 127,22 ppm et 131,88 ppm résonnent les deux pics des carbones (C-11, C-15) et (C-12 et C-14) du noyau phényle. Le signal du carbone C-4 lié au groupement hydroxyle apparaît à $\delta=166,55$ ppm. Les résultats du spectre RMN ^{13}C du composé **5a** sont exposés dans le **tableau II.4**.

Tableau II.4 : Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 101 MHz du composé **5a**

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
10,54	CH_3 -6'	127,22	C-11, 15
33,82	C-9	128,46	C-7
105,17	C-3	131,88	C-12, 14
106,13	C-4'	141,38	C-10
116,19	C-4a	144,68	C-5'
119,97	C-8	152,66	C-8a
123,86	C-5	162,51	C-3'
124,49	C-6	165,14	C-2
126,14	C-13	166,55	C-4

II.4. Étude par spectroscopie UV-Visible des composés 5a-i

Les spectres d'absorption UV-vis des composés **5a-i** à une concentration de 10^{-5} M ont été enregistrés après dissolution des produits dans le DMSO. Les longueurs d'onde d'absorption maximales ($\lambda_{\text{max abs}}$) ont été observées dans la gamme de 250 à 400 nm (**Figure II.2**). Tous les composés présentent deux bandes d'absorption qui sont attribuées à la transition $\pi - \pi^*$ des squelettes conjugués (**Tableau II.5**), à l'exception des composés **5h** et **5i**. Les spectres d'absorption des produits obtenus ont montré que les formes spectrales sont très similaires car tous ces composés ont le même noyau central. La différence des longueurs d'onde et des intensités d'absorption est due au noyau phényle substitué. Les résultats de l'analyse par spectroscopie UV-visibles des composés **5a-i** sont reportés dans le **tableau II.5** et illustrés dans la **figure II.2**.

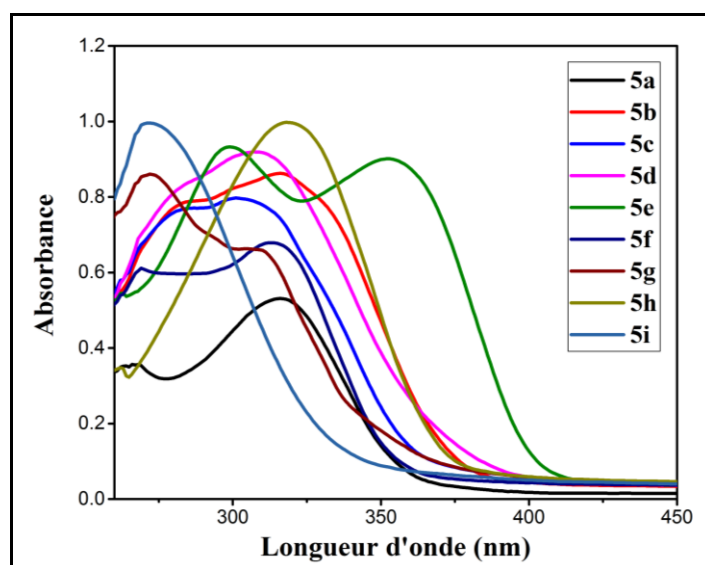


Figure II.2 : Spectres d'absorption UV/vis des composés **5a-i** dans le DMSO à 10^{-5} M

Tableau II.5 : Caractéristiques spectroscopiques UV-visible des composés **5a-i** dans le DMSO

Composé	λ_{abs} (nm)	Composé	λ_{abs} (nm)
5a	268	5e	299
	316		352
5b	285	5f	269
	315		313
5c	285	5g	273
	301		308
5d	286	5h	318
	307		271
		5i	

II.5. Étude par spectroscopie infrarouge IRTF

Les spectres IR réalisés par la méthode ATR pour les composés **5a-i** sont caractérisés par la bande de vibrations d'étirement O-H qui apparaît entre 3695 et 3753 cm^{-1} , cette bande est peu intense et large. Le groupe hydroxyle non lié à l'hydrogène ou "libre" des alcools et des phénols résonne fortement dans la région de 3700 cm^{-1} à 3584 cm^{-1} [19].

Les autres bandes de vibration des composés synthétisés sont caractéristiques du noyau coumarine et sont entre 1681 et 1689 cm^{-1} ($\bar{\nu}_{\text{C=O}}$, lactone); 1650 et 1652 cm^{-1} ($\bar{\nu}_{\text{C=O}}$, cétone). Selon la littérature, ces bandes apparaissent entre 1690 et 1600 cm^{-1} [20]; entre 1601 et 1602 cm^{-1} ($\bar{\nu}_{\text{C=C}}$, aromatique) ; 3032 et 3035 cm^{-1} ($\bar{\nu}_{\text{C-H}}$, aromatique) ; 1615 et 1616 cm^{-1} ($\bar{\nu}_{\text{C-O}}$, lactone) ; 1154 et 1155 cm^{-1} ($\bar{\nu}_{\text{C-O}}$, alcool) [21] pour l'ensemble des composés.

Tableau II.6 : Résultats spectroscopiques IRTF des composés **5a-i**

Produits	Bandes caractéristiques enregistrées	Bandes reportées dans la littérature
5a	3697, 3087, 2747, 2588, 2360, 2164, 2028, 1595, 1535, 1274, 1184, 1103, 1034, 748, 686	
5b	3695, 3080, 2729, 2620, 2361, 2165, 2032, 1661, 1604, 1558, 1504, 1349, 1303, 1252, 1091, 1034, 764, 671	
5c	3703, 3070, 2729, 2625, 2358, 2114, 1662, 1604, 1558, 1487, 1450, 1347, 1303, 1211, 1094, 1010, 906, 758, 671	3589 (O-H), 3423 (NH), 1539 (C=C), 1705 (CO lactone), 1741 (CO amide) [22]
5d	3753, 3089, 2849, 2589, 2365, 2161, 2023, 1592, 1558, 1515, 1338, 1182, 1098, 951, 752, 678	3083, 1613, 1527, 1347, 1186, 1038, 758 [23]
5e	3753, 3235, 3036, 2505, 2367, 2161, 2024, 1708, 1615, 1566, 1485, 1385, 1270, 1201, 1104, 979, 890, 743, 678	
5f	3752, 3200, 2505, 2364, 2161, 2023, 1598, 1449, 1342, 1267, 1040, 755, 686	3035, 2727, 1616, 1539, 1357, 1184, 1041, 752 [15]
5g	3750, 3201, 2506, 2369, 2161, 2021, 1677, 1613, 1532, 1400, 1208, 1093, 1049, 964, 902, 849, 760, 702	
5h	3752, 3082, 2506, 2367, 2161, 2024, 1612, 1582, 1466, 1386, 1319, 1203, 1134, 1099, 1050, 948, 864, 817, 786, 671, 557, 447	
5i	3750, 3252, 2447, 2368, 2160, 2024, 1625, 1555, 1426, 1332, 1189, 1090, 947, 870, 776, 677	

Nous observons en plus des bandes d'absorption du noyau coumarine, d'autres bandes que nous attribuons aux différents substituants des nouveaux composés obtenus. La bande d'élongation =C-H d'intensité moyenne de 3140 à 3080 cm^{-1} , une bande d'élongation C-N d'intensité faible entre 1350 - 1000 cm^{-1} , La bande de vibration ($\bar{\nu}_{\text{C-Cl}}$) dans **5c**, **5h** et **5i** est observable dans le domaine allant de 800 à 700 cm^{-1} [20] et les bandes de vibration ($\bar{\nu}_{\text{C-NO}_2}$) et ($\bar{\nu}_{\text{N=O}}$) respectivement, à 1338 et à 1515 cm^{-1} sont observables dans le spectre IR de **5d**. Selon des auteurs, ces bandes caractéristiques des liaisons C-NO_2 et N=O apparaissent entre 1360 et 1290 cm^{-1} pour la liaison (C-NO_2) et entre 1555 et 1320 cm^{-1} pour la liaison N=O . Dans le **tableau II.6** sont résumés les résultats de la spectroscopie IR enregistrés pour les composés **5a-i**.

III. Étude du mécanisme catalytique

Un mécanisme de réaction plausible est présenté dans le **Schéma II.7**. Il faut noter que l'addition de DBSS a transformé les réactifs initialement en suspension dans l'eau en un mélange homogène, qui a formé une émulsion sous agitation magnétique. Lorsque les deux derniers réactifs (dérivés aldéhydiques **3** et 4-hydroxycoumarine **4**) ont été ajoutés, un précipité a commencé à apparaître dans le mélange réactionnel après quelques minutes de réaction. Le mélange réactionnel était homogène tout au long de la réaction en présence de DBSS. Étant donné que le DBSS est un tensioactif, c'est-à-dire une substance qui modifie la tension superficielle entre deux surfaces, et qu'il est composé de molécules amphiphiles avec un côté lipophile (affinité pour les lipides) et un côté hydrophile (affinité pour l'eau), nous avons supposé que des micelles étaient formées. Sur la base des observations ci-dessus, nous avons émis l'hypothèse du mécanisme de la réaction de condensation décrite dans le **schéma II.7**.

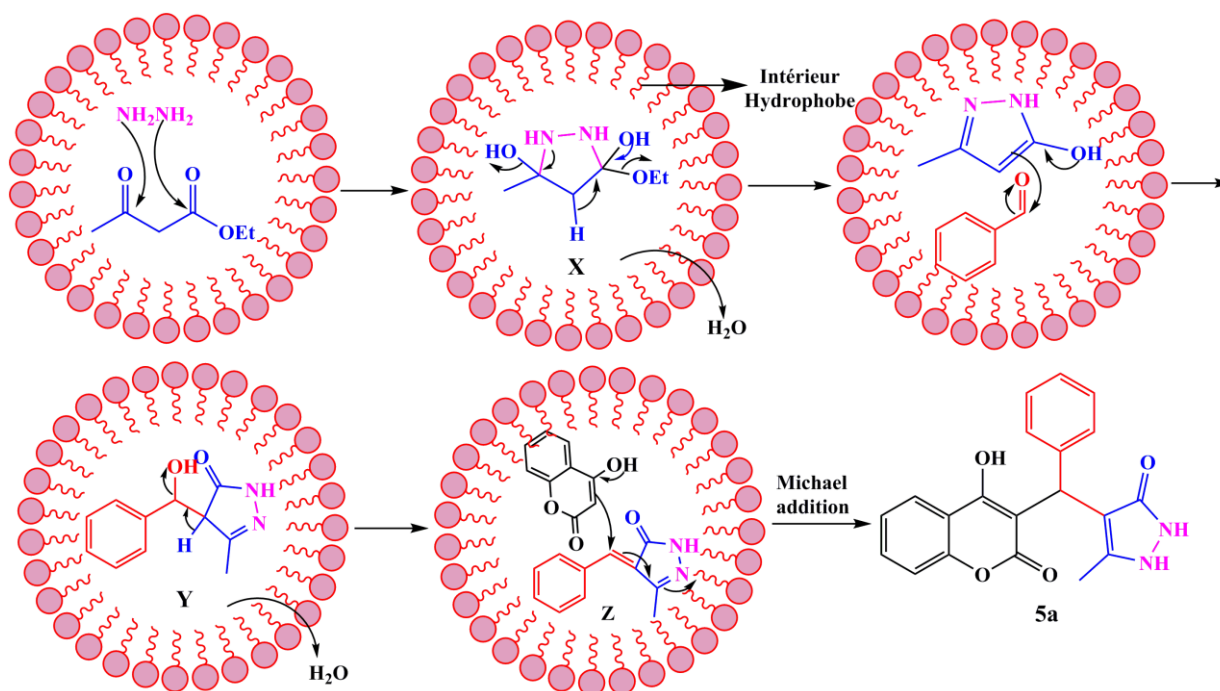


Schéma II.7 : Synthèse favorisée par les micelles et mécanisme possible pour la formation de la benzylpyrazolylcoumarine.

Premièrement, lors de la dissolution du DBSS dans l'eau, le côté lipophile du DBSS s'est éloigné de la région aqueuse et le côté hydrophile s'est disposé autour de la périphérie de l'eau. En raison des interactions hydrophobes du DBSS avec les réactifs, des gouttelettes avec un intérieur hydrophobe se sont formées dans l'émulsion [24]. Comme le montre le **schéma II.7**, l'acétoacétate d'éthyle et l'hydrate d'hydrazine réagissent d'abord pour donner l'intermédiaire 3-méthyl-1*H*-pyrazol-5-ol (**X**) dans l'intérieur hydrophobe des micelles formées par le DBSS. À l'intérieur des micelles, l'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle qui existe dans la forme émol de la pyrazolone se combine avec l'atome d'oxygène du groupe carbonyle du benzaldéhyde. Par conséquent, le carbone 4 de la pyrazolone attaque le carbone (groupe carbonyle), l'intermédiaire (**Y**) est généré par l'addition nucléophile. Le groupe hydroxyle du groupe benzyle de (**Y**) et l'atome d'hydrogène du carbone 4 de la pyrazolone génèrent de l'eau et l'intermédiaire (**Z**) via la réaction d'élimination. La cétone α,β -insaturée déshydratée est restée à l'intérieur des gouttelettes, et l'eau générée a été expulsée vers l'extérieur des gouttelettes en raison de sa nature hydrophobe [25], les cétones α,β -insaturée et une molécule de 4-hydroxycoumarine ont procédé par addition de Michael à l'intérieur des gouttelettes pour produire la molécule 4 ((4-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromèn-3-yl)(phényl)méthyl)-5-méthyl-3*H*-pyrazol-3-one **5a** dans le système réactionnel.

IV. Étude DFT, Géométries des composés synthétisés

Les géométries des composés synthétisés ont été optimisées par la méthode B3LYP avec un ensemble de base 6-311G**. Le composé **5** ainsi obtenu peut exister sous la forme de six tautomères **A**, **B**, **C**, **D**, **E** et **F** (Figure II.3)

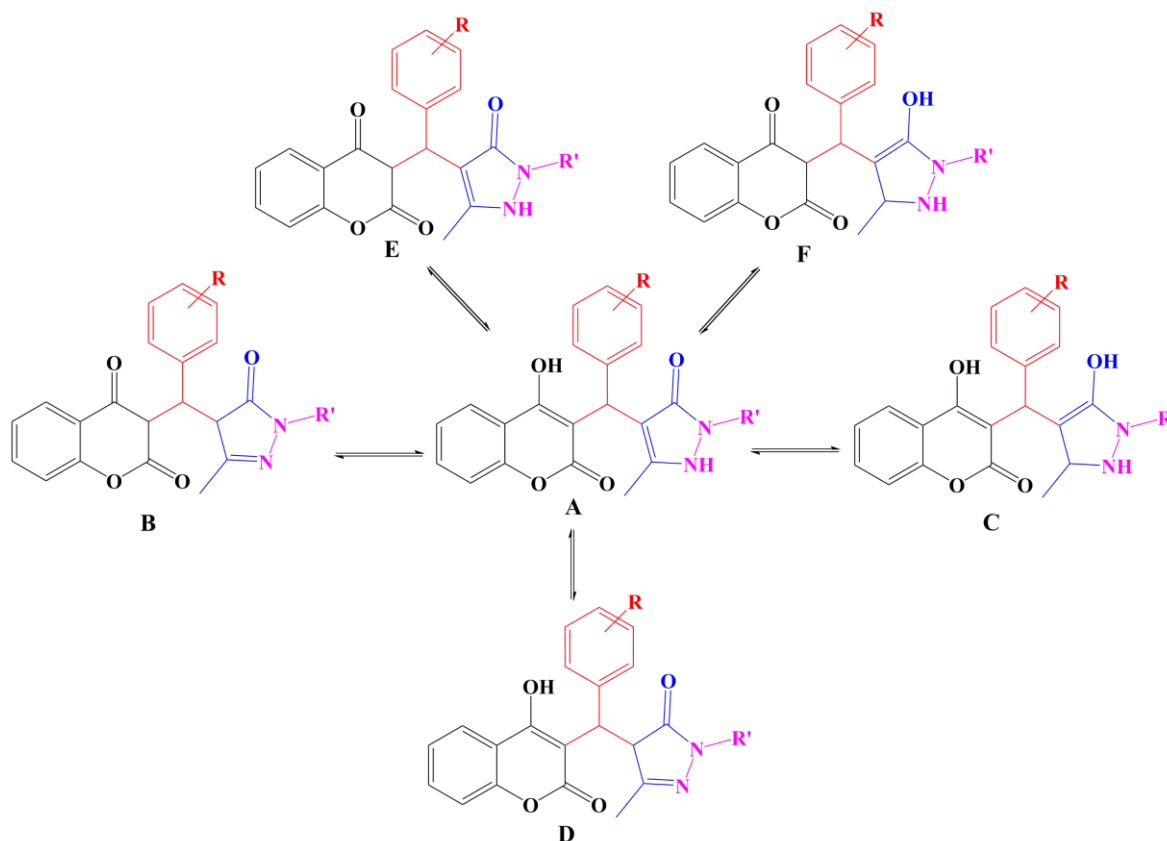


Figure II.3 : Différentes structures tautomères du composé **5a**.

Les calculs théoriques avec le programme ORCA réalisés avec la méthode DFT (density functional theory) confirment la stabilité de la structure **C** ($E = -742305.235$ kcal/mol) par rapport à celle des autres. Les géométries optimisées pour les tautomères sont présentées dans la **figure II.4**.

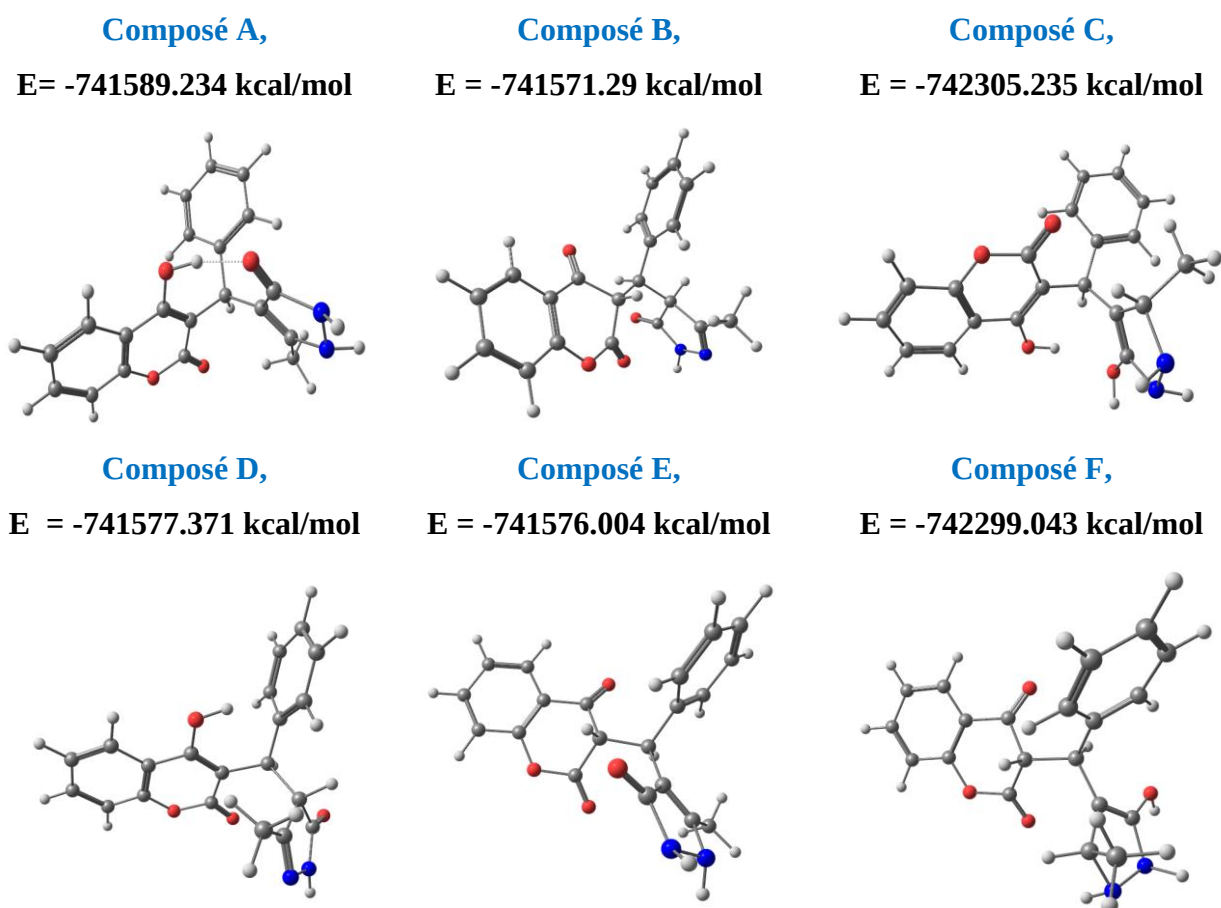


Figure II.4 : Structures géométriques 3D optimisées pour le composé 5a

Chapitre 2

*Évaluation de l'activité antioxydante et antifongique in-vitro et
Étude de docking moléculaire des dérivés
benzylpyrazolylcoumarines*

Dans ce chapitre, nous avons évalué l'activité antioxydante et antifongique *in-vitro* des produits obtenues. Des études de docking moléculaire ont également été réalisées pour le composé **5e** afin d'évaluer son potentiel en tant qu'inhibiteur de la protéine N-myristoyltransférase (NMT) de *Candida albicans* et expliquer son mécanisme d'action.

I. Évaluation de l'activité antioxydante des dérivés **5a-i**

I.1. Évaluation de l'activité de piégeage du radical libre par la méthode de DPPH

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules qui ont un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbite externe, très réactifs, et qui pourraient endommager les cellules du corps humain. Un corps humain en bonne santé produit des antioxydants pour neutraliser les radicaux libres, mais le vieillissement humain et les conditions oxydatives de stress augmentent la formation de radicaux libres.

Le potentiel antioxydant des composés **5a-i** correspondants a été étudié en fonction de leur pouvoir donneur d'électrons ou d'hydrogène au radical DPPH[•]. La **figure II.5** montre la variation de l'absorbance en fonction de la concentration des différents composés **5a-i**, et de l'acide ascorbique qui est utilisé comme référence. Ces essais révèlent que les composés testés ont une activité modérée à bonne.

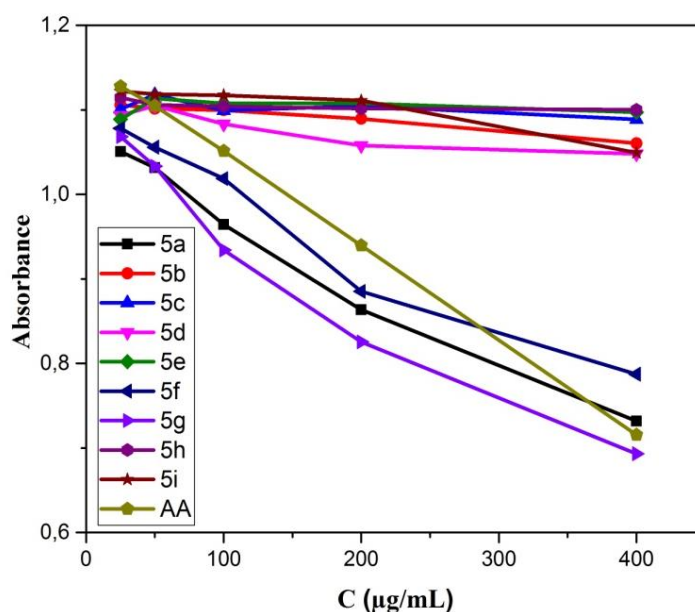


Figure II.5 : Absorbance à 517 nm en fonction de la concentration des produits **5a-i** et de l'acide ascorbique standard AA

La concentration efficace (CE_{50}) ou Concentration Minimale Inhibitrice CI_{50} est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé. Plus la valeur de CI_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

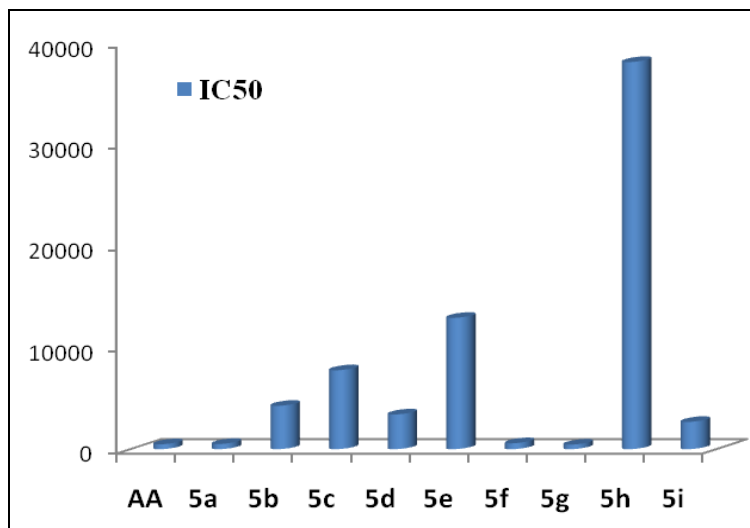


Figure II.6 : Valeurs des CI_{50} (µg/mL) de l'activité antioxydante pour les composés **5a-i** et le standard AA.

Les valeurs CI_{50} des composés **5a-i** (**Figure II.6**) montrent que le composé **5g** possède une excellente activité antioxydante ($CI_{50} = 445,77$ µg/mL), supérieur à celle de l'acide ascorbique ($CI_{50} = 481,5$ µg/mL). Suivi par le composé **5a** qui présente une activité antioxydante comparable ($CI_{50} = 508,53$ µg/mL) à celle de l'acide ascorbique.

Les résultats montrent que l'introduction de groupes chloro, méthoxy et nitro dans le cycle benzyle diminue l'activité antioxydante de ces composés par rapport au composé **5a** (CI_{50} entre 2 mg/mL et 8 mg/mL pour les groupes 4-méthoxyle, 4-nitro, 4-chloro et 2,6-dichloro et jusqu'à 30 mg/mL pour le groupe 2,4-dichloro). Les données CI_{50} indiquées dans la **Figure II.6** ont également montré que l'activité antioxydante du composé **5e** était inférieure à celle du composé **5f**, ce qui signifie que la position du groupe hydroxyle sur le cycle benzyle a un effet sur l'activité. La position méta du groupe hydroxyle était moins favorable à l'activité de piégeage des radicaux libres que la position ortho.

II. Activité antifongique des produits 5a-i

L'activité antifongique in vitro des nouveaux dérivés **5a-i** de la benzylpyrazolylcoumarine a été évaluée contre deux champignons : *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. Les résultats de l'activité antifongique in vitro sont présentés dans les **tableaux II.7** et la **figure II.7**.

Tableau II.7 : Diamètre (mm) de la zone d'inhibition des dérivés de la benzylpyrazolylcoumarine **5a-i** à 5 mg/mL

Composés testés	Diamètre de la zone d'inhibition des produits synthétisés (mm)	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
5a	09	-
5b	09	-
5c	10	-
5d	11	-
5e	10	-
5f	07	-
5g	10	-
5h	-	-
5i	10	-
Ketoconazole	22	22

Candida albicans



AF1



AF2

Aspergillus niger



AF3



AF4

Figure II.7 : Activités antifongiques par zone d'inhibition dans des boîtes de Pétri des dérivés **5a-i** (AF1 à AF4).

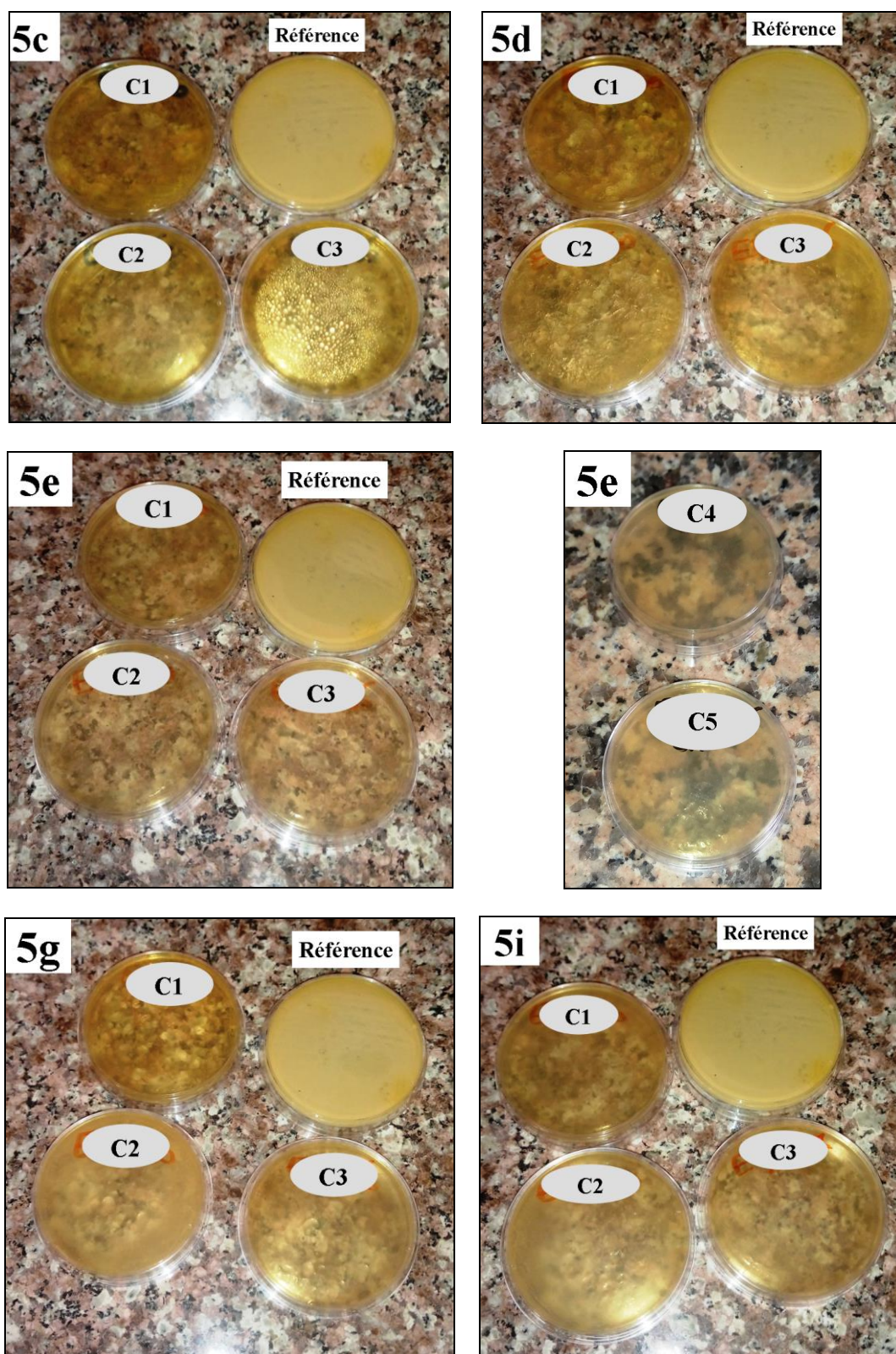


Figure II.8 : CMI des composés actifs contre la souche *Candida albicans*
(C1= 500 µg/mL; C2= 250 µg/mL; C3=125 µg/mL; C4=62,5 µg/mL; C5= 31,25 µg/mL).

L'examen des résultats obtenus (**Tableau II.7** et **Figure II.7**) a révélé que tous les composés ont une activité modérée contre la souche *Candida albicans*, à l'exception du composé **5h** qui est inactif (**Figure II.7**, AF1 et AF2). Cependant, les composés synthétisés n'ont montré aucune zone d'inhibition contre *Aspergillus niger* (**Figure II.7**, AF2 et AF3).

Pour évaluer les concentrations minimales inhibitrices contre *C. albicans*, les produits actifs ont été dilués. Le meilleur résultat a été obtenu avec le composé **5e** avec une CMI=125µg/mL suivi du composé **5c** (CMI= 250 µg/mL) et enfin des composés **5d**, **5g** et **5i** (CMI =500 µg /mL) (**Figure II.8** et **Tableau II.8**).

Tableau II.8 : Concentration minimale inhibitrice (CMI en µg/mL).

Activité antifongique <i>Candida albicans</i>						
Composés testés	5c	5d	5e	5g	5i	Ketoconazole
Concentration minimale inhibitrice (CMI) en µg mL ⁻¹	≥250	≥500	≥125	≥500	≥500	6,25

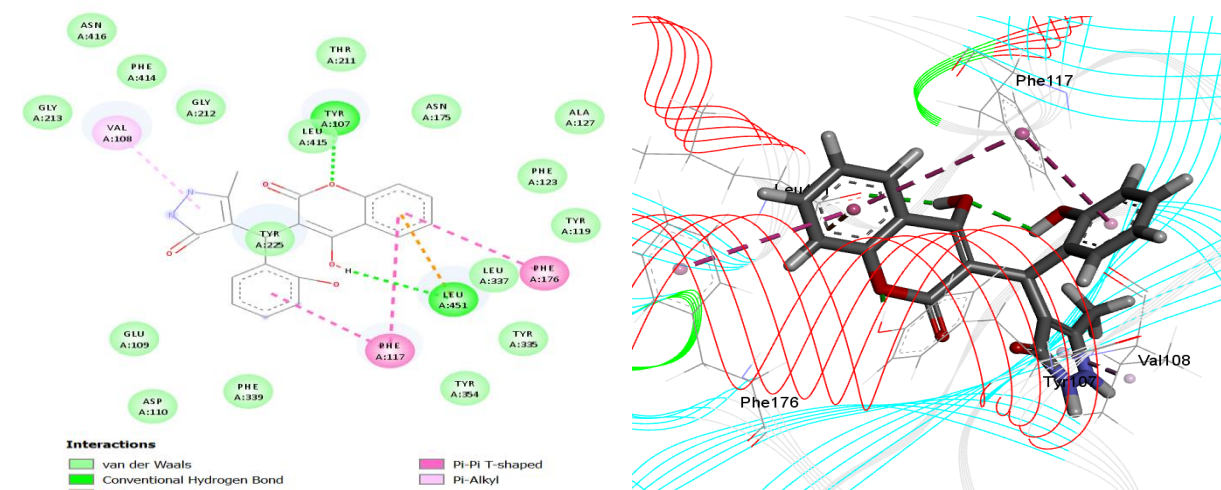
III. Simulations de docking moléculaire

Afin d'évaluer le potentiel du composé **5e** contre *Candida albicans*, nous avons étudié le mode de liaison, les interactions et les énergies de liaison avec la protéine NMT qui est la cible thérapeutique pour le développement d'agents chimio-thérapeutiques antifongiques. Les modes de liaison du composé synthétisé **5e** et du médicament standard kétoconazole avec la protéine NMT ont été examinés par des études de docking avec Autodock 4. Selon les résultats des calculs de docking, le composé **5e** a montré une meilleure énergie de liaison (-14,16 Kcal/mol) que le médicament standard Kétoconazole (-12,91 Kcal/mol). Sur la base de ce résultat, on peut supposer que le composé synthétisé **5e** montre une plus grande affinité pour la protéine NMT que le Kétoconazole [26]. Cependant, les détails de la conformation du composé dockée **5e**, ayant la meilleure activité antifongique expérimentale (MIC=125µg/mL), sont indiqués dans le **tableau II.9** et la **figure II.9**.

En effet, ce composé a occupé le site de liaison composé de résidus aromatiques comme déterminé expérimentalement [27]. Le cycle phényle de la chromèn-2-one et le cycle hydroxyphényle du composé **5e** étaient disposés presque perpendiculairement aux cycles phényles des chaînes latérales des résidus Phe176 et Phe117, respectivement, conduisant à des interactions attractives, non covalentes, en forme de T (**Tableau II.9**). En revanche, le cycle phényle entre le groupe méthoxy et le cycle pipérazine du kétoconazole était disposé presque

perpendiculairement aux cycles phényles des chaînes latérales des résidus Phe339. Rappelons que ces résidus sont supposés être importants non seulement pour l'architecture du site de liaison mais aussi pour la liaison des inhibiteurs [27].

A



B

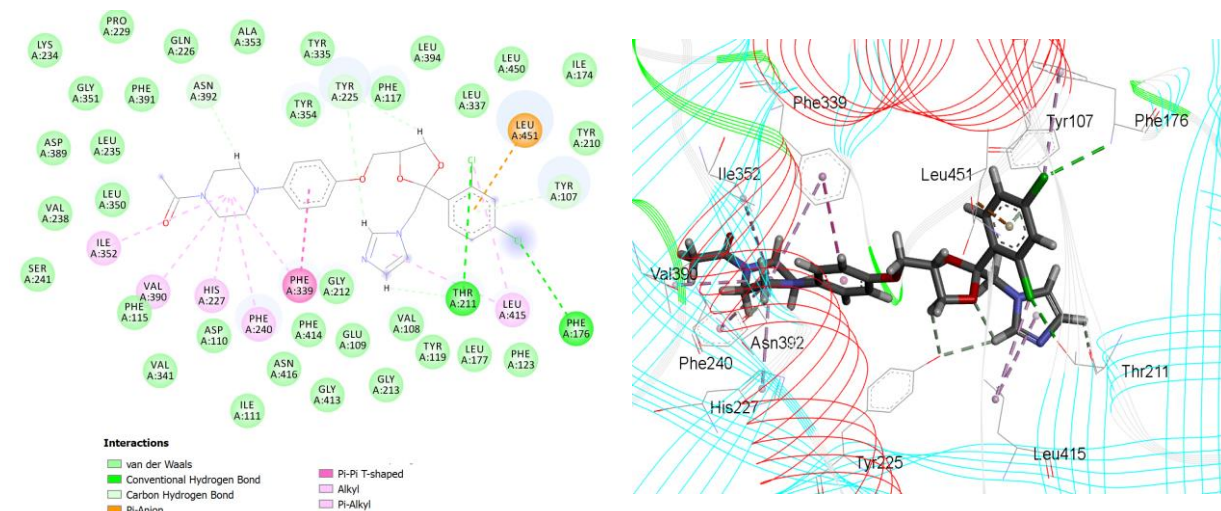


Figure II.9 : Vues 2D et 3D des modes de liaison des composés **A-5e** et **B-ketoconazole** à la protéine N-myristoyltransférase (NMT)

En outre, l'atome d'azote du squelette de Leu451 est situé à proximité de l'atome d'oxygène du groupe hydroxyle de la fraction hydroxyphénolique (à 2,51 Å), ce qui entraîne une interaction par liaison hydrogène, qui pourrait contribuer à la liaison de l'inhibiteur. De même, la distance entre l'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle de la chaîne latérale Tyr107 et l'atome d'oxygène de la fraction chromèn-2-one est de 1,93 Å, ce qui entraîne une

interaction par liaison hydrogène. D'autre part, le kétoconazole est impliqué dans deux liaisons halogènes avec l'extrémité C-terminale et N-terminale des résidus Thr211 (2,10 Å), Phe176 (2,72Å) respectivement, (**Figure II.9** et **Tableau II.9**).

Tableau II.9 : Résidus d'interaction prédits pour le composé synthétisé **5e** et le Kétoconazole avec la protéine N-myristoyltransférase (NMT).

Composé	5e	Kétoconazole
Liaisons H/liaison halogène	Tyr107 (1,93 Å), Leu451(2,51 Å)	Thr211 (2,10 Å), Phe176 (2,72 Å)
Carbone Liaison hydrogène	Gly212	Tyr107, Asn392, Tyr225,
π - π En forme de T	Phe176, Phe117	Phe339
Van Der Waals	Gly213,Asn416,Phe414,Gly212, Thr211, Leu415, Asn175,Ala127,Phe123,Tyr119, Leu337,Tyr335,Tyr354,Phe339, Asp110,Glu109	Phe123, Leu177, Leu177, Tyr119, Val108, Gly213, Glu109, Gly212, Phe414, Gly413, Asn416, Ile111, Asp110, Val341, Phe115, Ser241, Val238, Leu350, Val238, Leu350, Asp389, Leu235, Phe391, Gly351, Lys234, Pro229, Gln226, Ala353, Tyr335, Tyr354, Phe117, Leu394, Leu337, Leu450, Ile174, Tyr210
Alkyl/ π -alkyl	Val108	Leu415, Phe240, His227, Val390, Ile352,
π -cation/ π -anion	Leu451	Leu451

La visualisation de la conformation dockée du composé **5e** montre que le résidu C-terminal Leu451 est situé à une distance de 4,21 Å du cycle phényle de la partie chromèn-2-one, ce qui entraîne une interaction π -Anion. Il convient de noter que le même résidu (Leu451) établit une interaction attractive et non covalente avec le cycle imidazole du Kétoconazole. De plus, la chaîne latérale aliphatique de Val108 pointe directement vers les cycles hydroxyphényle (5,76 Å) et méthylpyrazole (3,97 Å), ce qui entraîne des interactions hydrophobes favorables. De même, la chaîne latérale aliphatique de Leu415 était située à proximité du groupe méthyle de la partie méthylpyrazole (5,13 Å), entraînant des interactions hydrophobes favorables.

Au vu de l'analyse ci-dessus, les résultats de docking obtenus dans la présente étude ont montré que le composé **5e** forme des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes favorables avec des résidus importants du site de liaison de la protéine N-myristoyltransférase (NMT), stabilisant ainsi le ligand dans le site actif de la protéine étudiée.

Conclusion

Dans ce travail nous avons montré que : la réaction à composants multiples de l'acétoacétate d'éthyle, de l'hydrate d'hydrazine, des dérivés du benzaldéhyde et de la 4-hydroxycoumarine catalysée par le DBSS dans l'éthanol dilué (50%), fournit la synthèse avec de bons rendements d'une série de benzylpyrazolylcoumarine via la réaction en tandem de Knoevenagel-Michael. Les structures ont été élucidées par les méthodes spectroscopiques RMN du proton et du carbone, UV-Visible et infrarouge.

L'évaluation de l'activité biologique, antioxydante et antifongique des dérivés **5a-i** nouvellement synthétisés, nous a permis de constater une activité biologique significative.

Les études de docking ont montré que le composé **5e** possède une forte affinité pour la protéine N-myristoyltransférase (NMT) (-16,34 kcal/mol) et se lie au site actif de la Protéine de la même manière que les inhibiteurs utilisés en médecine. Le composé **5e** pourrait faire partie de nouvelles classes d'agents antifongiques cliniquement utiles.

Partie expérimentale

I. Réactifs et appareillages

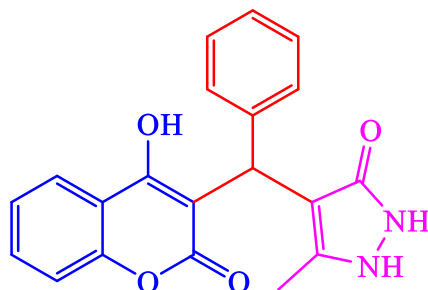
Les réactifs chimiques (produits Aldrich) ont été utilisés sans autre purification. Les points de fusion ont été déterminés sur un appareil Stuart scientifique SPM3 équipé d'un microscope et ne sont pas corrigés. Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés dans des solutions de DMSO- d_6 sur un spectromètre Bruker AscendTM400 (400 MHz pour ^1H et 101 MHz pour ^{13}C). Les déplacements chimiques sont rapportés en parties par million (δ , ppm) en utilisant le TMS comme référence interne et les constantes de couplage (J) sont données en Hertz (Hz). Les spectres UV-visible ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Thermoscientific-Evolution 220 ; les mesures ont été effectuées de 200 à 800 nm. Les spectres Infrarouges ont été enregistrés sur un spectrophotomètre à transformé de Fourier Shimadzu IRAffinity-1S. Les fréquences d'absorption ($\bar{\nu}$) sont données en cm^{-1} . La progression des réactions a été suivie tout au long du processus par des plaques de CCM (gel de silice G) en utilisant la phase mobile, chloroforme : méthanol (5:1), et les taches ont été identifiées par les vapeurs d'iode ou la lumière UV.

II. Procédure générale pour la synthèse des dérivés benzylpyrazolylcoumarines 5a-i catalysée par DBSS

À un mélange équimolaire de deux réactifs, l'acétoacétate d'éthyle **1** (5 mmol) et l'hydrate d'hydrazine **2** (5 mmol), en présence de DBSS comme catalyseur (x % molaire), on a ajouté EtOH- H_2O (1:1, 5 mL) dans un ballon tricol à fond rond de 250 mL équipé d'un condenseur et chauffé dans un bain de sable à reflux sous agitation. Après la formation du produit pyrazolone (suivie par CCM), les dérivés d'aldéhyde aromatique **3a-i** (5 mmol) et la 4-hydroxycoumarine **4** (5 mmol) ont été ajoutés simultanément au mélange réactionnel après les avoir dissous dans 5 mL d'éthanol séparément et finalement complétés par 10 mL d'eau. Le mélange résultant a été agité dans des conditions de reflux et la progression de la réaction a été suivie par CCM. Après achèvement de la réaction, le mélange a été filtré directement à chaud. Puis les produits ont été lavés avec un mélange éthanol- H_2O (1:1) chaud et séchés à température ambiante pour donner les dérivés benzylpyrazolylcoumarines **5a-i** correspondants.

III. Résultats spectroscopiques

4-((4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)(phenyl)methyl)-5-methyl-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one 5a



Poudre blanche, Pf 230-232 °C; RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) δ (ppm) 2,29 (s, 3H, CH_3 -5'), 5,61 (s, 1H, H-9), 7,11-7,16 (m, 3H, H_{coum} -7,8, H_{ar} -13), 7,21-7,32 (m, 4H, H_{ar}), 7,53-7,57 (t, $J = 8,4 \text{ Hz}$, H_{coum} -6), 7,81 (d, $J = 8 \text{ Hz}$, 1H, H_{coum} -5), 12,69 (s Large, 1H, OH-4) ; RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ (ppm) 10,54, 33,82, 105,17, 106,13, 116,19, 119,97, 123,86, 124,49, 126,14, 127,22, 128,46, 131,88, 141,38, 144,68, 152,66, 162,51, 165,14, 166,55; Ms (ESI+) m/z (%) = 349 (100%) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IV. Étude DFT (théorie fonctionnelle de la densité)

Les structures 2D des composés synthétisés ont été dessinées et pré-optimisées à l'aide du programme Avogadro 1.2 [28]. Ensuite, les géométries obtenues des composés synthétisés ont été optimisées en utilisant le niveau DFT (théorie fonctionnelle de la densité) et la méthode B3LYP avec l'ensemble de base 6-311G** en utilisant le logiciel ORCA V 4.0 [29,30].

V. Évaluation de l'activité biologique

V.1. Évaluation du piégeage des radicaux libres des composés 5a-i

L'activité antioxydante des composés synthétisés **5a-i** a été réalisée par le test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH $\cdot$) selon le protocole suivant [31,32]. 40 μL de chaque échantillon de différentes concentrations (400, 200, 100, 50 et 25 $\mu\text{g/mL}$) ont été mélangés avec 2 mL de DPPH (0,1 mM) fraîchement préparé dans du méthanol et incubés à température ambiante pendant 1 h dans l'obscurité. La couleur violette de la solution de DPPH a disparu lorsqu'elle a été réduite par les échantillons testés. La diminution de l'absorbance a été enregistrée à 517 nm. L'effet de piégeage du DPPH a été calculé en pourcentage de la décoloration du DPPH en utilisant l'équation (1) :

$$PI (\%) = [(Ac - As)/Ac] \times 100 \quad \text{Eq (1)}$$

Où Ac est l'absorbance du contrôle (absorbance du DPPH^{*} dans la solution éthanolique sans échantillon), et As est l'absorbance des composés de l'échantillon testé après 60 mn d'incubation. L'acide ascorbique (AA) a été utilisé comme standard pour le dépistage de l'activité antioxydante. Chaque mesure a été effectuée en triplicata.

V.2. Évaluation de l'activité antifongique *in-vitro* des dérivés benzylpyrazolylcoumarines 5a-i

L'activité antifongique a été étudiée au service de microbiologie du centre hospitalier universitaire de Tizi-Ouzou, en Algérie.

Les composés synthétisés **5a-i** ont été testés *in vitro* contre des souches de *Candida albicans* et *Aspergillus niger* par la technique de diffusion sur disque [33]. Un disque de 6 mm de diamètre imprégné du composé à tester préalablement dissous dans du DMSO à une concentration de 5 mg/mL est déposé aseptiquement dans la boîte de Pétri préalablement inoculée avec la suspension microbienne. Après 7 jours d'incubation à 37°C pour *Aspergillus niger* et 48°C pour *Candida albicans*, l'activité antifongique a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. La CMI est définie comme la plus faible concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Pour la déterminer, une série de dilutions dans le DMSO de différentes solutions des composés actifs à des concentrations allant de 500 à 62,5 µg/mL a été préparée, 1 mL de chaque concentration a été mélangé à 9 mL de milieu agar Sabouraud répartis dans des boîtes de Pétri, puis la suspension fongique a étéensemencée à la surface du milieu agar. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 48 heures pour *Candida albicans* et 7 jours pour *Aspergillus niger* à 37°C.

VI. Études de docking moléculaire

Afin de comprendre les activités antifongiques des composés synthétisés au niveau atomique, des études de docking moléculaire ont été réalisées. La structure cristallographique PDB ID 1IYL avec une résolution de 3,20 Å correspondant à la protéine N-myristoyltransférase (NMT) de *candida albicans* complexée avec son inhibiteur R64 ayant un noyau benzofurane a été téléchargée à partir du Royal Collaboratory for Structural Bioinformatics, RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>). La NMT est la cible thérapeutique pour le développement d'agents chimio-thérapeutiques antifongiques. Tous les hétéroatomes, les atomes non récepteurs, l'eau et les autres ions ont été supprimés [34]. Les

atomes d'hydrogène polaires et les charges partielles de Gasteiger ont été ajoutés à l'aide d'Autodock Tools 1.5.7 [35]. Les acides aminés les plus proches de R64 et les structures optimisées des composés synthétisés ont été traités comme flexibles pendant les simulations de docking moléculaire tandis que le reste de la protéine a été maintenu rigide [36]. Des études de docking moléculaire ont été réalisées sur les composés préparés afin de prédire le mode de liaison, les énergies de liaison et l'orientation au niveau du site actif de la protéine NMT sélectionnée. Ainsi, une grille de 48×50×50 points autour du domaine modélisé a été utilisée. Les dimensions d'espacement de la grille étaient de 0,375 Å. L'algorithme génétique lamarckien (LGA) tel qu'implémenté dans le logiciel Autodock 4 [37] avec les paramètres d'accostage par défaut ont été utilisés. À la fin du docking, la meilleure conformation du ligand a été analysée pour ses interactions de liaison.

Références bibliographiques

- [1] M. M. Heravi, V. Zadsirjan, Introduction. Recent Advances in Applications of Name Reactions in Multicomponent Reactions, *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952. 506 (2021) 2013–2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818584-1/00001-X>.
- [2] C. Capello, U. Fischer, K. Hungerbühler, What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents, *Green Chemistry*. 9 (2007) 927–93. <https://doi.org/10.1039/b617536h>.
- [3] M. Shiri, M.A. Zolfigol, Surfactant-type catalysts in organic reactions, *Tetrahedron*. 65 (2009) 587–598. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.09.085>.
- [4] K. Manabe, Y. Mori, T. Wakabayashi, S. Nagayama, S. Kobayashi, Organic synthesis inside particles in water: Lewis acid - surfactant-combined catalysts for organic reactions in water using colloidal dispersions as reaction media, *Journal of the American Chemical Society*. 122 (2000) 7202–7207. <https://doi.org/10.1021/ja001420r>.
- [5] T. Quadri-Spinelli, J. Heilmann, T. Rali, O. Sticher, Bioactive coumarin derivatives from the fern *Cyclosorus interruptus*, *Planta Medica*. 66 (2000) 728–733. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9908>.
- [6] Y. Guo, Y. Wang, H. Li, K. Wang, Q. Wan, J. Li, Y. Zhou, Y. Chen, Novel Nitric Oxide Donors of Phenylsulfonylfuroxan and 3-Benzyl Coumarin Derivatives as Potent Antitumor Agents, *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 9 (2018) 502–506. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00125>.
- [7] N.O. Mahmoodi, Z. Jalalifard, G.P. Fathanbari, Green synthesis of bis-coumarin derivatives using Fe(SD)₃ as a catalyst and investigation of their biological activities, *Journal of the Chinese Chemical Society*. 67 (2020) 172–182. <https://doi.org/10.1002/jccs.201800444>.
- [8] C.R. Sahoo, J. Sahoo, M. Mahapatra, D. Lenka, P. Kumar Sahu, B. Dehury, R. Nath Padhy, S. Kumar Paidesetty, Coumarin derivatives as promising antibacterial agent(s), *Arabian Journal of Chemistry*. 14 (2021) 102922. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.102922>.
- [9] M. Himly, B. Jahn-Schmid, K. Pittertschatscher, B. Bohle, K. Grubmayr, F. Ferreira, H. Ebner, C. Ebner, Ig E-mediated immediate-type hypersensitivity to the pyrazolone drug propyphenazone, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 111 (2003) 882–888. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.163>.
- [10] F. Moreau, N. Desroy, J.M. Genevard, V. Vongsouthi, V. Gerusz, G. Le Fralliec, C. Oliveira, S. Floquet, A. Denis, S. Escaich, K. Wolf, M. Busemann, A. Aschenbrenner, Discovery of new Gram-negative antivirulence drugs: Structure and properties of novel *E. coli* WaaC inhibitors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 18 (2008) 4022–4026. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.117>.

- [11] R. Parajuli, J. Banerjee, H. Khanal, Synthesis of some pyrazolone derivatives and evaluation of its antibacterial and cytotoxic activity, *Oriental Journal of Chemistry*. 31 (2015) 2099–2106. <https://doi.org/10.13005/ojc/310430>.
- [12] P.P. Ghosh, G. Pal, S. Paul, A.R. Das, Design and synthesis of benzylpyrazolyl coumarin derivatives via a four-component reaction in water: Investigation of the weak interactions accumulating in the crystal structure of a signified compound, *Green Chemistry*. 14 (2012) 2691–2698. <https://doi.org/10.1039/c2gc36021g>.
- [13] A. Saha, S. Payra, S. Banerjee, One-pot multicomponent synthesis of highly functionalized bio-active pyrano[2,3-c]pyrazole and benzylpyrazolyl coumarin derivatives using ZrO₂ nanoparticles as a reusable catalyst, *Green Chemistry*. 17 (2015) 2859–2866. <https://doi.org/10.1039/c4gc02420f>.
- [14] S. Yaragorla, A. Pareek, R. Dada, Ca(II)-catalyzed, one-pot four component synthesis of functionally embellished benzylpyrazolyl coumarins in water, *Tetrahedron Letters*. 56 (2015) 4770–4774. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.06.049>.
- [15] S. Karami, M.G. Dekamin, E. Valiey, P. Shakib, DABA MNPs: A new and efficient magnetic bifunctional nanocatalyst for the green synthesis of biologically active pyrano[2,3-: C] pyrazole and benzylpyrazolyl coumarin derivatives, *New Journal of Chemistry*. 44 (2020) 13952–13961. <https://doi.org/10.1039/d0nj02666b>.
- [16] B. Pawar, V. Shinde, A. Chaskar, n-Dodecylbenzene Sulfonic Acid (DBSA) as a Novel Brønsted Acid Catalyst for the Synthesis of Bis(indolyl)methanes and Bis(4-hydroxycoumarin-3-yl)methanes in Water., *Green and Sustainable Chemistry*. 03 (2013) 56–60. <https://doi.org/10.4236/gsc.2013.32010>.
- [17] Y. Zheng, Y. Zheng, Z. Wang, Y. Cao, Q. Shao, Z. Guo, Sodium dodecyl benzene sulfonate-catalyzed reaction for aromatic aldehydes with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone in aqueous media, *Green Chemistry Letters and Reviews*. 11 (2018) 217–223. <https://doi.org/10.1080/17518253.2018.1465600>.
- [18] A. V. Chate, B.A. Shaikh, G.M. Bondle, S.M. Sangle, Efficient atom-economic one-pot multicomponent synthesis of benzylpyrazolyl coumarins and novel pyrano[2,3-c]pyrazoles catalysed by 2-aminoethanesulfonic acid (taurine) as a bio-organic catalyst, *Synthetic Communications*. 49 (2019) 2244–2257. <https://doi.org/10.1080/00397911.2019.1619772>.
- [19] R.M. Silverstein, F.X. Webster, D.J. Kiemle, D.L. Bryce, Infrared spectroscopy, in: *spectrometric identification of organic compounds*, 8th ed., n.d.: pp. 71–125.
- [20] A. Bayu, D. Nandiyanto, R. Oktiani, R. Ragadhita, How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material, *Indonesian Journal of Science & Technology*. 4 (2019) 97–118. <https://doi.org/DOI: http://dx.doi.org/10.17509/ijost.v4i1.15806> |.
- [21] L.J. BELLAMY, C.B.E, B.Sc, *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, 2nd ed.,

- Chapman and Hall, 1980. <https://doi.org/DOL: 10.1007/978-94-011-6520-4>.
- [22] H. Jelali, A. Chakchouk-Mtibaa, L. Baklouti, H. Bilel, Y. Bathich, L. Mellouli, N. Hamdi, Development of new multicomponent reactions in eco-friendly media-greener reaction and expeditious synthesis of novel bioactive benzylpyranocoumarins, *Journal of Chemistry*. 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/8693614>.
- [23] Z. Piruzmand, J. Safaei-Ghomi, M.A. Ghasemzadeh, A facile solvent-free route for the one-pot multicomponent synthesis of benzylpyrazolyl coumarins catalyzed by FeCl₃ . SiO₂ nanoparticles, *Bulgarian Chemical Communications*. 48 (2016) 619–623.
- [24] K. Manabe, S. Iimura, X.M. Sun, S. Kobayashi, Dehydration reactions in water. Brønsted acid-surfactant-combined catalyst for ester, ether, thioether, and dithioacetal formation in water, *Journal of the American Chemical Society*. 124 (2002) 11971–11978. <https://doi.org/10.1021/ja026241j>.
- [25] C.D. Bruce, M.L. Berkowitz, L. Perera, M.D.E. Forbes, Molecular dynamics simulation of sodium dodecyl sulfate micelle in water: Micellar structural characteristics and counterion distribution, *Journal of Physical Chemistry B*. 106 (2002) 3788–3793. <https://doi.org/10.1021/jp013616z>.
- [26] S. Hammad, S. Bouaziz-Terrachet, R. Meghmem, D. Meziane, Pharmacophore development, drug-likeness analysis, molecular docking, and molecular dynamics simulations for identification of new CK2 inhibitors, *Journal of Molecular Modeling*. 26 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00894-020-04408-2>.
- [27] A. Siwek, J. Stefanska, K. Dzitko, A. Ruszczak, Antifungal effect of 4-arylthiosemicarbazides against *Candida* species. Search for molecular basis of antifungal activity of thiosemicarbazide derivatives, *Journal of Molecular Modeling*. 18 (2012) 4159–4170. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1420-5>.
- [28] M.D. Hanwell, D.E. Curtis, D.C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G.R. Hutchison, Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *Journal of Cheminformatics*. 4 (2012) 1–17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
- [29] R.G. Parr, W. Yang, Density Functional Approach to the Frontier-Electron Theory of Chemical Reactivity, *Journal of the American Chemical Society*. 106 (1984) 4049–4050. <https://doi.org/10.1021/ja00326a036>.
- [30] C. Morell, A. Grand, A. Toro-Labbé, New dual descriptor for chemical reactivity, *Journal of Physical Chemistry A*. 109 (2005) 205–212. <https://doi.org/10.1021/jp046577a>.
- [31] B. Nickavar, M. Kamalinejad, H. Izadpanah, In vitro free radical scavenging activity of five *Salvia* species., *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 20 (2007) 291–294.
- [32] B. Nickavar, N. Esbati, Evaluation of the Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Three *Thymus* Species, *JAMS Journal of Acupuncture and Meridian Studies*. 5

- (2012) 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2012.03.003>.
- [33] I. Rasooli, M.H. Fakoor, D. Yadegarinia, L. Gachkar, A. Allameh, M.B. Rezaei, Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils, *International Journal of Food Microbiology*. 122 (2008) 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.048>.
- [34] A. Benazzouz-Touami, A. Chouh, S. Halit, S. Terrachet-Bouaziz, M. Makhoulfi-Chebli, K. Ighil-Ahriz, A.M.S. Silva, New Coumarin-Pyrazole hybrids: Synthesis, Docking studies and Biological evaluation as potential cholinesterase inhibitors, *Journal of Molecular Structure*. 1249 (2022) 131591. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131591>.
- [35] A. Allouche, Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares, *Journal of Computational Chemistry*. 32 (2012) 174–182. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- [36] S. Bouaziz-Terrachet, A. Toumi-Maouche, B. Maouche, S. Taïri-Kellou, Modeling the binding modes of stilbene analogs to cyclooxygenase-2: A molecular docking study, *Journal of Molecular Modeling*. 16 (2010) 1919–1929. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0679-7>.
- [37] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *Journal of Computational Chemistry*. 19 (1998) 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-987x\(19981115\)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-987x(19981115)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b).

Partie III

*Synthèse d'une nouvelle série de molécules hybrides dérivées
d'isonicotinoylpyrazolylcoumarine.*

Étude du mécanisme, de l'activité biologique et calculs théoriques

Chapitre 1

*Synthèse des dérivés d'isonicotinoylpyrazolylcoumarine et
étude computationnelle*

La combinaison de plusieurs entités hétérocycliques offre la possibilité de créer de nouveaux composés multi-cycliques présentant une activité biologique nouvelle ou améliorée [1–3]. Les coumarines (2H-chromène-2-one) sont des composés naturels présentant un large spectre d'activités biologiques. Ce sont des intermédiaires clés qui ont acquis une place particulière dans les domaines hétérocyclique et pharmaceutique pour la synthèse de nouveaux composés en raison de leur diversité structurale et de leurs activités polyvalentes telles que des activités anti-inflammatoires, anticoagulantes et d'inhibition de la maladie d'Alzheimer [4], antivirales [5], antifongiques [6], anti-oxydantes [7] et anticancéreuses [8,9]. Plusieurs études ont rapporté que l'association du cycle coumarine avec divers autres hétérocycles permet la génération de nouvelles molécules hybrides avec des activités biologiques significatives. Différents dérivés de la coumarine ont montré des activités antimicrobiennes et antituberculeuses remarquables sous la forme d'hybrides à base d'hétérocycles tels que le benzimidazole [10], les thiazoles, l'imidazole, les chalcones et les pyrimidines [11–14]. Le potentiel antipaludique [15] et les propriétés anticancéreuses de certains nouveaux dérivés de la pyrazoline contenant de la coumarine ont également été rapportées [16]. Dans la découverte et la recherche de médicaments, les composés hétérocycliques azotés ont montré une large gamme d'activités pharmacologiques et le cycle pyrazoline est l'une des structures centrales de ces divers produits synthétiques. Les dérivés de la pyrazoline sont connus pour leurs différentes activités biologiques, notamment antibactériennes [17], antimicrobiennes [18], anti-inflammatoires [19], antidépressives [20], antidiabétiques [21] et antituberculeuses [22]. De nombreuses études ont également montré que la liaison du cycle pyrazoline avec d'autres motifs hétérocycliques sous forme hybridée fournit des agents anticancéreux prometteurs [23].

Pour la synthèse d'hétérocycles azotés tels que le pyrazole, l'isoxazole, le carbazole, l'imidazole et le thiazole, plusieurs méthodes ont été développées et les β -dicétones ou 1,3-dicétones sont des synthons utiles pour la préparation de ces hétérocycles [24–26]. Des études récentes ont montré que les dérivés de la pyrazoline sont actifs contre de nombreuses mycobactéries pathogènes et que l'incorporation d'isoniazide (INH) dans un fragment de pyrazoline peut donner lieu à des agents antituberculeux plus puissants [27]. Depuis plus de 60 ans, l'INH est utilisé comme médicament antituberculeux de première intention en association avec la Rifampicine, l'Ethambutol et le Pyrazinamide pour traiter les infections tuberculeuses et reste l'un des médicaments antituberculeux les plus efficaces. Malheureusement, les souches bactériennes résistantes à l'INH sont de plus en plus fréquentes, principalement en raison de l'utilisation intensive et prolongée de ce médicament

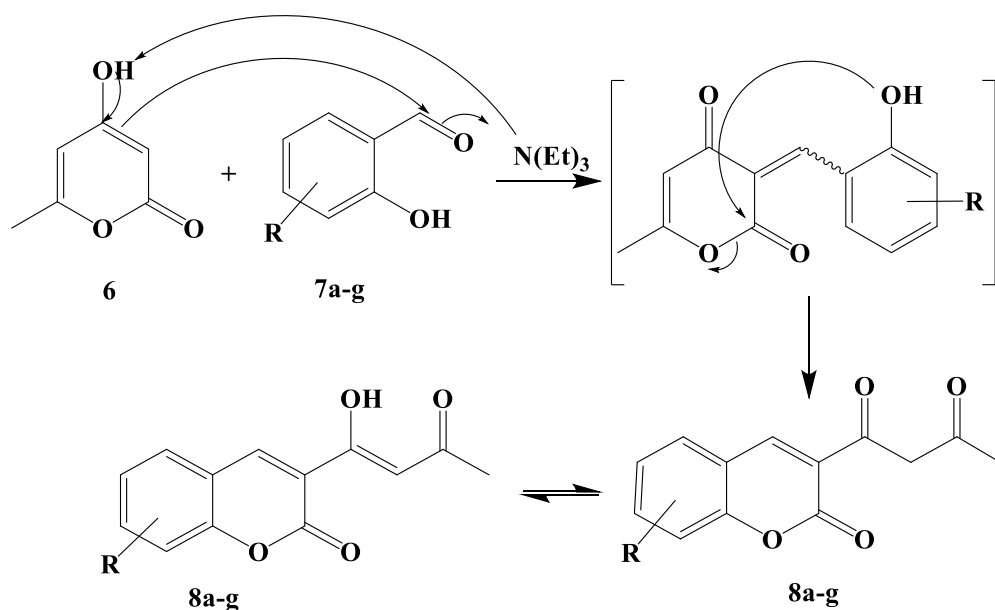
[27]. Des efforts ont été faits pour développer des hybrides d'INH comme nouveaux agents anti-tuberculeux afin de surmonter la résistance, améliorer l'activité et diminuer la toxicité. Dans ce contexte, nous avons choisi l'isoniazide comme réactif pour la synthèse de nouveaux dérivés de la pyrazoline. Certains dérivés pyrazoliques dérivés du pharmacophore de l'INH et de la coumarine ont déjà été étudiés pour leur activité anti-mycobactérienne in vitro et les composés obtenus ont montré une activité significative [28]. Par conséquent, les propriétés thérapeutiques associées à ces trois hétérocycles en font des unités structurales utiles pour la découverte de médicaments.

Dans la suite de nos travaux de recherche sur la synthèse des hétérocycles fusionnés [29–31] et compte tenu de l'importance des molécules hybrides, nous décrivons une stratégie simple pour la synthèse d'une nouvelle série d'isonicotinoylpyrazolylcoumarine dans des conditions modérées en utilisant la 3-acétoacétylcoumarine et ses dérivés en tant que principaux réactifs.

I. Condensation de la 3-acétoacétylcoumarine **8a avec l'isoniazide **9** dans différentes conditions de réaction**

I.1. Synthèse des dérivés 3-acétoacétylcoumarines **8a-g**

Les dérivés 3-acétoacétylcoumarines **8a-g** ont été récemment synthétisés dans notre laboratoire à partir du salicylaldéhyde substitués **7a-g** et du 4-hydroxy-6-méthyl-2H-pyran-2-one **6** (acide lactone triacétique = TAL) par un processus de condensation de Knoevenagel assisté par micro-ondes et de translactonisation intramoléculaire dans un milieu organobasique (**Schéma III.1**). Ce sont des composants essentiels, car ils contiennent un noyau de coumarine et un groupe méthylène actif de la fraction acétoacétyle, qui est susceptible de subir d'autres transformations chimiques intéressantes [32].

Schéma III.1 : Synthèse des 3-acétoacétylcoumarines **8a-g**

Le composé 3-(5-Hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-5-yl)-2*H*-chromèn-2-one **10a** a été synthétisé à partir de la réaction de condensation de la 3-acétoacétylcoumarine **8a** avec l'isoniazide **9**. Afin d'optimiser les conditions opératoires de la réaction, plusieurs essais ont été réalisés et les résultats sont illustrés dans le schéma III.2 et reportés dans le tableau III.1.

Nous avons initié la réaction en faisant réagir la 3-acétoacétylcoumarine **8a** avec de l'hydrazide de l'acide isonicotinique **9** dans un milieu alcoolique en présence d'acide chlorhydrique concentré au reflux. À notre surprise, le produit isolé ne correspond pas à la structure du **10a** attendu mais à une coumarine-pyrazole **11a**. La réaction a été reproduite au reflux de l'acide acétique seul dans un deuxième essai ensuite au reflux d'éthanol et en présence de l'acide acétique en tant que catalyseur dans un troisième essai, le produit isolé correspond toujours à **11a**. Nous avons substitué l'éthanol par l'acide acétique en présence d'un acide de Lewis ZnCl_2 (10% et 20%) au reflux, les résultats ont montré que le composé **11a** est toujours le seul dérivé isolé.

Dans un mélange chloroforme-éthanol (2 :1) et en présence de quelques gouttes de HCl , avec un chauffage doux entre 40-50 °C, la réaction a fourni deux produits distincts **10a** désiré et **11a** (Tableau III.1, entrées 1-5).

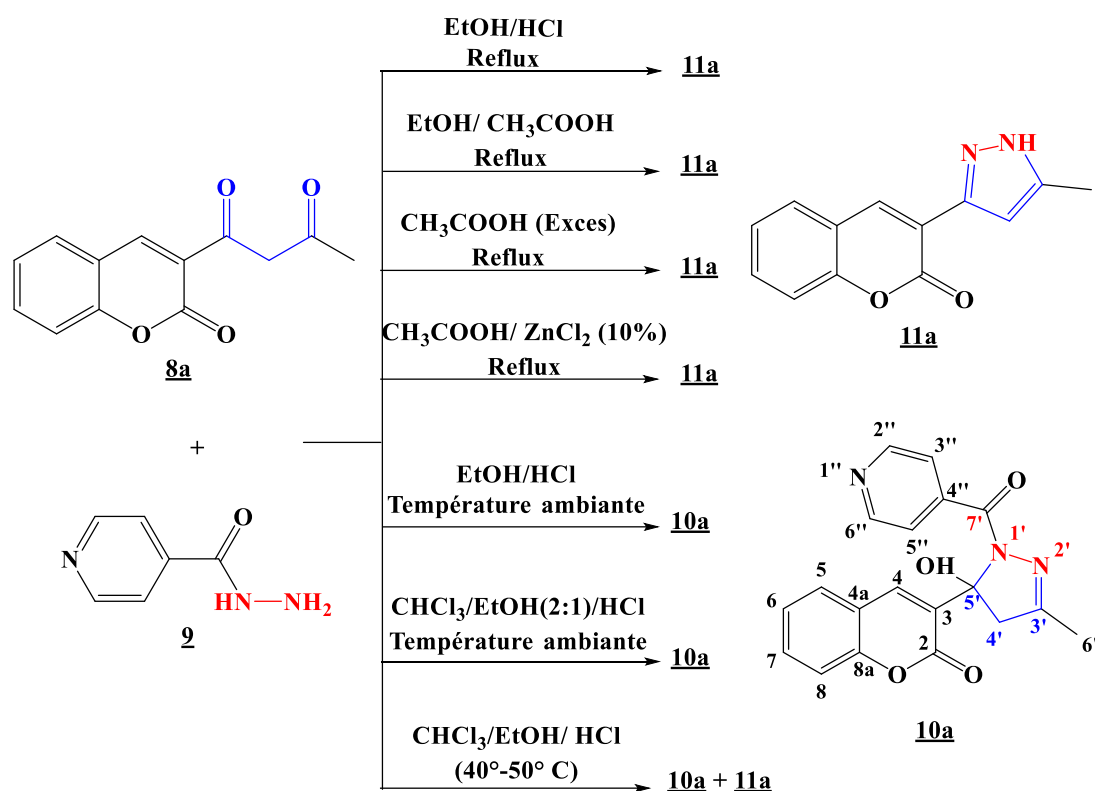


Schéma III.2 : Condensation de la 3-acétoacétylcoumarine **8a** avec l'isoniazide **9** dans différentes conditions de réaction

Tableau III.1: Condensation de la 3-acétoacétylcoumarine **8a** avec l'isoniazide **9** dans différentes conditions de réaction

Entrée	Solvent	Catalyseur	Temperature (°C)	Composé obtenu
1	Ethanol	HCl (20 gouttes)	Reflux	11a
2	Ethanol	CH ₃ COOH	Reflux	11a
3	CH ₃ COOH	CH ₃ COOH	Reflux	11a
4	CH ₃ COOH	ZnCl ₂ 10%	Reflux	11a
5	Chloroform-Ethanol (2:1)	HCl (16 gouttes)	40-50	10a + 11a
6	Ethanol	HCl (16 gouttes)	Ambiante	10a
7	Chloroform-Ethanol (2:1)	HCl (16 gouttes)	Ambiante	10a

Comme indiqué dans les résultats précédent, le chauffage a probablement provoqué une déshydratation au niveau du OH en position 5, suivie d'une décarbonylation ce qui a conduit à l'élimination de la fraction isoniazide (**schéma III.3**). Par conséquent, la réaction a été répétée dans de l'éthanol absolu et du HCl concentré comme catalyseur à température ambiante, et après agitation pendant 24 heures, le produit souhaité **10a** a été isolé. Une

quantité catalytique de HCl dans du chloroforme/éthanol (2:1) et à température ambiante s'est avérée être le procédé le plus efficace en termes de rendement et de vitesse de réaction pour obtenir le composé **10a**.

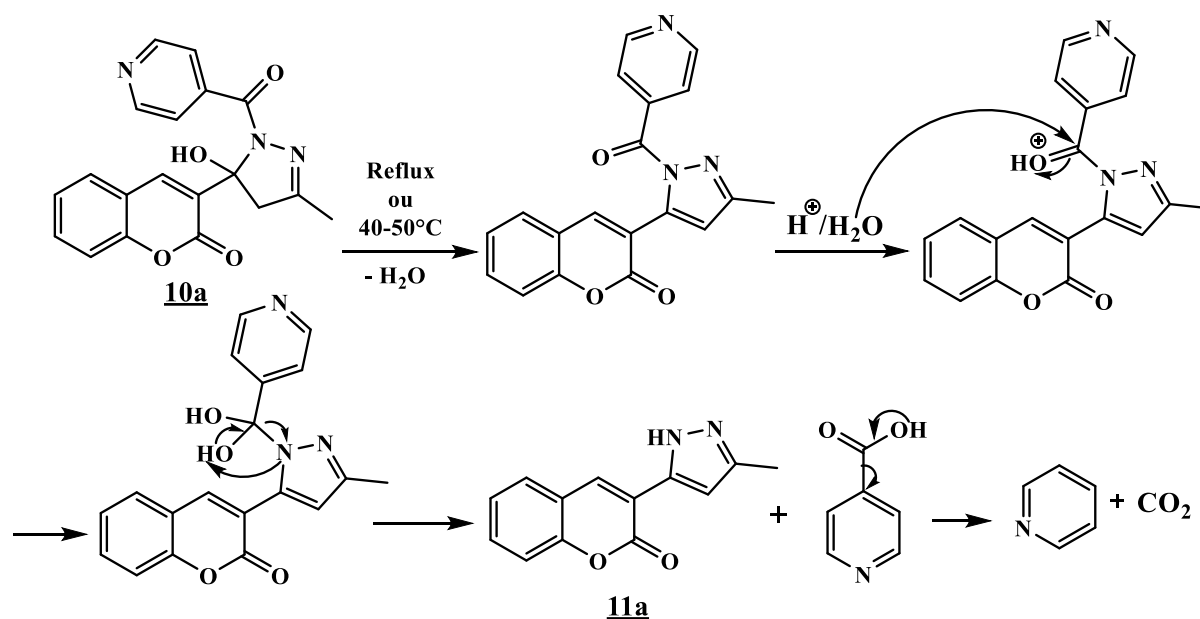


Schéma III.3 : Mécanisme plausible pour la formation du composé **11a**.

II. Synthèse des dérivés de 3-(isonicotinoyl-5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-2H-chromèn-2-ones **10a-g**

Dans les conditions opératoires choisis (chloroforme-éthanol (2 :1)/ HCl/ température ambiante), nous avons préparé une série de produits en utilisant plusieurs dérivés de la 3-acétoacétylcoumarine **8b-g**, afin d'enrichir la série et d'étudier l'influence de leurs différents substituants (donneurs ou attracteurs) sur le rendement de la réaction ainsi que sur les différentes activités biologiques envisagées.

Il ressort de ces résultats que le rendement de formation des composés **10a-g** était significativement influencé par la nature et la position des substituants sur le cycle coumarine (**Tableau III.2**). Les meilleurs rendements ont été obtenus lors de l'utilisation de la 3-acétoacétyl-8-hydroxycoumarine **8d** (88%), suivie par le 3-acétoacétyl-6-Iodocoumarine **8f** (85%), la 3-acétoacétyl-7-hydroxycoumarine **8b** (77%) et la 3-acétoacétylbenzo[*f*]coumarine **8g** (76%). Le rendement le plus faible (45%) a été obtenu en utilisant **8e**. Ces résultats indiquent que les substituants donneurs liés à la coumarine facilitent la réaction et permettent d'obtenir le produit avec de meilleurs rendements.

Tableau III.2 : Synthèse des dérivés **10a-g** de 3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-5-yl)-2*H*-chromén-2-one catalysée par HCl conc. dans un mélange chloroforme-éthanol (2:1) à température ambiante.

Entrée	Composé	R	Rendement (%)
1	10a		75
2	10b		77
3	10c		74
4	10d		88
5	10e		45
6	10f		85
7	10g		76

Deux structures sont possibles pour les composés obtenus **10a-g/10a'-g'** (Schéma III.4). Pour confirmer celle qui correspond à ces derniers, différentes techniques d'analyse ont été réalisées.

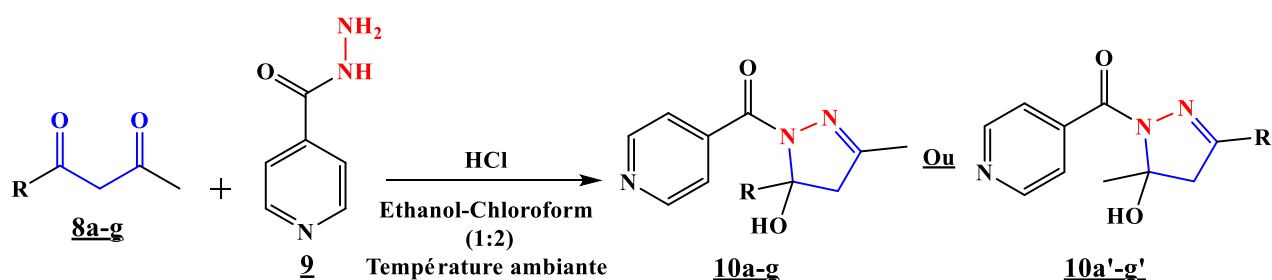
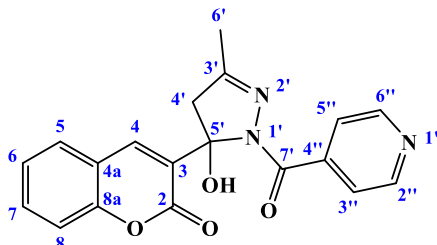


Schéma III.4 : Produits possibles suite à la réaction entre les molécules **8a-g** et **9**.

II.1. Caractérisation du composé 3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (10a)

Le composé **10a** a été obtenu par réaction de la 3-acétoacétylcoumarine **8a** et d'hydrazide de l'acide isonicotinique **9**.



3-(5-Hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (10a)

II.1.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI (+), révèle un ion moléculaire à $m/z = 350$ (100%) correspondant à $[M+H]^+$, confirmant ainsi la formule brute $C_{19}H_{15}N_3O_4$ du composé **10a**.

II.1.2. Étude par spectroscopie RMN du proton 1H

Le spectre RMN 1H du composé **10a** présente un signal singulet de multiplicité 3 dans les champs forts, à $\delta = 2,00$ ppm correspondant aux protons du méthyle. Un autre singulet apparaît à $\delta = 8,37$ ppm caractéristique du proton en position 4 du noyau coumarinique.

Deux signaux résonnant sous la forme de doublet à $\delta = 3,00$ et à $\delta = 3,41$ ppm par un couplage géminale et sont relatifs aux protons du méthylène de la pyrazoline. Les protons du cycle pyridine apparaissent sous forme de deux multiplets de multiplicité 2 chacun et avec un déplacement chimique égal à $\delta = 7,93$ ppm pour les protons H-2'' et H-6'' et à $\delta = 8,94$ ppm pour les protons H-3'' et H-5''. Les protons aromatiques du noyau coumarine émettent trois signaux, le premier se manifeste sous forme de multiplet de multiplicité deux à $\delta = 7,42$ ppm qui correspond aux protons H-7 et H-8, le second signal apparaît sous forme de triplet $\delta = 7,65$ ppm attribué au proton H-6, et le troisième se présente sous forme de doublet à $\delta = 7,91$ ppm et qui correspond au proton H-5. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le **tableau III.3**.

Tableau III.3 : Résultats de l'analyse RMN ^1H à 400 MHz du composé **10a**

δ (ppm)	Multiplicité	J (Hz)	attribution
2,02	s (3H)	-	H-6' (CH ₃)
3,04	d (1H)	18,8	H-4' (CH ₂)
3,43	d (1H)	18,8	H-4' (CH ₂)
7,42	m (2H)	-	Hcoum-7,8
7,65	t (1H)	8,4	Hcoum-6
7,91	d (1H)	7,6	Hcoum-5
7,97	m (2H)	-	Hpyr-3'',5''
8,39	s (1H)	-	Hcoum-4
8,97	m (2H)	-	Hpyr-2'',6''

II.1.3. Étude par spectroscopie RMN ^{13}C

Les résultats de la RMN ^{13}C , confortent ceux obtenus en RMN ^1H . En effet, le spectre présente effectivement tous les signaux qui sont en accord avec le nombre d'atomes du carbone du composé **10a**.

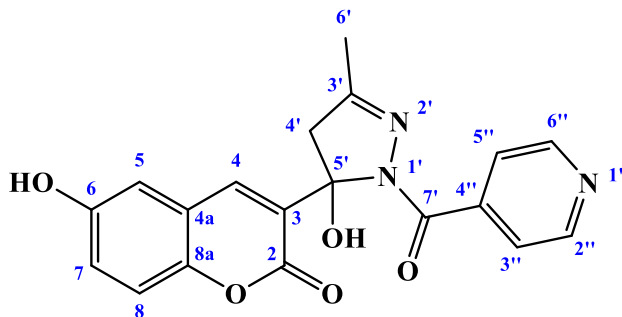
Dans le domaine des carbones sp^3 nous observons deux pics, le premier apparaît à $\delta = 16,22$ ppm et le deuxième à $\delta = 51,47$ ppm qui sont attribués aux carbones des groupements méthyle et méthylène respectivement. Le signal qui apparaît à $\delta = 89,61$ ppm correspond au carbone asymétrique C-5'. Dans le domaine des Csp^2 apparaissent les pics des carbones de la pyridine à $\delta = 125,25$ ppm pour C-3'',5'' et à $\delta = 153,40$ ppm pour C-2'',6''. Dans les champs faibles apparaissent les signaux attribuables aux carbones des groupes carbonyles C2 et C7'. Dans le **tableau III.4**, sont représentés les résultats de l'analyse RMN ^{13}C du composé **10a**.

Tableau III.4 : Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 101 MHz du composé **10a**

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
16,22	C-6'	132,43	C-3
51,47	C-4'	140,08	C-4
89,61	C-5'	144,17	C-4''
116,36	C-8	150,04	C-3'
119,30	C-4a	153,40	C-2'',6''
125,25	C-3'',5''	158,47	C-8a
125,45	C-6	159,09	C-2
128,10	C-5	161,68	C-7'
129,43	C-7		

II.2. Caractérisation du composé 6-Hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (10b)

Par la même méthode de synthèse décrite précédemment, nous avons isolé un seul produit qui est le 6-hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one **10b** en utilisant la 6-hydroxy-3-acétoacétylecoumarine **8b**.



6-Hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (10b)

II.2.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI (+), révèle un ion moléculaire à $m/z = 366,1$ (100%) correspondant à $[M+H]^+$, confirmant ainsi la formule brute $C_{19}H_{15}N_3O_5$ du composé **10b**.

II.2.2. Étude par spectroscopie RMN du proton 1H

Le spectre RMN 1H de **10b** montre deux signaux singulets à $\delta = 1,99$ et $\delta = 8,25$ ppm qui sont attribués aux résonances protoniques du groupe méthyle et du proton H-4 du cycle coumarine respectivement. Il présente deux multiplets à $\delta = 8,94$ ppm (H-2'',6'') et $\delta = 7,94$ ppm (H-3'',5'') qui sont attribués aux protons du cycle pyridine, et deux autres doublets à $\delta = 2,97$ et $\delta = 3,39$ ppm correspondant aux deux protons méthylène du cycle pyrazoline. Les autres protons aromatiques de la benzopyranone sont apparus sous forme de doublets dédoublés à $\delta = 7,09$ ppm pour le proton H-5, et sous forme de doublet à $\delta = 7,19$ ppm pour le proton H-7 et à $\delta = 7,26$ ppm pour le proton H-8.

L'apparition des deux pics larges dans les champs faibles à $\delta = 7,73$ ppm et $\delta = 9,84$ ppm suggère la présence de deux protons liés à un hétéroatome qui ne peuvent être attribués qu'aux protons du groupe OH en position 5' de la pyrazoline et en position 6 du noyau coumarinique, confirmant ainsi l'obtention du produit **10b**. Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau III.5**.

Tableau III.5 : Résultats de l'analyse RMN ^1H à 500 MHz du composé **10b**

δ (ppm)	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
1,99	s (3H)	-	H-6' (CH ₃)
2,97	d (1H)	18,9	H-4' (CH ₂)
3,38	d (1H)	18,9	H-4' (CH ₂)
7,09	dd (1H)	2,8 ; 8,9	Hcoum-5
7,19	d (1H)	2,8	Hcoum-7
7,26	d (1H)	8,9	Hcoum-8
7,73	s L (1H)	-	OH-5'
7,94	m (2H)	-	Hpyr-3'',5''
8,25	s (1H)	-	Hcoum-4
8,94	m (2H)	-	Hpyr-2'',6''
9,84	s L (1H)	-	OH-6

II.2.3. Étude par spectroscopie RMN ^{13}C

Dans le spectre RMN ^{13}C , nous remarquons que tous les pics qui apparaissent sont compatibles avec les carbones du composé **10b**. Dans le domaine des carbones sp^3 , nous observons un signal à $\delta = 15,76$ ppm qui ne peut être attribué qu'au groupement méthyle en position 6'. Dans les champs faibles apparaissent les signaux attribuables aux carbones C2 et C7'. Dans le **tableau III.6**, sont représentés les résultats du spectre RMN ^{13}C du composé **10b**.

Tableau III.6 : Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 126 MHz du composé **10b**

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
15,76	C-6'	139,56	C-4
51,09	C-4'	146,28	C-4''
89,20	C-5'	147,79	C-8a
112,88	C-5	149,62	C-3'
116,74	C-7	154,10	C-6
119,35	C-8	157,97	C-2'',6''
120,00	C-3'',5''	158,86	C-2
124,96	C-4a	161,18	C-7'
127,55	C-3		

II.2.4. Étude par spectroscopie RMN 2D HSQC et HMBC du produit **10b**

A l'aide de la spectroscopie HSQC, tous les carbones protonés ont pu être attribués, en particulier le pic à $\delta = 51,09$ ppm attribué au carbone méthylène C-4', et à $\delta = 139,56$ ppm, attribué au carbone C-4, et les deux pics à $\delta = 124,96$ et $\delta = 143,79$ ppm attribués aux carbones pyridiniques (C-3'', C5'') et (C-2'', C-6'') respectivement. Les connectivités trouvées dans le spectre HMBC nous ont permis d'attribuer les résonances des carbones quaternaires et de confirmer les attributions de certains carbones porteurs de protons. Dans les connectivités HMBC (**Figure III.1**) H-4 est corrélé avec C-2, C-3, C-8a, et C-4a, H-5 est corrélé avec C-4a, C-6, C-8a et nous avons également une corrélation entre H_b-4' et C-3.

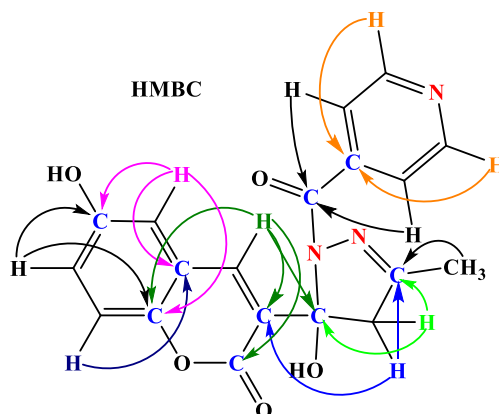


Figure III.1 : Connectivités HMBC de 6-Hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-5-yl)-2*H*-chromèn-2-one (**10b**)

II.2.5. Étude par spectroscopie RMN HMBC ^1H - ^{15}N

Afin de confirmer quel régioisomère est obtenu (**10b** ou **10b'**), une analyse RMN HMBC ^1H - ^{15}N a été réalisée (**Figure III.2**).

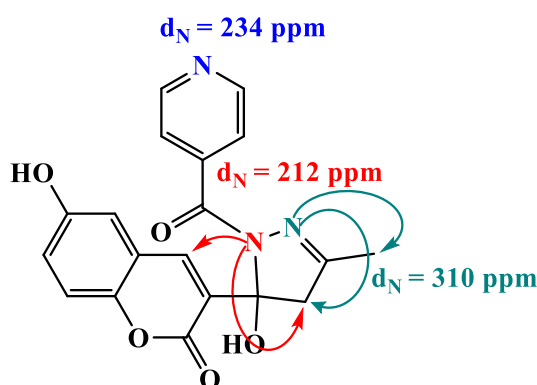


Figure III.2 : Corrélations principales ^1H - ^{15}N de la 6-Hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-5-yl)-2*H*-chromèn-2-one (**10b**)

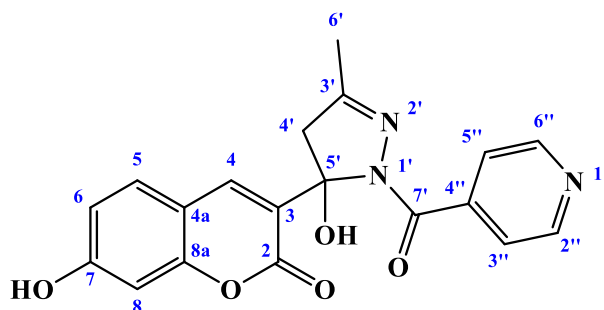
La séquence RMN ^1H - ^{15}N HMBC a montré qu'il existe une corrélation entre ^{15}N à 234 ppm (Npyr) et H-2'', H-3'', H-5'' et H-6''. Une autre corrélation a été observée entre ^{15}N à 310 ppm (=N-) avec H-4' et CH_3 en position C-3' et il y a également une corrélation entre ^{15}N à 212 ppm (-NR₁R₂) avec H-4' et H-4. Les trois signaux ^{15}N observés dans la **Figure III.2** à 310 ppm, 234 ppm et 212 ppm nous ont donc permis de confirmer la structure **10b** proposée. Comme le schéma RMN du composé **10b** est très similaire à celui des autres dérivés **10a,c-g**, leurs structures ont été supposées être de la même régiochimie.

II.3. Caractérisation du composé 7-hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (**10c**)

Nous avons travaillé dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites précédemment et en présence de 7-hydroxy-3-acétoacétylecoumarine **8c**, le composé **10c** a été formé.

II.3.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI (+), révèle un ion moléculaire à $m/z = 366,1$ (100%) correspondant à $[\text{M}+\text{H}]^+$, confirmant ainsi la formule brute $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5$ du composé **10c**.



7-hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (**10c**)

II.3.2. Étude par spectroscopie RMN du proton ^1H

Dans le spectre RMN ^1H réalisé pour le composé **10c**, on observe que le pic caractéristique des protons du groupe méthyle apparaissent sous forme de singulet de multiplicité trois à $\delta = 1,99$ ppm et les protons du méthylène se présentent sous forme de deux doublets à $\delta = 2,96$ ppm et $\delta = 3,36$ ppm. Le signal qui apparaît à $\delta = 8,24$ ppm correspond au proton du carbone C-4 du noyau chromène, et ceux à $\delta = 6,79$ ppm (H-8), à $\delta = 6,87$ ppm (H-6) et à $\delta = 7,69$ ppm (H-5) sont les pics relatifs aux protons du noyau aromatique. Les protons du noyau pyridine émettent deux signaux sous forme de multiplet et de multiplicité un chacun

aux déplacements chimique $\delta = 7,94$ ppm (H-3'',5'') et $\delta = 8,94$ ppm (H-2'',6''). L'apparition des deux pics larges à $\delta = 5,18$ ppm et $\delta = 10,78$ ppm confirme la présence des deux groupements OH en position C-5' et C-7 des deux noyaux pyrazoline et coumarine respectivement. Les résultats sont présentés dans le **tableau III.7** ci-dessous.

Tableau III.7 : Résultats de l'analyse RMN ^1H à 500 MHz du composé **10c**

δ (ppm)	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
1,99	s (3H)	-	H-6' (CH ₃)
2,96	d (1H)	18,8	H-4' (CH ₂)
3,36	d (1H)	18,8	H-4' (CH ₂)
5,18	s L (1H)	-	OH-5'
6,79	m (1H)	-	Hcoum-8
6,87	dd (1H)	2,0 ; 8,5	Hcoum-6
7,69	d (1H)	8,5	Hcoum-5
7,94	m (2H)	-	Hpyr-3'',5''
8,24	s (1H)	-	Hcoum-4
8,94	m (2H)	-	Hpyr-2'',6''
10,78	s L (1H)	-	OH-7

II.3.3. Étude par spectroscopie RMN ^{13}C

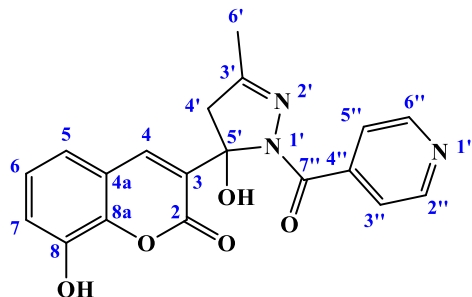
Dans le spectre RMN ^{13}C réalisé, nous remarquons que tous les pics qui apparaissent sont compatibles avec le type des carbones du composé **10c**. Les résultats du spectre RMN ^{13}C sont reportés dans le **tableau III.8** ci-dessous.

Tableau III.8 : Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 126 MHz du composé **10c**

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
15,79	C-6'	140,18	C-4
51,15	C-4'	143,68	C-4''
89,33	C-5'	149,93	C-3'
101,75	C-8	154,91	C-2'',6''
111,19	C-6	157,95	C-8a
113,60	C-4a	159,06	C-7
122,70	C-3'',5''	161,13	C-2
125,02	C-5	161,51	C-7'
130,22	C-3		

II.4. Caractérisation du composé 8-hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (10d)

La condensation de la 8-hydroxy-3-acétoacétylecoumarine **8d** avec l'isoniazide **9** selon les conditions établies a donné le composé **10d**.



8-hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (10d)

II.4.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI (+), révèle un ion moléculaire à $m/z = 366,1$ (100%) correspondant à $[M+H]^+$, confirmant ainsi la formule brute $C_{19}H_{15}N_3O_5$ du composé **10d**.

II.4.2. Étude par spectroscopie RMN du proton 1H

Les valeurs des déplacements chimiques des protons du composé **10d** sont en bon accord avec la structure proposée et sont quasi-similaire a ceux trouvé dans le cas des produits **10b** et **10c**.

En effet, l'analyse du spectre RMN 1H du dérivé **10d** nous a permis de relever les résultats suivants :

- Les signaux des deux groupes méthyle et méthylène dans le noyau pyrazolines sont conservés et apparaissent à $\delta = 2,00$ ppm, à $\delta = 3,00$ ppm et à $\delta = 3,41$ ppm.
- Les protons du noyau benzopyrane H-6,7 et H-5 apparaissent sous forme de deux multiplets observé entre 7,15-7,21 ppm et à 7,27 ppm.
- Le pic large qui apparait à 8,07 ppm est attribué au proton du groupe hydroxyl en position C-5' du noyau pyrazoline.
- Le pic caractéristique du proton H-4 se présente sous forme de singulet à 8,29 ppm.
- Le pic large qui apparait dans les champs faibles à 10,28 ppm est attribué au proton du groupe OH en position C-6 de la coumarine.

Dans le **tableau III.9** nous reportons tous les résultats enregistrés.

Tableau III.9 : Résultats de l'analyse RMN ^1H à 500 MHz du composé **10d**

δ (ppm)	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
2,00	s (3H)	-	H-6' (CH ₃)
3,00	d (1H)	18,9	H-4' (CH ₂)
3,41	d (1H)	18,9	H-4' (CH ₂)
7,15-7,21	m (2H)	-	Hcoum-6,7
7,27	m (1H)	-	Hcoum-5
7,97	m (2H)	-	Hpyr-3'',5''
8,07	s L (1H)	-	OH-5'
8,29	s (1H)	-	Hcoum-4
8,97	m (2H)	-	Hpyr-2'',6''
10,28	s L (1H)	-	OH-8

II.4.3. Étude par spectroscopie RMN ^{13}C

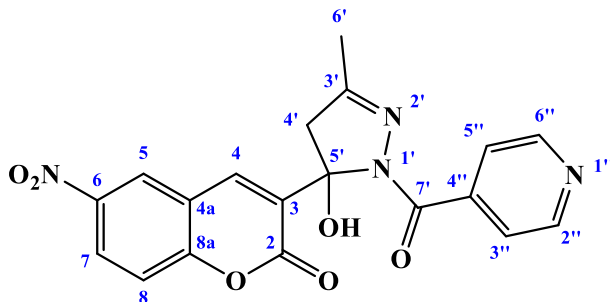
Nous remarquons que tous les pics qui apparaissent sont compatibles avec les carbones du produit **3d**. L'ensemble des résultats obtenus sont représentés dans le **tableau III.10**.

Tableau III.10 : Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 126 MHz du composé **10d**

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
15,80	C-6'	140,05	C-4
51,07	C-4'	141,66	C-4''
89,18	C-5'	143,49	C-8a
118,23	C-7	144,53	C-8
118,73	C-5	149,99	C-3'
119,78	C-4a	158,13	C-2'',6''
124,71	C-2'',6''	158,60	C-2
125,10	C-6	161,13	C-7'
127,36	C-3		

II.5. Caractérisation du composé 3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-6-nitro-2H-chromèn-2-one (10e)

Par la même méthode de synthèse décrite précédemment, nous avons isolé un seul produit qui est le 3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-6-nitro-2H-chromèn-2-one (**10e**) en utilisant le 6-nitro-3-acétoacétylecoumarine **8e**.



3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-6-nitro-2H-chromèn-2-one (10e)

II.5.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI (+), révèle un ion moléculaire à $m/z = 395,09$ (100%) correspondant à $[M+H]^+$, confirmant ainsi la formule brute $C_{19}H_{14}N_4O_6$ du composé **10e**.

II.5.2. Étude par spectroscopie RMN du proton 1H

Le spectre RMN 1H de ce composé ressemble à celui des composés précédents, sauf que la présence du groupement nitro attracteur d'électrons par effet mésomère décale les déplacements chimiques vers les champs faibles (protons déblindés). Dans ce cas le proton aromatique H-7 apparait sous forme de doublet dédoublet à 8,44 ppm, le proton H-6 se manifeste également sous forme de doublet à 7,68 ppm, tandis que le proton aromatique H-5 et H-2'',6'' apparaissent sous forme d'un multiplet de multiplicité trois à 8,95 ppm. Le proton du groupe hydroxyl en position 5' du noyau pyrazoline, apparait à 6,62 ppm. Le **tableau III.11** résume les résultats RMN 1H du composé **10e**.

Tableau III.11 : Résultats de l'analyse RMN ^1H à 400 MHz du composé **10e**

δ (ppm)	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
2,03	s (3H)	-	H-6' (CH ₃)
3,04	d (1H)	18,9	H-4' (CH ₂)
3,46	d (1H)	18,9	H-4' (CH ₂)
6,62	s L (1H)	-	OH-5'
7,68	d (1H)	9,2	Hcoum-6
7,95	m (2H)	-	Hpyr-3'',5''
8,44	dd (1H)	2,53 ; 9,09	Hcoum-7
8,59	s (1H)	-	Hcoum-4
8,95	m (3H)	-	Hpyr-2'',6'', Hcoum-5

II.5.3. Étude par spectroscopie RMN ^{13}C

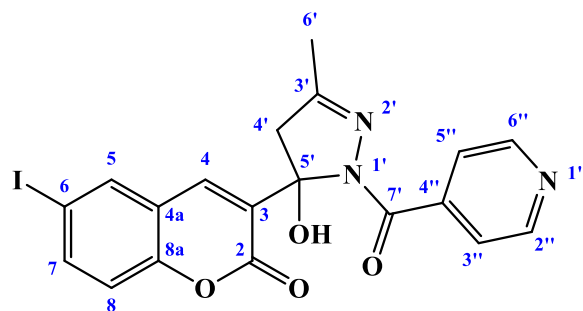
Nous remarquons que tous les pics qui apparaissent sont compatibles avec les carbones du produit **10e**. L'ensemble des résultats obtenus sont représentés dans le **tableau III.12**.

Tableau III.12 : Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 101 MHz du composé **10e**

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
16,22	C-6'	139,07	C-4
51,33	C-4'	144,34	C-4''
89,43	C-5'	144,40	C-6
117,98	C-8	149,72	C-3'
119,77	C-3'',5''	156,94	C-2'',6''
125,32	C-5	158,18	C-8a
125,38	C-7	158,55	C-2
126,98	C-4a	161,81	C-7'
130,18	C-3		

II.6. Caractérisation du composé 3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-6-iodo-2H-chromèn-2-one (10f)

Nous avons travaillé dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites ci-dessus, et la réaction de condensation de la 6-iodo-3-acétoacétylcoumarine **8f** avec l'isoniazide **9** a permis d'obtenir le composé **10f**.



3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-6-iodo-2H-chromèn-2-one (10f)

II.6.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI (+), révèle un ion moléculaire à $m/z = 476,01$ (100%) correspondant à $[M+H]^+$, confirmant ainsi la formule brute $C_{19}H_{14}IN_3O_4$ du composé **10f**.

II.6.2. Étude par spectroscopie RMN du proton 1H

Le spectre RMN 1H de ce composé présente :

- Trois multiplets à 7,88-7,94 ppm, 8,31-834 ppm et à 8,92 ppm. le premier correspond aux trois protons H-5 et H-3'',5''. Le second aux deux protons H-4 et H-7. Le 3ème aux deux protons H-2'',6''.
- Trois doublets à 2,98 ppm, 3,41 ppm et 7,26 ppm attribuables aux protons du groupe méthylène et au proton H-8 respectivement.
- Un pic large à 5,41 ppm correspondant au groupement OH en position C-5' de la pyrazoline.
- A 2,00 ppm apparait un singulet de multiplicité trois qui est décerné aux protons du groupe méthyle CH₃-6'.

Les résultats RMN 1H du composé **10f** sont présentés dans le **tableau III.13**.

Tableau III.13 : Résultats de l'analyse RMN ^1H à 500 MHz du composé **10f**

δ (ppm)	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
2,00	s (3H)	-	H-6' (CH ₃)
2,98	d (1H)	18,9	H-4' (CH ₂)
3,41	d (1H)	18,9	H-4' (CH ₂)
5,41	s L (1H)	-	OH-5'
7,26	d (1H)	8,7	Hcoum-8
7,88-7,94	m (3H)	-	Hpyr-3'',5'' ; Hcoum-5
8,31-8,34	m (2H)	-	Hcoum-4 ; Hcoum-7
8,92	m (2H)	-	Hpyr-2'',6''

II.6.3. Étude par spectroscopie RMN ^{13}C

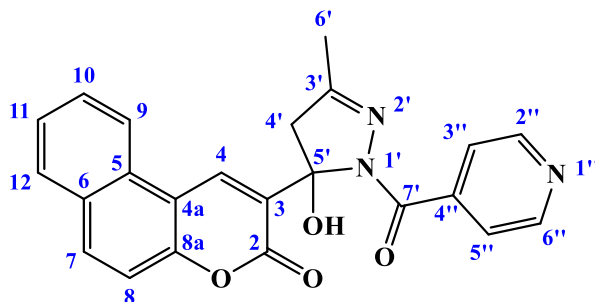
Le nombre de signaux qui apparaissent sur le spectre est en accord avec le nombre de carbone de la molécule. Les pics caractéristiques de la molécule apparaissent à $\delta = 15,76$ ppm (CH₃), à $\delta = 50,96$ ppm (C4') pour le noyau pyrazoline, les pics caractéristique du noyau pyridine apparaissent à 121,14 ppm, 152,53 ppm et 144,24 ppm pour les carbones C-3'',5'', C-2'',6'' et C-4'' respectivement. Les carbones des deux cétones en C-2 et C-7' apparaissent dans les champs faible à $\delta = 158,14$ ppm et $\delta = 161,38$ ppm. Le carbone C-6 portant l'atome d'iode donne un signal à $\delta = 158,14$ ppm. Dans le tableau **III.14** sont reportés les résultats de l'analyse RMN ^{13}C enregistrés pour le composé **10f**.

Tableau III.14 : Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 126 MHz du composé **10f**

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
15,76	C-6'	138,26	C-7
50,96	C-4'	140,00	C-4
88,55	C-5'	144,24	C-4''
89,00	C-6	149,02	C-3'
118,22	C-8	152,53	C-2'',6''
121,14	C-3'',5''	157,93	C-8a
124,75	C-4a	158,14	C-2
128,65	C-3	161,38	C-7'
136,88	C-5		

II.7. Caractérisation du composé 2-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-3H--benzo[f]chromèn-3-one (10g)

Dans les mêmes conditions que les réactions précédentes, l'action de l'isoniazide **9** sur la 3-acétoacétylbenzo[f]coumarine **8g** conduit à la formation d'un seul produit **10g**.

**2-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-3H--benzo[f]chromèn-3-one (10g)****II.7.1. Étude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))**

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI (+), révèle un ion moléculaire à $m/z = 400,13$ (100%) correspondant à $[M+H]^+$, confirmant ainsi la formule brute $C_{23}H_{14}N_3O_4$ du composé **10g**.

II.7.2. Étude par spectroscopie RMN du proton 1H

Le nombre de signaux qui apparaissent sur le spectre RMN 1H du composé **10g** est en accord avec le nombre total de protons de la molécule. Ce composé se caractérise par rapport aux autres composés par la présence du cycle benzène sur le noyau coumarinique dont ses protons résonnent à 7,67 ppm et 7,81 ppm sous forme de triplets pour le H-10 et H-11 respectivement et sous forme de doublet à 8,10 ppm pour le H-12 et à 8,51 pour le H-9. Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau III.15**.

Tableau III.15 : Résultats de l'analyse RMN ^1H à 400 MHz du composé **10g**

δ (ppm)	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
2,06	s (3H)	-	H-6' (CH ₃)
3,11	d (1H)	19,2	H-4' (CH ₂)
3,51	d (1H)	19,2	H-4' (CH ₂)
5,07	s L (1H)	-	OH-5'
7,62	d (1H)	8,8	Hcoum-8
7,67	t (1H)	7,6	Hbenz-10
7,81	t (1H)	7,2	Hbenz-11
8,01	m (2H)	-	Hpyr-3'',5''
8,10	d (1H)	8	Hbenz-12
8,23	d (2H)	8,8	Hcoum-7
8,51	d (1H)	8,4	Hbenz-9
8,99	m (2H)	-	Hpyr-2'',6''
9,11	s (1H)	-	Hcoum-4

II.7.3. Étude par spectroscopie RMN ^{13}C

Dans le spectre RMN ^{13}C nous remarquons que tous les pics qui apparaissent sont compatibles avec les carbones du composé **10g**. On remarque la présence des deux pics caractéristique au deux carbonyle (C=O) en position C-7' (δ = 161,73 ppm) et C-2 (159,02 ppm). Nous observons aussi les deux pics caractéristique du groupement méthylène en C-4' et un pic à δ = 16,23 ppm correspondant à CH₃ (C6').

Les signaux qui apparaissent entre 125,54 ppm et 129,08 ppm correspondent aux carbones du noyau benzénique.

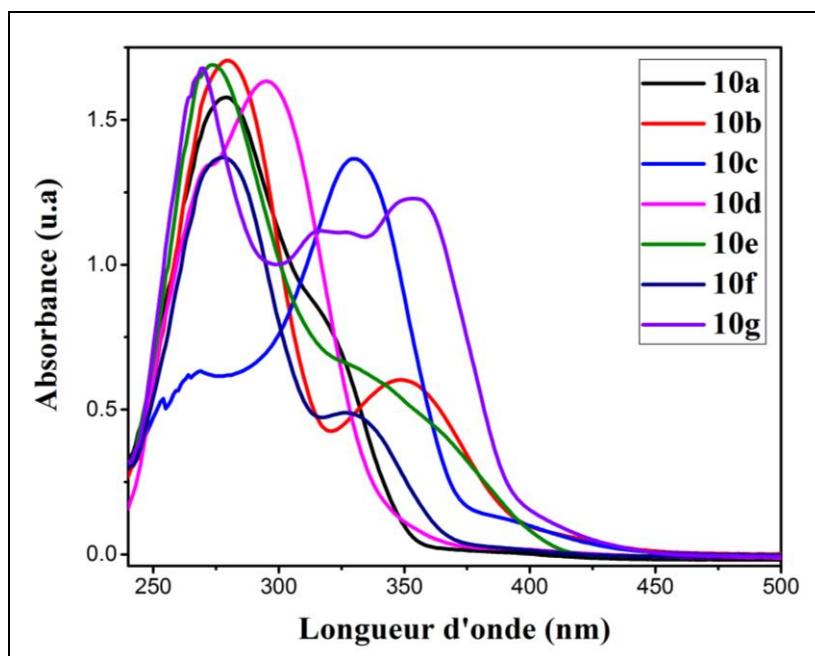
Les résultats enregistrés du spectre RMN ^{13}C confirme sans ambiguïté la formation du composé **10g** et sont résumés dans le tableau **III.16**.

Tableau III.16 : Résultats de l'analyse RMN ^{13}C à 101 MHz du composé **10g**

δ (ppm)	Attribution	δ (ppm)	Attribution
16,23	C-6'	129,50	C-7
51,42	C-4'	130,43	C-5
89,98	C-5'	133,81	C-3
113,11	C-8	135,65	C-4
116,80	C-4a	144,13	C-4''
122,37	C-3'',5''	150,04	C-3
125,54	C-9	153,12	C-2'',6''
126,71	C-11	158,70	C-8a
127,34	C-10	159,02	C-2
129,08	C-12	161,73	C-7'
129,20	C-6		

II.8. Étude par spectroscopie UV-visible des produits **10a-g**

Les spectres d'absorption UV-Visible des composés **10a-g** sont réalisés à une concentration de 10^{-5} M dans du DMSO. Tous les composés présentent deux bandes d'absorption qui sont attribuées à la transition $\pi-\pi^*$ des squelettes conjugués (**Figure III.3**).

**Figure III.3** : Spectres d'absorption UV-visible des composés **10a-g** dans le DMSO.

Les longueurs d'onde maximales d'absorption ($\lambda_{\text{max abs}}$) ont été observées dans les intervalles 268-280 nm, 290-330 nm et 350-400 nm (**Tableau III.17**). Les spectres d'absorption des produits obtenus ont montré que les formes spectrales sont très similaires, car tous ces composés possèdent le même noyau central. La différence des valeurs de longueur d'onde et d'intensité d'absorption est due à l'effet de la présence ou de l'absence et de la position du groupe substituant sur le cycle coumarine.

Tableau III.17 : Caractéristiques spectroscopiques UV-visible des composés **10a-g** dans le DMSO

Composé	λ abs (nm)	Composé	λ abs (nm)
10a	279 π - π^* 319 π - π^*	10e	273 π - π^* 330 π - π^*
10b	280 π - π^* 348 π - π^*	10f	278 π - π^* 327 π - π^*
10c	268 π - π^* 330 π - π^*	10g	269 π - π^* 315 π - π^* 354 π - π^*
10d	271 π - π^* 295 π - π^*		

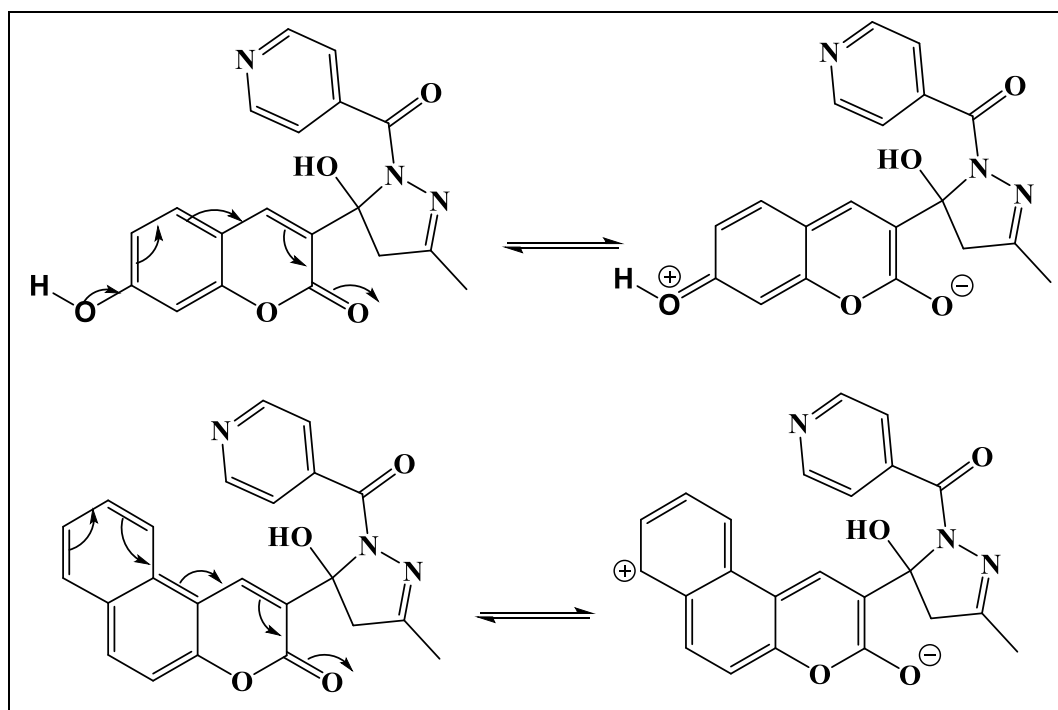


Figure III.4 : Structures de résonance possibles des composés **10c** et **10g**

Les résultats indiquent que la présence et la position du groupe hydroxyle sur le cycle coumarine influence les longueurs d'ondes d'absorption. Les composés **10b** et **10c** avec le substituant hydroxyle en position 6 et 7 respectivement sur le cycle benzo présentent les longueurs d'onde les plus élevées en raison d'un nuage électronique étendu (**Figure III.4**). Cette observation est trouvée dans le cas du composé **10g** présentant un deuxième noyau benzénique qui lui confère une hyper-conjugaison des liaisons π .

III. Mécanisme et interprétation théorique proposés pour la synthèse des composés 10a-g

En général, la synthèse classique des pyrazoles implique une réaction de cyclocondensation entre une hydrazine appropriée et un dérivé 1,3-dicarbonylé ou une cétone α,β -insaturée. Le mécanisme de la réaction implique d'abord la formation d'une imine suivie d'une cyclisation déshydratante pour former la pyrazole [24,26]. Cependant, les résultats obtenus ont montré qu'en utilisant les dérivés de 3-acétoacétylecoumarine **8a-g** comme réactif 1,3-dicétone et l'isoniazide **9** comme réactif bi-nucléophile, l'élimination de la molécule d'eau en position C-5' n'a pas eu lieu (**Schéma III.5**) et la déshydratation s'est produite uniquement en position C-3'. Ce résultat peut être expliqué par la formation d'une liaison hydrogène entre l'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle en C-5' et l'oxygène du carbonyle en position 2 de la coumarine, ce qui stabilise cette dernière et empêche l'élimination de la molécule d'eau et l'aromatisation du cycle pyrazole. De nombreuses études ont montré que la présence de groupes attracteurs d'électrons sur le dihydropyrazole en C-5', C-3' ou N-1' inhibe le processus de déshydratation en position C-5 [24,33,34].

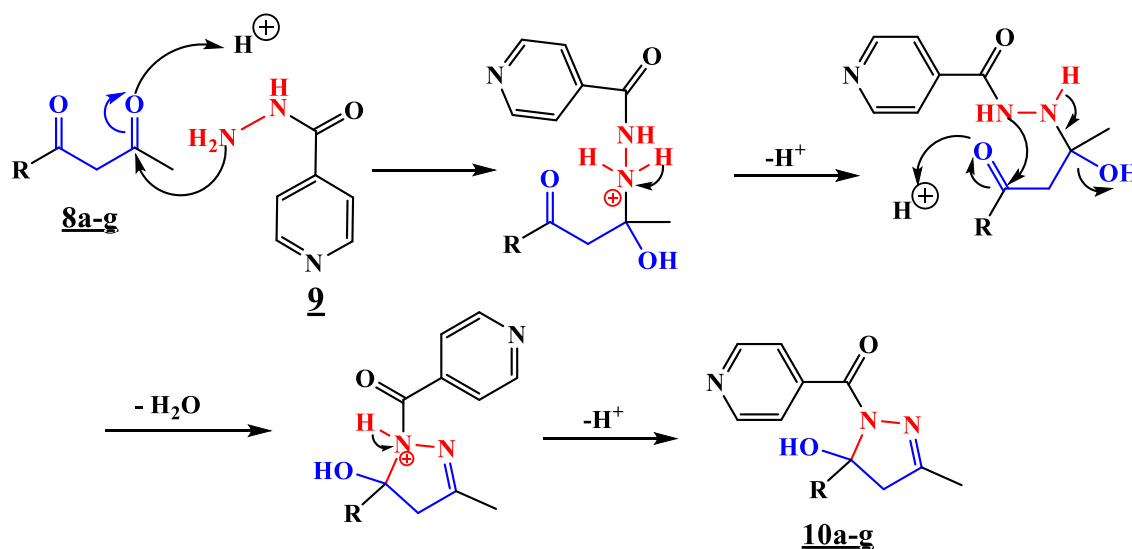


Schéma III.5 : Mécanisme concevable pour la synthèse de la 3-(5-méthyl-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one substituée **10a-g**

Afin de vérifier cette hypothèse, des calculs théoriques ont été effectués pour étudier la stabilité des composés obtenus. Toutes les structures moléculaires ont été optimisées géométriquement au niveau Becke-théorique, trois paramètres, Lee-Yang-Parr (B3LYP) en utilisant le jeu de base 6-311G** [35,36]. Le calcul des valeurs d'enthalpie des deux structures supposées **10a₁** et **10a₂** (Figure III.5) montre que **10a₁** présente la valeur d'enthalpie la plus basse, ce qui confirme sa stabilité et sa formation à la fin de la réaction.

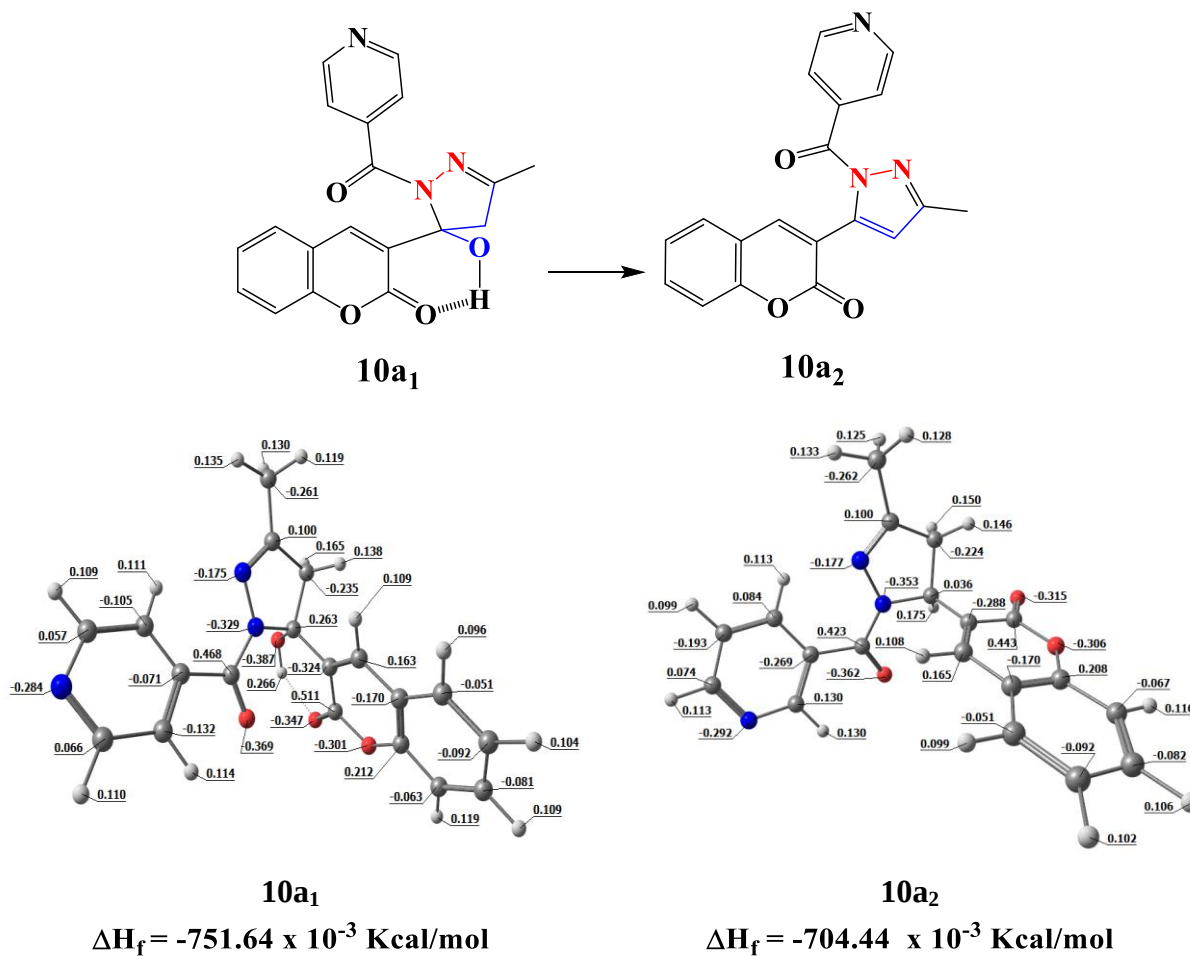


Figure III.5 : Calculs des enthalpies des structures **10a₁**, **10a₂** et liaison hydrogène dans la structure **10a₁**

Chapitre 2

*Évaluation de l'activité antioxydante et antifongique in-vitro des
dérivés d'isonicotinoylpyrazolylcoumarine et étude du Docking
moléculaire*

Les dérivés coumarines, pyrazolique et pyridinique présentent diverses propriétés biologiques. Par conséquent leurs dérivés correspondant présentent des propriétés pharmacologiques et thérapeutiques importantes.

Le traitement des infections fongiques reste difficile d'une part du fait du nombre limité de principes réellement efficaces et de leur coût très élevé et d'autre part lié à l'émergence de souches résistantes à certains traitements usuels. Ces différentes difficultés ont suscité notre intérêt pour la recherche d'autres substances fongicides pouvant être une solution alternative aux médicaments actuel. Ainsi, nous avons évalué les composés synthétisés pour leurs activités antifongiques et antioxydantes. L'étude de docking pour l'activité antifongique des conjugués coumarine-pyrazoline synthétisés **10a-g** a été réalisée pour révéler le mode de liaison avec la protéine cible.

I. Évaluation de l'activité antioxydante des dérivés d'isonicotinoylpyrazolylcoumarine 10a-g

Les radicaux libres en excès dans le corps humain peuvent interagir avec de nombreuses substances telles que les acides gras, les protéines, l'ADN pour capturer leurs atomes d'hydrogène, causant des dommages à la structure et à la fonction des cellules concernées, ce qui entraîne diverses maladies. Il existe plusieurs rapports sur l'activité antioxydante des coumarines qui ont montré que la présence d'un hydroxyle sur le cycle benzénique est le principal site actif de piégeage des radicaux libres [37].

L'activité antioxydante des composés synthétisés **10a-g** a été évaluée en utilisant les essais de piégeage des radicaux libres du DPPH[•]. Les résultats obtenus ont montré que tous les composés présentent une activité anti-radicalaire (**Figure III.6**).

La **figure III.6** montre la variation de l'absorbance en fonction de la concentration des différents composés en comparaison avec l'acide ascorbique (AA) comme traitement témoin. Les valeurs CI_{50} ont été déterminées pour tous les composés et présentées dans la **figure III.7**.

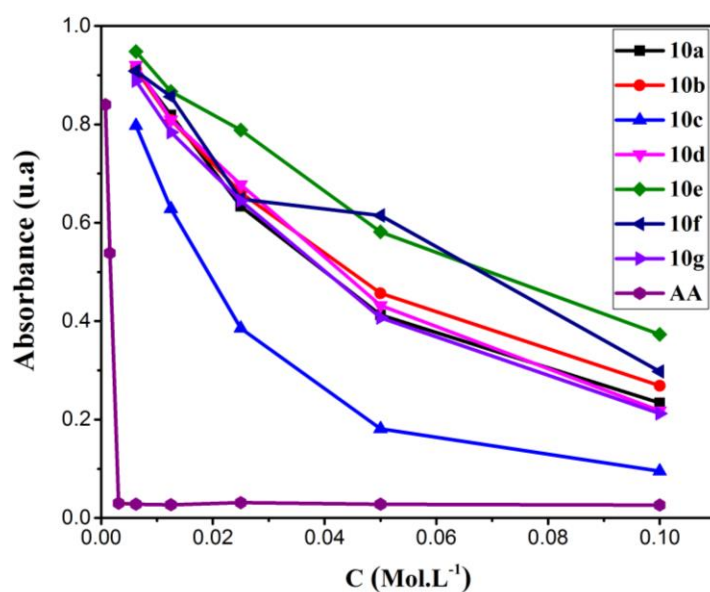


Figure III.6 : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration des différents composés **10a-g** et AA

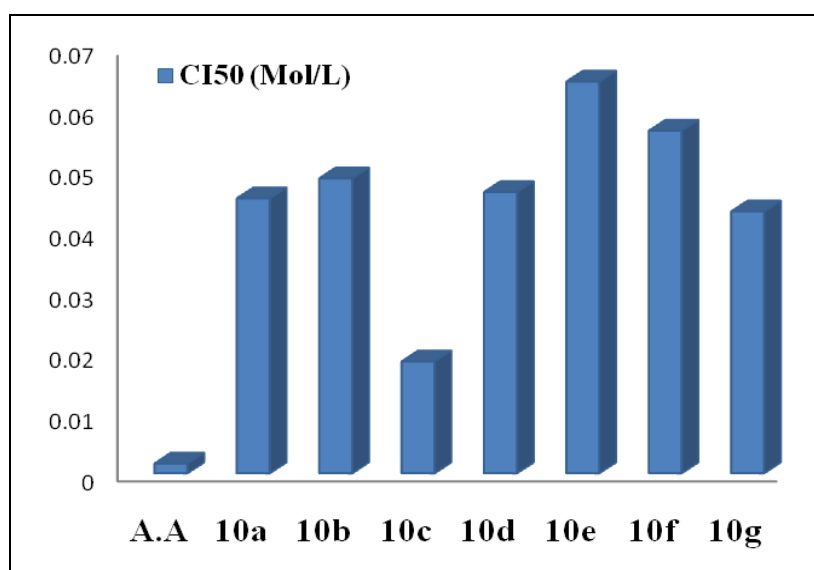


Figure III.7 : Valeurs CI_{50} (mol/L) de l'activité antioxydante pour les composés **10a-g** et le standard AA

Tous les composés ont une activité modérée à bonne. Le produit **10c** est le plus actif de cette série ($CI_{50} = 0,0184$ M), suivi des composés **10g** et **10a** ($CI_{50} = 0,0430$ M et $0,0452$ M respectivement). Les résultats montrent que la position et le nombre de groupes hydroxyle ont un effet significatif sur l'activité antioxydante. La meilleure inhibition a été observée lorsque le groupe OH est en position méta (**10c**) ($CI_{50} = 0,0184$ M) suivi du composé (**10d**) ($CI_{50} = 0,0462$ M) (position ortho) puis **10b** ($CI_{50} = 0,0485$ M) (position para). La substitution des groupes hydroxyle dans la partie coumarine par les groupes nitro (NO_2) et halogène (I)

diminue l'activité. A l'inverse la présence d'un deuxième noyau benzénique augmente l'activité dans le cas du composé **10g** par rapport aux autres composés à l'exception du composé **10c**. Cela montre que l'activité antioxydante est due à la présence du groupement hydroxyl en position 5' du noyau pyrazoline qui est stabilisé par l'hyper-conjugaison.

II. Évaluation de l'activité antifongique des composés 10a-g

Dans cette partie l'activité antifongique de la série nouvellement synthétisés **10a-g** a été évaluée pour son activité antifongique *in-vitro* contre deux souches, à savoir *Candida Albicans* et *Aspergillus niger*, en utilisant la technique de diffusion sur disque et le kétoconazole a été utilisé comme agent antifongique standard. Les résultats de l'activité antifongique *in-vitro* des composés testés sont résumés dans le **tableau III.18** et les photographies représentatives des méthodes de diffusion sur disque sont illustrées dans la **figure III.8**.

Tableau III.18 : Activité antifongique *in-vitro* et diamètre (mm) de la zone d'inhibition des dérivés de 3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one contre les souches sélectionnées.

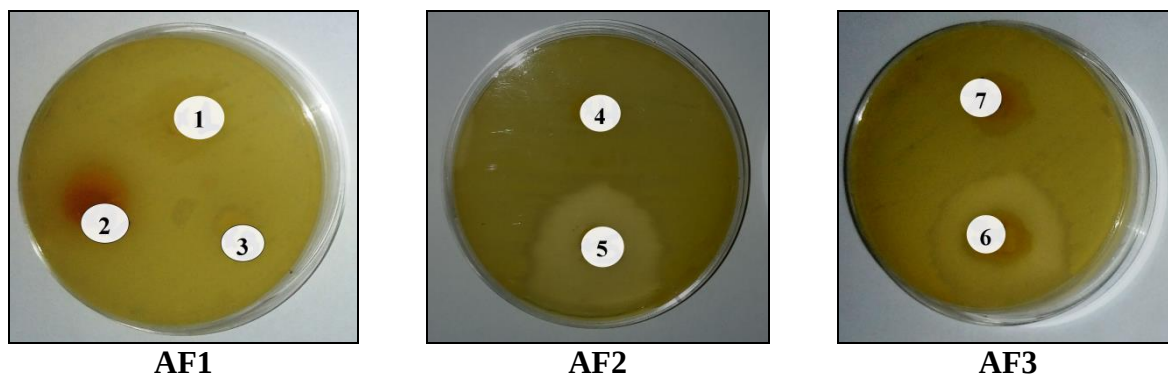
Composé testé	Diamètre de la zone d'inhibition des produits synthétisés (mm)	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
10a	-	-
10b	-	-
10c	-	-
10d	27	-
10e	26	18
10f	-	-
10g	-	-
Ketoconazole	22	22

Les activités antifongiques des coumarines ont confirmé que de nombreuses coumarines synthétisées inhibent la croissance de plusieurs souches microbiennes. Le groupe 8-OH libre s'est avéré important pour l'activité antifongique, par contre la capacité antifongique était considérablement réduite lorsque le groupe hydroxyle en position C-6. Cependant, le groupe hydroxyle libre en position C-8 dans le noyau de la coumarine est important pour l'activité antibactérienne [38].

Les résultats montrent que *Candida albicans* présente une résistance à tous les composés, à l'exception des composés **10d** (OH-C8) (27 mm) et **10e** (NO₂-C6) (26 mm) (**AF2**

et **AF3** respectivement, **Figure III.8**) qui sont plus actifs que le kétoconazole (22 mm). Tous les composés étaient inactifs contre *Aspergillus niger* sauf le composé **10e** (18 mm) qui a montré une bonne activité par rapport au standard (**AF5**, **Figure III.8**). Cette étude montre que le groupe hydroxyle libre en C-8 est nécessaire pour l'activité antifongique. Le groupe hydroxyle libre en position C-8 ou NO₂ en position C-6 confère à la coumarine une activité antimicrobienne à large spectre.

Candida albicans



Aspergillus niger

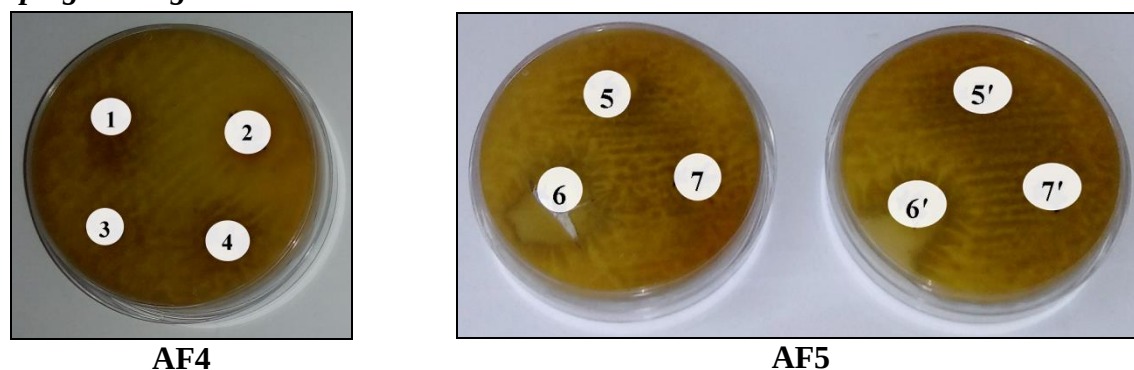


Figure III.8 : Activités antifongiques par zone d'inhibition dans des boîtes de Pétri des dérivés **10a-g** (**AF1** à **AF5**).

(1) : **10c** ; (2) : **10g** ; (3) : **10b** ; (4) : **10a** ; (5) : **10d** ; (6) : **10e** ; (7) : **10f**

Sur la base de ces résultats, la concentration minimale inhibitrice (CMI) nécessaire pour inhiber la croissance fongique a été déterminée et représentée dans le **tableau III.19** et les **Figures III.9 et III.10**. En comparant leurs valeurs de CMI, la souche *Aspergillus niger* a montré une faible résistance au composé **10e** par rapport à la souche *Candida albicans* (CMI= 15,625 µg/mL et 31,25 µg/mL respectivement). L'activité antifongique du composé **10e** (CMI= 31,25 µg/mL) à l'égard de *Candida albicans*, était meilleure que celle du composé **10d** (CMI= 250 µg/mL).

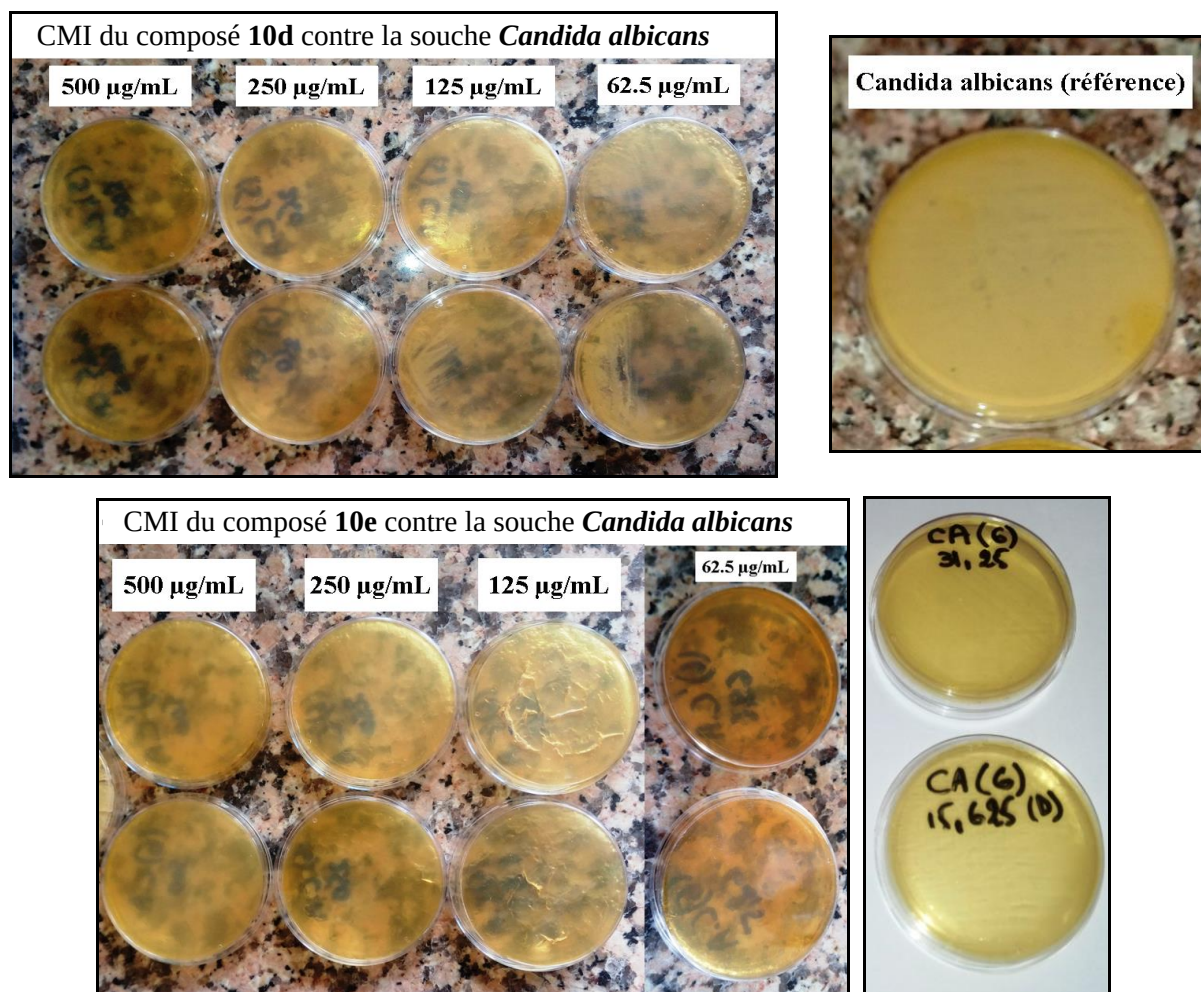


Figure III.9: Photographies des résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des composés **10d** et **10e** contre la souche *Candida albicans*.

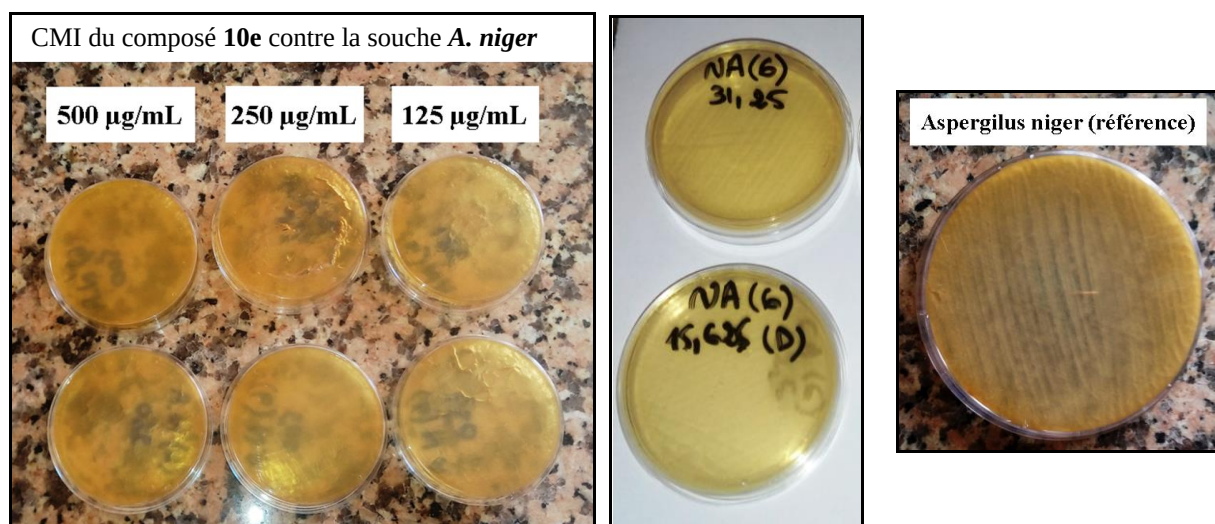


Figure III.10 : Photographies des résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du composé **10e** contre la souche *Aspergillus niger*.

Tableau III.19 : Concentration minimale inhibitrice (CMI en $\mu\text{g/mL}$)

Composés testés	Concentration minimale inhibitrice (CMI) en $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	Activité antifongique	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
10d	250	-
10e	31.25	15.625
Ketoconazole	6.25	6.25

III. Études computationnelles

III.1. Étude DFT

Dans la présente étude, des calculs théoriques au moyen de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) ont été effectués pour déterminer les propriétés électroniques des composés synthétisés. La **figure III.11** montre la distribution des orbitales moléculaires frontières (HOMO et LUMO). Les niveaux d'énergie des orbitales moléculaires frontières donnent des informations sur les transitions électroniques possibles. L'analyse des résultats rapportés dans cette figure montre que l'orbitale HOMO est localisée, dans le cas des composés **10a** et **10e**, sur la fraction 4,5-Dihydro-1*H*-pyrazole et le groupe carbonyle alors que dans les autres composés (**10b**, **10c**, **10d**, **10f**, **10g**) elle est localisée sur la fraction 2*H*-chromèn-3-yl. D'autre part, l'orbitale LUMO est principalement située sur la partie 2*H*-chromène-3-yle pour tous les composés sauf le composé **10g** où cette orbitale est localisée sur le cycle pyridine et le groupe carbonyle. En outre, la comparaison entre les valeurs calculées des énergies de la HOMO indique que **10d**, **10b** et **10g** sont les composés les plus réactifs et **10f** le moins réactif. Il convient de mentionner qu'une énergie HOMO plus élevée est un indicateur de la capacité donneur d'électrons et d'une activité antioxydante plus élevée [39,40]. Le **tableau III.20** rapporte les descripteurs de réactivité globale calculés pour nos nouveaux composés synthétisés.

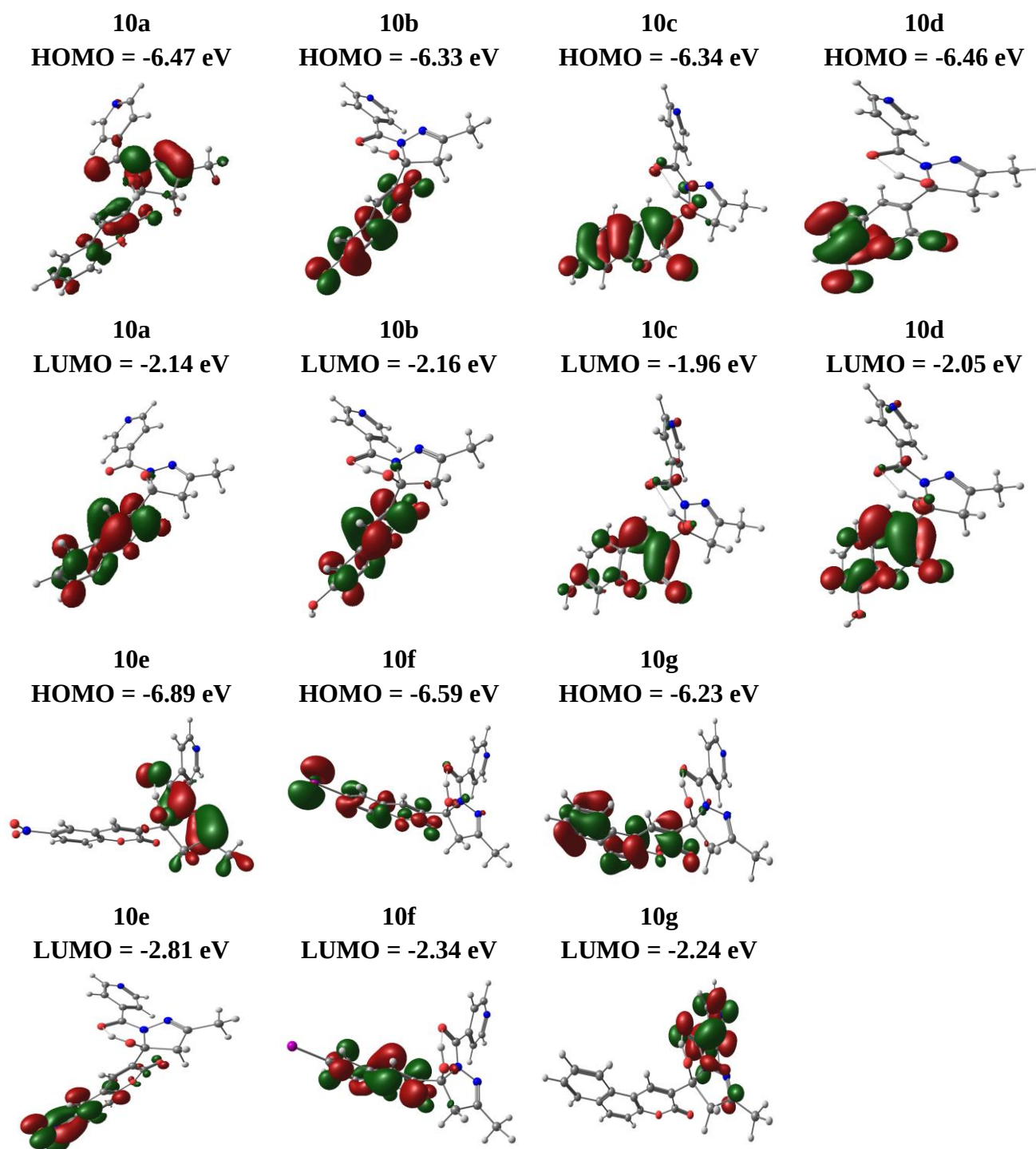


Figure III.11 : Énergies et représentations des orbitales HOMO et LUMO pour l'isonicotinoylpyrazolylcoumarine

Tableau III.20 : Descripteurs de réactivité globale de l'isonicotinoylpyrazolylcoumarine synthétisée, énergies d'ionisation (E_i), affinité électronique (A_e), potentiel chimique (μ), électrophilicité (ω), mollesse (S) et dureté chimique (η).

N°	E_i (eV)	$ A_e $ (eV)	μ (eV)	η (eV)	S (eV)	ω (eV)
10a	7,89	0,82	-3,54	4,35	2,18	1,44
10b	7,76	0,68	-3,54	4,22	2,11	1,48
10c	7,40	0,49	-3,46	3,95	1,97	1,51
10d	8,00	0,71	-3,65	4,35	2,18	1,53
10e	8,16	1,36	-3,40	4,76	2,38	1,21
10f	7,89	0,82	-3,54	4,35	2,18	1,44
10g	7,62	0,82	-3,40	4,22	2,11	1,37

L'analyse des résultats montre que le composé **10c** présente l'énergie d'ionisation la plus faible (E_i) suivi par **10b** et **10g**. Ceci peut être expliqué par la capacité donneur d'électrons et les activités antioxydantes les plus élevées de ces composés. Ces résultats sont en parfait accord avec notre évaluation *in-vitro*. Les valeurs calculées de la dureté chimique (η) et de la mollesse (S) pour le composé **10c** sont inférieures à celles calculées pour les autres composés, suivies par celles calculées pour les composés **10g** et **10b**. Cela signifie que le processus de transfert de charge est plus important dans ces composés où les activités biologiques sont élevées. D'autre part, l'affinité électronique (A_e) et l'énergie d'ionisation calculée pour le composé **10e** sont plus élevées que celles des autres composés, ce qui révèle que ce composé est le meilleur accepteur d'électrons. L'analyse des valeurs calculées de l'électrophilicité (ω), montre que les composés **10d** et **10c** sont plus électrophiles par rapport aux autres molécules étudiées, montrant que ces deux composés seraient plus sensibles aux attaques nucléophiles. Notons que, l'indice d'électrophilie mesure la stabilisation de l'énergie lorsque le système acquiert une charge électronique supplémentaire de l'environnement. D'autre part, le composé **10e** a un indice d'électrophilie plus faible ce qui signifie que ce composé est moins toxique que les autres composés [41]. Ce résultat est probablement responsable de la bonne activité antifongique obtenue par l'évaluation *in-vitro* de ce composé.

III.2. Docking moléculaire

Une étude de docking moléculaire a été réalisée pour évaluer l'interaction de liaison des composés synthétisés au niveau du site actif de la protéine fongique afin de corrélérer nos résultats expérimentaux *in-vitro*. Les détails des sites d'interaction, des résidus impliqués et des types de liaison et des parties interagissant avec le ligand entre la protéine fongique *Aspergillus niger* (Phytase A) et le composé **10e** (énantiomère **R** et **S**) et le kétoconazole sont donnés dans la **Figure III.12**.

La comparaison du mode de liaison des composés synthétisés avec la structure X de la NDP montre que le mode de liaison des composés étudiés est effectivement le plus proche de celui observé dans le complexe cristallographique [42]. Comme indiqué dans la section sur l'activité antifongique, le composé **10e** s'est avéré être le composé le plus actif contre la protéine fongique *Aspergillus niger*. Ainsi, des études de docking moléculaire ont été menées pour étudier l'interaction possible de ce composé avec la protéine fongique d'*Aspergillus niger*. Comme le composé **10e** est chiral, ses deux énantiomères (**R** et **S**) ont été utilisés. Les résultats sont comparés à la conformation dockée du médicament standard utilisé comme référence dans cette étude. L'analyse des résultats a montré que les deux énantiomères **R** et **S** du composé **10e** sont capables de s'insérer dans la poche de liaison de la protéine fongique avec des énergies de liaison élevées -10,88 kcal/mol et -10,11 kcal/mol, respectivement (**Tableau III.21**). Il a été signalé que les résidus clés sont Tyr28, Arg62, Lys277, His338, Asp339 [43]. Les composés que nous avons synthétisés montrent une bonne adaptation dans le site actif. Ainsi, l'énantiomère **R** était lié au site actif catalytique par cinq liaisons hydrogène, des interactions π -cation et van der Waals avec les acides aminés du site actif de la protéine étudiée.

L'hydroxyle de la partie chromène établit deux interactions de type liaison hydrogène avec les résidus Asp339 et His338. L'atome d'oxygène de la fraction chromène est impliqué dans une liaison hydrogène avec Arg62. De même, le groupe nitro du cycle chromène établit une interaction de type liaison hydrogène avec Lys278 et Lys277. De plus, le groupe amino de Lys278 est situé à une distance de 3,66 Å et 4,45 Å du cycle phényle et du dihydropyranne de la partie chromène, ce qui entraîne une interaction attractive et non covalente entre les cations, qui peut stabiliser le ligand dans le site actif de la protéine étudiée. Au lieu de cela, l'azote de la pyridine était situé à une distance de 3,25 Å du groupe carboxylate de l'Asp103, ce qui a conduit à une possible interaction de type pont salin.

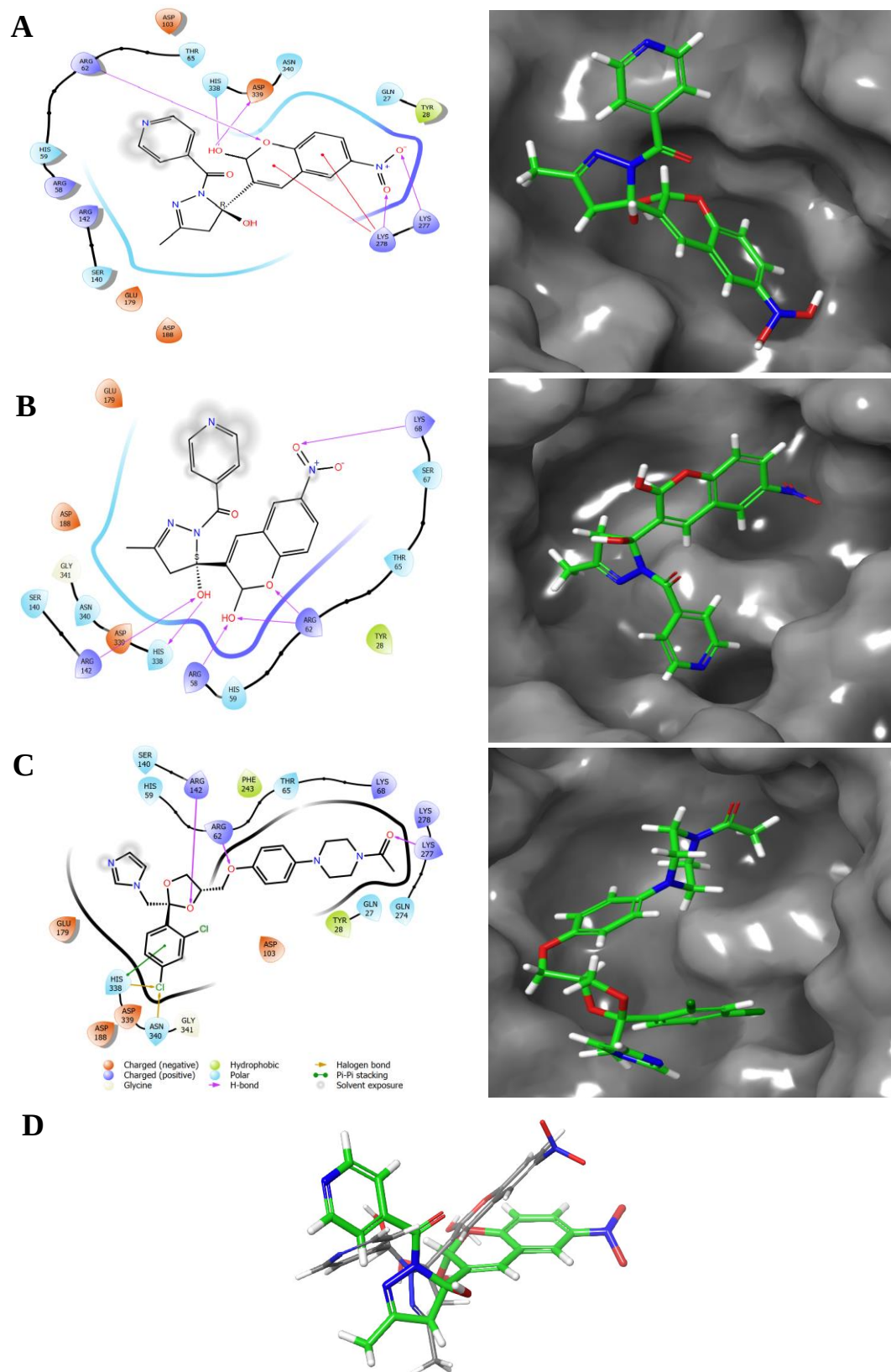


Figure III.12 : Vues 2D et 3D de la conformation d'arrimage de **A- 10e (S)**, **B- 10e (R)** et **C- kétoconazole** avec une protéine fongique, **(D)** superposition des conformations d'arrimage des énantiomères **(R)** (bâton vert) et **(S)** (bâton gris).

En outre, d'autres interactions ont été observées entre le composé ancré et la phytase A, telles que les interactions polaires (His59, Thr65, His339, Asn340, Gln27, Ser140), les interactions chargées positivement et négativement (Asp188, Glu179, Asp339, Asp103, Arg62, Arg58, Arg142, Lys278, Lys277) et hydrophobes (Tyr28). L'énergie de liaison de l'énantiomère (**S**) du composé **10e** a été calculée à -10,11 kcal/mol. Le remplacement de **R** par l'énantiomère **S** subit une petite rotation du plan pyrazole (40°) lors de la liaison avec les résidus du site actif de la protéine étudiée (**Figure III.12**). De plus, les résultats du docking expliquent la raison de la bonne activité biologique du composé **10e** par la formation d'interactions H-Bond supplémentaires avec la protéine Phytase A. Ainsi, les principales interactions entre l'énantiomère (**S**) du **10e** et les acides aminés du site actif de la protéine étudiée sont des liaisons hydrogène (cinq liaisons H). Ainsi, les atomes d'oxygène du groupe nitro de l'énantiomère (**S**) du composé **10e** présentent une liaison hydrogène avec le groupe carbonyle du squelette du résidu Lys68.

Deux autres liaisons hydrogène sont observées entre le groupe hydroxyle du 3-méthyl-dihydro-pyrazole et le site actif de la protéine, l'une avec l'imidazole de His338 et la seconde avec le guanidinium de Arg142. Le groupe hydroxyle du fragment 2*H*-chromène-3-yle a la capacité de former deux liaisons hydrogène avec le squelette carbonyle de Arg62 et le guanidinium de Arg58. En outre, l'atome d'oxygène du groupement 2-hydroxy-2*H*-chromène-3-yle était lié par une liaison hydrogène au groupement guanidinium du résidu Arg62. En revanche, aucun empilement π - π attractif et non covalent n'a été observé entre ce composé et la protéine phytase A.

L'azote de la pyridine était situé à une distance de 4,18 Å du groupe carboxylate de Glu179, ce qui a conduit à une possible interaction de type pont salin. De plus, d'autres interactions sont observées telles que des interactions polaires (Ser140, His59, Thr65, Gln274, Gln27, His338, Asn340), chargées positivement et négativement (Glu179, Asp188, Asp339, Arg142, Arg58, Arg62, Lys68) et hydrophobes (Tyr28). Toutes ces différences dans le mode de liaison entre les énantiomères (**S**) et (**R**) suggèrent que l'état lié à la (**S**)-isonicotinoylpyrazolylcoumarine du complexe isonicotinoylpyrazolylcoumarine-Phytase A est plus stable que l'état lié à la (**R**)-isonicotinoylpyrazolylcoumarine.

Tableau III.21 : Interactions des liaisons hydrogène, résidus en interaction et énergies de liaison ($\Delta E_{\text{Binding}}$), calculées pour le composé synthétisé **10e** et le standard avec la protéine Phytase A

Composé	Liaison-H Liaison-Halogène	Résidus d'interaction (< 4 Å)	$\Delta E_{\text{Binding}}$ (kcal/mol)
10e (R)		π-cation : Lys278	
	Lys277 (d = 2.71 Å) Lys278 (d = 3.10 Å) Arg62 (d = 1.99 Å) Asp339 (d = 2.01 Å) His338 (d = 1.96 Å) Tyr28 (d = 2.11 Å)	Chargés (positifs et négatifs) : Asp188, Glu179, Asp339, Asp103, Arg62, Arg58, Arg142, Lys278, Lys277 Polaire: His59, Thr65, His339, Asn340, Gln27, Ser140,	-10.81
		Hydrophobes: Tyr28	
10e (S)		Chargés (positifs et négatifs) : Glu179, Asp188, Asp339, Arg142, Arg58, Arg62, Lys68	
	Lys68 (d = 1.90 Å) Arg62 (d = 3.1 Å and d = 2.1 Å) Arg58 (d = 2.2 Å) Arg142 (d = 2.3 Å)	Polaire: Ser140, Asn340, His338, His59, Thr65, Ser67	-10.11
		Hydrophobes: Tyr28	
Ketoconazole		π-π Empilé : His338	
	Liaison-H: Arg142 (d = 2.9 Å) Arg62 (d = 3.1 Å) Lys277 (d = 2.7 Å)	Chargé (positif et négatif) : Arg142, Arg62, Lys68, Lys278, Lys277, Asp103, Asp339, Asp188, Glu179,	-4.71
	Liaison-Halogène: His338 (d = 2.3 Å) Asn340 (d = 2.5 Å)	Polaire: Ser140, His59, Thr65, Gln274, Gln27, His338, Asn340	
		Hydrophobes: Tyr28, Phe243	

D'autre part, la comparaison entre les conformations ancrées des énantiomères (**R**) et (**S**) du composé **10e** avec celle du médicament standard, le kétoconazole, montre que l'empilement π - π attractif et non covalent observé entre le médicament standard et le résidu His338 a été converti en liaison hydrogène dans la conformation ancrée de l'énantiomère (**R**) du composé **10e**. En outre, les interactions de liaison H observées dans la conformation dockée du standard avec les résidus et Arg62 ont été conservées dans la conformation dockée des deux énantiomères du composé **10e**. Les interactions de liaison hydrogène avec les résidus Lys277, Arg142 étaient conservées dans les deux énantiomères. Ainsi, les analyses de

docking ont montré que notre isonicotinoylpyrazolylcoumarine peut agir comme agent antifongique prometteur.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons décrit une stratégie simple et efficace pour la synthèse d'une nouvelle série d'isonicotinoylpyrazolylcoumarine avec de bon rendement dans des conditions modérées. Nous avons démontré que les composés ont une bonne activité antifongique vis-à-vis des souches testées et ont présenté une bonne activité antioxydante. Les résultats de docking moléculaire ont montré que le composé **10e** peut agir comme agent antifongique prometteur de manière très intéressante.

Partie expérimentale

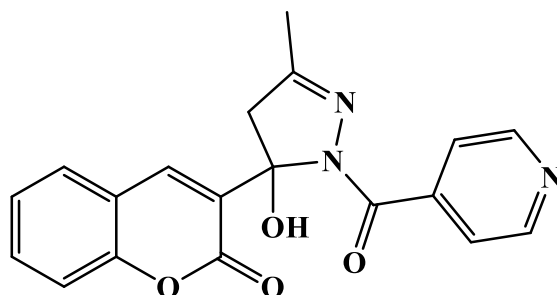
I. Réactifs et appareillages

Les réactifs chimiques (produits Aldrich) ont été utilisés sans autre purification. Les points de fusion ont été déterminés sur un appareil Stuart scientifique SPM3 équipé d'un microscope et ne sont pas corrigés. Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés dans des solutions de DMSO- d_6 sur le spectromètre Bruker Ascend 400 (400 MHz pour ^1H et 101 MHz pour ^{13}C) ou sur le spectromètre Bruker Avance Neo 500 (500,28 MHz pour ^1H et 125,8 MHz pour ^{13}C). Les déplacements chimiques sont rapportés en parties par million (δ , ppm) et les constantes de couplage (J) sont données en hertz (Hz). Ils ont été enregistrés par rapport au signal du solvant. Les spectres de masse sont obtenus avec ESI. Les spectres de masse ESI à ions positifs ont été acquis à l'aide d'un instrument Q-TOF 2 [dilution de 1 mL de la solution de chloroforme de l'échantillon (10^{-5} M) dans 200 μL de solution d'acide trifluoroacétique/méthanol à 0,1 %. De l'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation et de l'argon comme gaz de collision. La tension de l'aiguille était réglée à 3000V, avec la source d'ions à 80 °C et la température de désolvatation à 150 °C. La tension du cône était de 35V]. Les spectres UV-visible ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Thermo scientific-Evolution 220 ; les mesures ont été effectuées de 200 à 800 nm. L'évolution de ces actions a été suivie tout au long par des plaques TLC (gel de silice G) en utilisant la phase mobile, chloroforme : méthanol (5:1), et les taches ont été identifiées par les vapeurs d'iode ou la lumière UV.

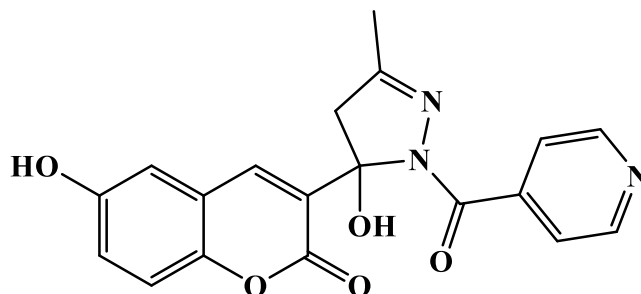
II. Procédure pour la synthèse des dérivés de 3-(Isonicotinoyl-5-méthyl-1H-pyrazol-3-yl)-2H-chromèn-2-ones (10a-g).

Dans un ballon à fond plat de 250 mL, sous agitation, on a agité à température ambiante pendant un temps approprié 1 mmol des dérivés appropriés de 3-acétoacétylcoumarine **8a-g** dissous dans 10 mL de chloroforme, 1 mmol d'isoniazide **9** dissous dans 5 mL d'éthanol et 16 gouttes d'acide chlorhydrique. Après achèvement de la réaction, comme indiqué par la chromatographie sur couche mince (CCM), en utilisant un mélange 5:1 de CHCl_3 /méthanol comme éluant, le solide a été séparé par filtration et lavé avec du chloroforme froid et de l'éthanol, puis séché à l'air libre.

III. Résultats spectroscopiques

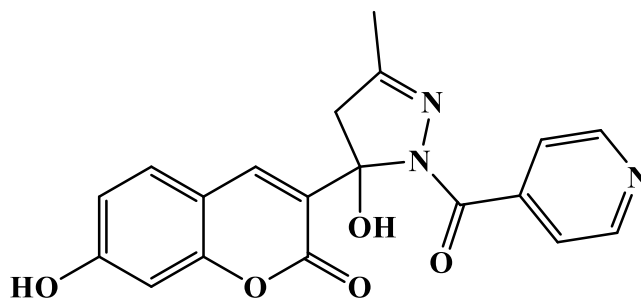
3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (10a)

Poudre blanche, Rdt: 75 %; Pf 209-212 °C; RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 2,02 (s, 3H, CH_3), 3,04 (d, $J=18,8$ Hz, 1H, CH_2), 3,43 (d, $J=18,8$ Hz, 1H, CH_2), 7,42 (m, 2H, H_{coum}), 7,65 (t, $J=8,4$ Hz, 1H, H_{coum}), 7,91 (d, $J=7,6$ Hz, 1H, H_{coum}), 7,97 (m, 2H, H_{pyr}), 8,39 (s, 1H, H_{coum}), 8,97 (m, 2H, H_{pyr}); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ (ppm) 16,22, 51,47, 89,61, 116,36, 119,30, 125,25, 125,45, 128,10, 129,43, 132,43, 140,08, 144,17, 150,04, 153,40, 158,47, 159,09, 161,68; MS (ESI $^+$): m/z (%)=350 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6-hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (10b)

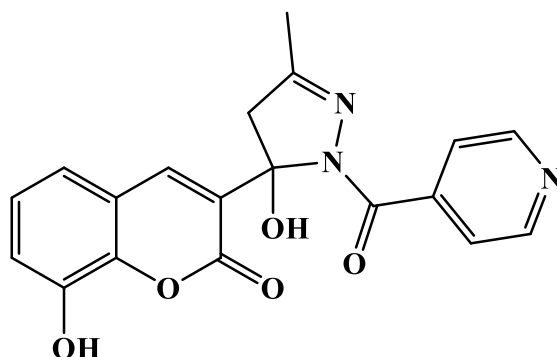
Poudre blanche ; Rdt: 77 % ; Pf 219-222 °C ; RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 1,99 (s, 3H, CH_3), 2,97 (d, $J=18,9$ Hz, 1H, CH_2), 3,38 (d, $J=18,9$ Hz, 1H, CH_2), 7,09 (dd, $J=2,8$ Hz, $J=8,9$ Hz, 1H, H_{coum}), 7,19 (d, $J=2,8$ Hz, 1H, H_{coum}), 7,26 (d, $J=8,9$ Hz, 1H, H_{coum}), 7,73 (L, 1H, OH-5'), 7,94 (m, 2H, H_{pyr}), 8,25 (s, 1H, H_{coum}), 8,94 (m, 2H, H_{pyr}), 9,81 (L, 1H, OH $_{\text{coum}}$); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ (ppm) 15,76, 51,09, 89,20, 112,88, 116,74, 119,35, 120,00, 124,96, 127,55, 139,56, 146,28, 147,79, 149,62, 154,10, 157,97, 158,86, 161,18 ; MS (ESI $^+$): m/z (%)= 366 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (10c)



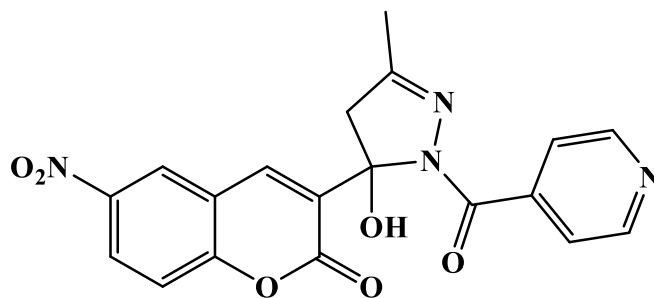
Poudre jaune ; Rdt: 74 % ; Pf 199-206 °C ; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 1,99 (s, 3H, CH_3), 2,96 (d, $J=18,8$ Hz, 1H, CH_2), 3,36 (d, $J=18,8$ Hz, 1H, CH_2), 5,18 (L, 1H, OH-5'), 6,79 (m, 1H, H_{coum}), 6,87 (dd, $J=2,0$ Hz, $J=8,5$ Hz, 1H, H_{coum}), 7,69 (d, $J=8,5$ Hz, 1H, H_{coum}), 7,94 (m, 2H, H_{pyr}), 8,24 (s, 1H, H_{coum}), 8,94 (m, 2H, H_{pyr}), 10,78 (L, 1H, OH $_{\text{coum}}$); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ (ppm) 15,79, 51,15, 89,33, 101,75, 111,19, 113,60, 122,70, 125,02, 130,22, 140,18, 143,68, 149,93, 154,91, 157,95, 159,06, 161,13, 161,51 ; MS (ESI $^+$): m/z (%) = 366 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

8-hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromèn-2-one (10d)



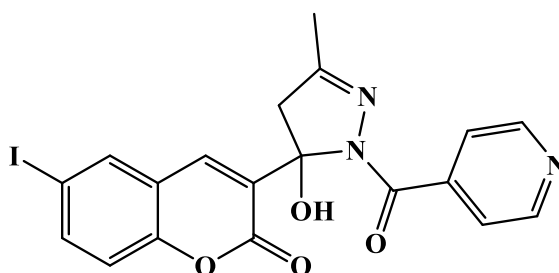
Poudre blanche; Rdt: 88 %; Pf 233-235 °C ; RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 2,00 (s, 3H, CH_3), 3,00 (d, $J=18,9$ Hz, 1H, CH_2), 3,41 (d, $J=18,9$ Hz, 1H, CH_2), 7,15-7,21 (m, 2H, H_{coum}), 7,27 (m, 1H, H_{coum}), 7,97 (m, 2H, H_{pyr}), 8,07 (L, 1H, OH-5'), 8,29 (s, 1H, H_{coum}), 8,97 (m, 2H, H_{pyr}), 10,28 (L, 1H, OH $_{\text{coum}}$); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ (ppm) 15,80, 51,07, 89,18, 118,23, 118,73, 119,78, 124,71, 125,10, 127,36, 140,05, 141,66, 143,49, 144,53, 149,99, 158,13, 158,60, 161,13; MS (ESI $^+$): m/z (%) = 366 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-6-nitro-2H-chromèn-2-one (10e)



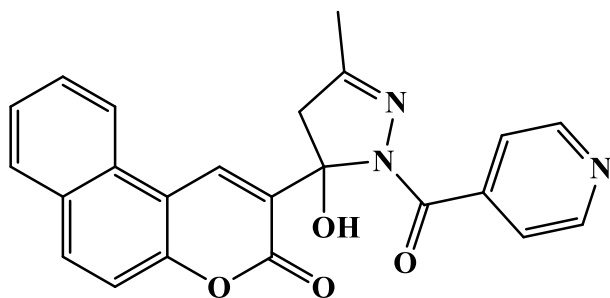
Poudre blanche; Rdt: 45 % ; Pf 211-217 °C ; RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) 2,03 (s, 3H, CH_3) ,3,04 (d, $J=18,9$ Hz, 1H, CH_2), 3,46 (d, $J=18,9$ Hz, 1H, CH_2),6,62 (L, 1H, OH-5'), 7,68 (d, $J=9,2$ Hz, 1H, H_{coum}), 7,95 (m, 2H, H_{pyr}), 8,44 (dd, $J=2,53, 9,09$ Hz, 1H, H_{coum}), 8,59 (s, 1H, H_{coum}), 8,95 (m, 3H, 2H_{pyr} , 1H_{coum}); RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) 16,22, 51,33, 89,43, 117,98, 119,77, 125,32, 125,38, 126,98, 130,18, 139,07, 144,34, 144,40, 149,72, 156,94, 158,18, 158,55, 161,81; MS (ESI+): m/z (%)= 395 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4, 5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-6-iodo-2H-chromèn-2-one (10f)



Poudre blanche ; Rdt: 85 % ; Pf 222-227 °C ; RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) 2.00 (s, 3H, CH_3), 2,98 (d, $J=18,9$ Hz, 1H, CH_2), 3,41 (d, $J=18,9$ Hz, 1H, CH_2), 5,41 (L, 1H, OH-5'), 7,26 (d, $J=8,7$ Hz, 1H, H_{coum}), 7,88-7,94 (m, 3H, H_{pyr} , H_{coum}), 8,31-8,34 (m, 2H, H_{coum}), 8,92 (m, 2H, H_{pyr}) ; RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ (ppm) 15,76, 50,96, 88,55, 89,00, 118,22, 121,14, 124,75, 128,65, 136,88, 138,26, 140,00, 144,24, 149,02, 152,53, 157,93, 158,14, 161,38 ; MS (ESI+) : m/z (%)= 476 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-3H-benzof[*f*]chromèn-3-one (10g)



Poudre beige ; Rdt: 76 % ; Pf 217-225 °C ; RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) 2,06 (s, 3H, CH_3) ,3,11 (d, $J=19,2$ Hz, 1H, CH_2), 3,51 (d, $J=19,2$ Hz, 1H, CH_2), 5,07 (L, 1H, OH-5'), 7,62 (d, $J=8,8$ Hz, 1H, H_{coum}), 7,67 (t, $J=7,6$ Hz, 1H, H_{benz}), 7,81 (t, $J=7,2$ Hz, 1H, H_{benz}), 8,01 (m, 2H, H_{pyr}), 8,10 (d, $J= 8$ Hz, 1H, H_{benz}), 8,23 (d, $J=8,8$ Hz, 1H, H_{coum}), 8,51 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, H_{benz}), 8,99 (m, 2H, H_{pyr}), 9,11 (s, 1H, H_{coum}) ; RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) 16,23, 51,42, 89,98, 113,11, 116,80, 122,37, 125,54, 126,71, 127,34, 129,08, 129,20, 129,50, 130,43, 133,81, 135,65, 144,13, 150,04, 153,12, 158,70, 159,02, 161,73; MS (ESI+): m/z (%) = 400 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IV. Évaluation *in-vitro* de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante (activité de piégeage des radicaux libres) des composés synthétisés **10a-g** a été évaluée en utilisant le test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH $^{\bullet}$) [44]. Une solution de DPPH $^{\bullet}$ a été préparée en dissolvant le DPPH dans de l'éthanol pour obtenir une concentration de 4 mg/100 mL. Les composés **10a-g** ont été dissous dans du DMSO pour obtenir une solution 10^{-1} M. Les solutions des composés à tester et le standard ont été diluées avec du DMSO pour obtenir des concentrations finales de 0,05, 0,025, 0,0125 et 0,00625, 0,003125, 0,0015625 et 0,000781 mol/L. Chaque concentration testée de chaque composé (40 μL) a été ajoutée à chaque puits séparément en double, puis la solution de DPPH $^{\bullet}$ (2 mL) a été ajoutée. Le puit de contrôle négatif a été chargé de DMSO (40 μL) et de solution DPPH $^{\bullet}$ (2 mL). Après vortexage, les mélanges ont été incubés à température ambiante pendant 1 h dans l'obscurité à 25 °C, puis l'absorbance de ces composés à différentes concentrations a été enregistrée. L'acide ascorbique (AA) a été utilisé comme standard pour le dépistage de l'activité antioxydante. Chaque mesure a été effectuée en triplicata. La réduction du radical DPPH a été mesurée en suivant en continu la diminution de l'absorption à 517 nm. L'effet de piégeage du DPPH a été calculé en pourcentage de la décoloration du DPPH en utilisant l'équation (1) :

$$\text{RSA (\%)} = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100 \quad \text{Eq (1)}$$

Où A_c est l'absorbance du contrôle (absorbance de la solution sans échantillon), et A_s est l'absorbance des composés de l'échantillon testé après 60 min d'incubation.

V. Évaluation *in-vitro* de l'activité antifongique

Les propriétés antifongiques et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des composés **10a-g** ont été évaluées par la méthode de diffusion sur disque [45,46], contre les levures *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. Les composés testés **10a-g**, préalablement dissous dans du DMSO à une concentration de 5 mg/mL, ont été imprégnés sur des disques de papier stérile (6 mm de diamètre). Les disques ont ensuite été placés de façon stérile sur de la gélose Sabouraud (SAB), préalablement inoculée avec la suspension microbienne, puis incubés pendant 48 heures (*Candida albicans*) et 7 jours (*Aspergillus niger*) à 37 °C. L'activité antifongique a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. La CMI est définie comme la plus faible concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Pour la déterminer, une série de dilutions dans le DMSO de différentes solutions des composés actifs à des concentrations allant de 500 à 3,91 µg/mL a été préparée, 1 mL de chaque concentration a été mélangé à 9 mL de milieu SAB réparti dans des boîtes de Pétri, puis la suspension fongique a étéensemencée à la surface du milieu gélosé. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 48 heures pour *Candida albicans* et 7 jours pour *aspergillus Niger* à 37 °C.

VI. Études computationnelles

VII.1. Études DFT

Tous les calculs théoriques ont été effectués avec le programme ORCA V.04 [36]. Toutes les structures moléculaires ont été optimisées géométriquement au niveau de théorie de Becke à trois paramètres, Lee-Yang-Parr (B3LYP) en utilisant l'ensemble de base 6-311G** et LANL2DZ pour l'iode [35]. Le calcul des fréquences a été effectué au même niveau de théorie. Pour expliquer la réactivité et les activités biologiques des composés synthétisés, plusieurs descripteurs, tels que l'énergie d'ionisation (E_i) [47], l'affinité électronique (A_e) [48], le potentiel chimique (μ) [49], l'électrophilicité (ω) [50], la mollesse (S) [51] et la dureté chimique (η) [52], ont été calculés à l'aide des formules ci-dessous :

$$E_i = E_{N-1} - E_N \quad (2)$$

$$A_s = E_{N+1} - E_N \quad (3)$$

$$\chi = -\mu = \frac{1}{2}(E_i + A_s) \quad (4)$$

$$\eta = \frac{1}{2}(E_i - A_s) \quad (5)$$

$$S = \frac{1}{2}\eta \quad (6)$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (7)$$

Où, E_N , E_{N-1} et E_{N+1} sont les énergies totales de l'état fondamental dans les configurations N neutre et (N-1) et (N+1) à charge unique, respectivement.

VII.2. Docking moléculaire

Dans le but de rationaliser l'activité antifongique significative démontrée par le **10e** dans l'essai *in-vitro* et d'évaluer son mécanisme d'action plausible, une étude de docking moléculaire a été réalisée contre les récepteurs fongiques d'*Aspergillus niger*.

Comme le composé **10e** est chiral, les énantiomères (**R**) et (**S**) ont été utilisés dans les calculs de docking. Ainsi, le modèle moléculaire (*Aspergillus niger*) PDB ID : 3K4Q, correspondant à une protéine fongique d'*Aspergillus niger* (Phytase A) complexée avec le ligand de référence, le myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis phosphate (HIS), a été récupéré sur le serveur de la Protéine Data Bank (<http://www.pdb.org>) et a été utilisé comme récepteur dans les simulations de docking moléculaire avec le logiciel AutoDock 4.1 [53]. Un monomère a été considéré et les cofacteurs du substrat, les molécules d'eau cristallographiques et le ligand co-cristallisé ont été supprimés [54]. Le site actif a été défini en sélectionnant tous les résidus qui sont à moins de 6 Å du centre du ligand de référence [55]. Les géométries optimisées des deux énantiomères du composé **10e** et du médicament standard kétoconazole ont été utilisées comme ligands flexibles pendant la simulation de docking moléculaire. Ainsi, une grille de 54×56×54 points autour de chacun des domaines modélisés a été utilisée avec un espacement des points de grille de 0,375 Å. L'algorithme génétique lamarckien (LGA) a été utilisé dans la procédure de docking et 50 exécutions indépendantes avec 2500000 évaluations d'énergie et un nombre maximal de générations de 30000. La pose d'arrimage résultante de chaque ligand docké à la protéine a été analysée pour ses interactions de liaison hydrogène avec le récepteur et a été visualisée à l'aide du logiciel AutoDoTools [56].

Références bibliographiques

- [1] F. Salehian, H. Nadri, L. Jalili-baleh, L. Youseftabar-miri, S. Nasir, A. Bukhari, A. Foroumadi, T.T. Küçükkilinç, M. Sharifzadeh, M. Khoobi, A Review: Biologically active 3,4-heterocycle-fused coumarins, *European Journal of Medicinal Chemistry*. (2020) 113034. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113034>.
- [2] A.M.K. El-Dean, R.M. Zaki, A.A. Geies, S.M. Radwan, M.S. Tolba, Synthesis and antimicrobial activity of new heterocyclic compounds containing thieno[3,2-c]coumarin and pyrazolo[4,3-c]coumarin frameworks, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 39 (2013) 553–564. <https://doi.org/10.1134/S1068162013040079>.
- [3] M.S. Tolba, M.A. Abd Ul-Malik, A.M. Kamal El-Dean, A.A. Geies, S.M. Radwan, R.M. Zaki, M. Sayed, S.K. Mohamed, S.A.A. Abdel-Raheem, An overview on synthesis and reactions of coumarin based compounds, *Current Chemistry Letters*. 11 (2022) 29–42. <https://doi.org/10.5267/J.CCL.2021.9.007>.
- [4] F. Annunziata, C. Pinna, S. Dallavalle, L. Tamborini, A. Pinto, An overview of coumarin as a versatile and readily accessible scaffold with broad-ranging biological activities, *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (2020) 1–83. <https://doi.org/10.3390/ijms21134618>.
- [5] S. Mishra, A. Pandey, S. Manvati, Coumarin: An emerging antiviral agent, *Heliyon*. 6 (2020) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03217>.
- [6] A.S.O. Lemos, J.R. Florêncio, N.C.C. Pinto, L.M. Campos, T.P. Silva, R.M. Grazul, P.F. Pinto, G.D. Tavares, E. Scio, A.C.M. Apolônio, R.C.N. Melo, R.L. Fabri, Antifungal Activity of the Natural Coumarin Scopoletin Against Planktonic Cells and Biofilms From a Multidrug-Resistant *Candida tropicalis* Strain, *Frontiers in Microbiology*. 11 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01525>.
- [7] M. Mladenović, M. Mihailović, D. Bogojević, S. Matić, N. Nićiforović, V. Mihailović, N. Vuković, S. Sukdolak, S. Solujić, In vitro antioxidant activity of selected 4-hydroxy-chromene-2-one derivatives-SAR, QSAR and DFT studies, *International Journal of Molecular Sciences*. 12 (2011) 2822–2841. <https://doi.org/10.3390/ijms12052822>.
- [8] T. Al-Warhi, A. Sabt, E.B. Elkaeed, W.M. Eldehna, Recent advancements of coumarin-based anticancer agents: An up-to-date review, *Bioorganic Chemistry*. 103 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104163>.
- [9] A. Rawat, A. Vijaya Bhaskar Reddy, Recent advances on anticancer activity of coumarin derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 5 (2022) 100038. <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100038>.
- [10] L.R. Singh, S.R. Avula, S. Raj, A. Srivastava, G.R. Palnati, C.K.M. Tripathi, M. Pasupuleti, K. V. Sashidhara, Coumarin-benzimidazole hybrids as a potent

- antimicrobial agent: Synthesis and biological elevation, *Journal of Antibiotics*. 70 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.70>.
- [11] D. Feng, A. Zhang, Y. Yang, P. Yang, Coumarin-containing hybrids and their antibacterial activities, *Archiv Der Pharmazie*. 353 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1002/ardp.201900380>.
- [12] D.S. Reddy, M. Kongot, A. Kumar, Coumarin hybrid derivatives as promising leads to treat tuberculosis: Recent developments and critical aspects of structural design to exhibit anti-tubercular activity, *Tuberculosis*. 127 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102050>.
- [13] M.S. Tolba, M. Sayed, A.M.K. El-Dean, R. Hassanien, S.A.A. Abdel-Raheem, M. Ahmed, Design, synthesis and antimicrobial screening of some new thienopyrimidines, *Organic Communications*. 14 (2021) 334–345. <https://doi.org/10.25135/acg.oc.114.2109.2214>.
- [14] M.S. Tolba, A.M. Sayed, M. Sayed, M. Ahmed, Design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking of some new Thieno[2,3-d] pyrimidine derivatives, *Journal of Molecular Structure*. 1246 (2021) 131179. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131179>.
- [15] Himangini, D.P. Pathak, V. Sharma, S. Kumar, Designing novel inhibitors against falcipain-2 of *Plasmodium falciparum*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 28 (2018) 1566–1569. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.03.058>.
- [16] F.A. Ragab, A.A.M. Eissa, S.H. Fahim, M.A. Salem, M.A. Gamal, Yassin M. Nissan, Synthesis and biological evaluation of new coumarin derivatives as cytotoxic agents, *Archiv Der Pharmazie*. 354 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1002/ardp.202100029>.
- [17] F.M. Aqlan, Synthesis Characterization and In Vitro Antibacterial Activity of the N-Substituted Bis-Pyrazoline Derivative as Polycyclic Aromatic Compounds, *Polycyclic Aromatic Compounds*. (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1080/10406638.2020.1866040>.
- [18] D.K. Karim, G.A. Salman, S. Al-Mansury, N.A. Jinzeel, Synthesis and antimicrobial evaluation of arylated 1,3,5-triphenyl pyrazoline derivatives using suzuki-miyaura reactions, *Egyptian Journal of Chemistry*. 64 (2021) 2469–2481. <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2021.57726.3238>.
- [19] M. Mantzanidou, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, Pyrazoles and pyrazolines as anti-inflammatory agents, *Molecules*. 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26113439>.
- [20] B. Revanasiddappa, M.V. Kumar, H. Kumar, Synthesis and Antidepressant Activity of Pyrazoline Derivatives, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 19 (2020) 179–184. <https://doi.org/10.3329/dujps.v19i2.50634>.

- [21] A. Kumar, P. Kumar, C.R. Shetty, J.P. James, H.C. Shetty, Synthesis, antidiabetic evaluation and bioisosteric modification of quinoline incorporated 2-pyrazoline derivatives, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 55 (2021) 574–580. <https://doi.org/10.5530/ijper.55.2.96>.
- [22] S. Pola, K.K. Banoth, M. Sankaranarayanan, R. Ummani, A. Garlapati, Design, synthesis, in silico studies, and evaluation of novel chalcones and their pyrazoline derivatives for antibacterial and antitubercular activities, *Medicinal Chemistry Research*. 29 (2020) 1819–1835. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02602-8>.
- [23] D. Matiadis, M. Sagnou, Pyrazoline hybrids as promising anticancer agents: An up-to-date overview, *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (2020) 1–41. <https://doi.org/10.3390/ijms21155507>.
- [24] S.P. Singh, D. Kumar, H. Batra, R. Naithani, I. Rozas, J. Elguero, The reaction between hydrazines and β -dicarbonyl compounds: Proposal for a mechanism, *Canadian Journal of Chemistry*. 78 (2000) 1109–1120. <https://doi.org/10.1139/v00-104>.
- [25] E.A. Shokova, J.K. Kim, V.V. evich Kovalev, 1,3-Diketones. Synthesis and properties, 2015. <https://doi.org/10.1134/S1070428015060019>.
- [26] T. Vahedpour, M. Hamzeh-Mivehroud, S. Hemmati, S. Dastmalchi, Synthesis of 2-Pyrazolines from Hydrazines: Mechanisms Explained, *ChemistrySelect*. 6 (2021) 6483–6506. <https://doi.org/10.1002/slct.202101467>.
- [27] Y.Q. Hu, S. Zhang, F. Zhao, C. Gao, L.S. Feng, Z.S. Lv, Z. Xu, X. Wu, Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 133 (2017) 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.002>.
- [28] P. Aragade, M. Palkar, P. Ronad, D. Satyanarayana, Coumarinyl pyrazole derivatives of INH: Promising antimycobacterial agents, *Medicinal Chemistry Research*. 22 (2013) 2279–2283. <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0222-8>.
- [29] A. Benazzouz, M. Makhoulfi-Chebli, S.M. Hamdi, B. Boutemour-Kheddis, A.M.S. Silva, M. Hamdi, Study of novel fluorescent coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones dyads. Estimation of ground- and excited-state dipole moments from a solvatochromic shift, *Journal of Molecular Liquids*. 219 (2016) 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.02.095>.
- [30] L. Saher, M. Makhoulfi-Chebli, L. Dermeche, S. Dermeche, 10- (4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2 H -pyran-3-yl) -3-methyl-1 H , 10 H - pyrano [4 , 3- b] chromen-1-ones from a pseudo-multicomponent reaction and evaluation of their antioxidant activity 10- (4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2 H -pyran-3-yl) -3-methyl-1 H , *Tetrahedron*. 74 (2018) 872–879. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.01.009>.
- [31] A. Benazzouz-Touami, A. Chouh, S. Halit, S. Terrachet-Bouaziz, M. Makhoulfi-

- Chebli, K. Ighil-Ahriz, A.M.S. Silva, New Coumarin-Pyrazole hybrids: Synthesis, Docking studies and Biological evaluation as potential cholinesterase inhibitors, *Journal of Molecular Structure*. 1249 (2022) 131591. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131591>.
- [32] A. Benazzouz-Touami, D. Hikem-Oukacha, K.O. Lamara, S. Halit, S. Terrachet-Bouaziz, M. Makhoulfi-Chebli, Synthesis, biological activities and molecular docking study of 3-(3-oxobutanoyl)-2H-chromen-2-one derivatives, *Chemical Data Collections*. 36 (2021) 100792. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2021.100792>.
- [33] S.P. Singh, D. Kumar, B.G. Jones, M.D. Threadgill, Formation and dehydration of a series of 5-hydroxy-5-trifluoromethyl- 4,5-dihydropyrazoles, *Journal of Fluorine Chemistry*. 94 (1999) 199–203. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1139\(99\)00011-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-1139(99)00011-1).
- [34] L. Buriol, C.P. Frizzo, M.R.B. Marzari, D.N. Moreira, L.D.T. Prola, N. Zanatta, H.G. Bonacorso, M.A.P. Martins, Pyrazole synthesis under microwave irradiation and solvent-free condition, *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 21 (2010) 1037–1044. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000600012>.
- [35] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Physical Review B*. 37 (1988) 785–789. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>.
- [36] F. Neese, The ORCA program system, *WIREs Computational Molecular Science*. 2 (2012) 73–78. <https://doi.org/10.1002/wcms.81>.
- [37] P.T. Thuong, T.M. Hung, T.M. Ngoc, D.T. Ha, B.S. Min, S.J. Kwack, K. Bae, Antioxidant Activities of Coumarins from Korean Medicinal Plants and their Structure–Activity Relationships, *Phytotherapy Research*. 24 (2010) 101–106. <https://doi.org/10.1002/ptr>.
- [38] J.J. Zhu, J.G. Jiang, Pharmacological and Nutritional Effects of Natural Coumarins and Their Structure–Activity Relationships, *Molecular Nutrition and Food Research*. 62 (2018) 1–74. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201701073>.
- [39] A. Fassihi, F. Hasanzadeh, A. Attar, L. Saghaie, M. Mohammadpour, Synthesis and evaluation of antioxidant activity of some novel hydroxypyridinone derivatives: A DFT approach for explanation of their radical scavenging activity, *Research in Pharmaceutical Sciences*. 15 (2020) 515–528. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.301336>.
- [40] U. Vanitha, R. Elancheran, V. Manikandan, S. Kabilan, K. Krishnasamy, Design, synthesis, characterization, molecular docking and computational studies of 3-phenyl-2-thioxoimidazolidin-4-one derivatives, *Journal of Molecular Structure*. 1246 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131212>.

- [41] R.G. Parr, L. V. Szentpály, S. Liu, Electrophilicity index, *Journal of the American Chemical Society*. 121 (1999) 1922–1924. <https://doi.org/10.1021/ja983494x>.
- [42] S. Bouaziz-Terrachet, A. Toumi-Maouche, B. Maouche, S. Taïri-Kellou, Modeling the binding modes of stilbene analogs to cyclooxygenase-2: A molecular docking study, *Journal of Molecular Modeling*. 16 (2010) 1919–1929. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0679-7>.
- [43] D.C. Niño-Gómez, C.M. Rivera-Hoyos, E.D. Morales-Álvarez, E.A. Reyes-Montaña, N.E. Vargas-Alejo, I.N. Ramírez-Casallas, K. Erkan Türkmen, H. Sáenz-Suárez, J.A. Sáenz-Moreno, R.A. Poutou-Piñales, J. González-Santos, A. Arévalo-Galvis, “In silico” characterization of 3-phytase a and 3-phytase B from aspergillus Niger, *Enzyme Research*. 2017 (2017) 1–23. <https://doi.org/10.1155/2017/9746191>.
- [44] L.L. Mensor, F.S. Menezes, G.G. Leitaó, A.S. Reis, T.C. dos Santos, C.S. Coube, S.G. Leitaó, Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method, *Phytotherapy Research*. 15 (2001) 127–130. <https://doi.org/10.1002/ptr.687>.
- [45] G. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R. Bruni, Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods, *Food Chemistry*. 91 (2005) 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>.
- [46] I. Rasooli, M.H. Fakoor, D. Yadegarinia, L. Gachkar, A. Allameh, M.B. Rezaei, Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils, *International Journal of Food Microbiology*. 122 (2008) 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.048>.
- [47] G. Schüürmann, Quantum Chemical Descriptors in Structure-Activity Relationships- Calculation, Interpretation, and Comparison of Methods, in: *Predicting Chemical Toxicity and Fate*, 2004: pp. 96–160. <https://doi.org/10.1201/9780203642627>.
- [48] J.P. Perdew, R.G. Parr, M. Levy, J.L. Balduz, Density-functional theory for fractional particle number: Derivative discontinuities of the energy, *Physical Review Letters*. 49 (1982) 1691–1694. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.49.1691>.
- [49] T. Koopmans, Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms, *Physica*. 1 (1934) 104–113. [https://doi.org/10.1016/S0031-8914\(34\)90011-2](https://doi.org/10.1016/S0031-8914(34)90011-2).
- [50] P. Geerlings, F. De Proft, W. Langenaeker, Conceptual density functional theory, *Chemical Reviews*. 103 (2003) 1793–1873. <https://doi.org/10.1021/cr990029p>.
- [51] P. Senet, Chemical hardnesses of atoms and molecules from frontier orbitals, *Chemical Physics Letters*. 275 (1997) 527–532. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(97\)00799-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(97)00799-9).

- [52] R.G. Parr, R.G. Pearson, Absolute Hardness: Companion Parameter to Absolute Electronegativity, *Journal of the American Chemical Society*. 105 (1983) 7512–7516. <https://doi.org/10.1021/ja00364a005>.
- [53] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *Journal of Computational Chemistry*. 19 (1998) 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-987x\(19981115\)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-987x(19981115)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b).
- [54] S. Hammad, S. Bouaziz-Terrachet, R. Meghnem, D. Meziane, Pharmacophore development, drug-likeness analysis, molecular docking, and molecular dynamics simulations for identification of new CK2 inhibitors, *Journal of Molecular Modeling*. 26 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00894-020-04408-2>.
- [55] K.O. Lamara, M. Makhloufi-Chebli, A. Benazzouz-Touami, S. Terrachet-Bouaziz, N. Hamdi, A.M.S. Silva, J.B. Behr, Selectivity control in the reaction between 2-hydroxyarylaldehydes and 4-hydroxycoumarin. Antioxidant activities and computational studies of the formed products, *Journal of Molecular Structure*. 1231 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.129936>.
- [56] M.F. Sanner, L. Jolla, Python: a programming language for software integration and development, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 17 (1999) 55–84. [https://doi.org/10.1016/s1093-3263\(99\)99999-0](https://doi.org/10.1016/s1093-3263(99)99999-0).

Conclusion générale

La préparation efficace et rapide de grandes collections de molécules présentant une diversité structurale maximale constitue un défi majeur pour l'industrie et la recherche pharmaceutiques. Nous avons pu à travers ce travail montré que les réactions multicomposants, visant à synthétiser des produits hautement fonctionnels, et la stratégie d'hybridation moléculaire sont précisément parmi les méthodes qui offrent la possibilité de créer de nouveaux composés multicycliques avec une activité biologique nouvelle ou améliorée.

- Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail a été de préparer via la réaction en une seule étape une série de molécules hybrides dérivés de la benzylpyrazolylcoumarine **5a-i**, impliquant la réaction d'acétoacétate d'éthyle, d'hydrate d'hydrazine, les dérivés d'aldéhydes et de la 4-hydroxycoumarine en utilisant un mélange éthanol-eau comme milieu réactionnel et le dodécylbenzènesulfonate de sodium (SDBS) comme catalyseur.
- Les structures des produits obtenus ont été déterminées et confirmées par les différentes techniques d'analyses spectroscopiques (RMN ^1H , ^{13}C et IR-TF).
- Des études de modélisation moléculaire utilisant des calculs de DFT ont montré qu'il existe six structures tautomères **A** à **F** dont la structure **C** est la plus stable.
- Les molécules synthétisées ont été évaluées pour leur activité antioxydante et ont montré de bons résultats.
- Les propriétés antifongiques des composés synthétisés ont également été évaluées, et ont révélé que le composé **5e** est le plus actif. Les résultats sont prometteurs.
- Le docking moléculaire du composé actif *in-vitro*, a prédit que le composé **5e** peut se lier librement à la protéine N-myristoyltransférase (NMT) (-16,34 kcal/mol) et pourrait faire partie de nouvelles classes d'agents antifongiques.

L'ensemble des résultats de cette partie ont fait l'objet d'une publication internationale dans le journal « **Journal of Molecular Structure** ».

- Nous avons décrit par la suite la mise au point d'une nouvelle synthèse efficace et pratique d'une série de dérivés de 3-(5-Hydroxy-1-isonicotinoyl-3-méthyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-5-yl)-2*H*-chromèn-2-one **10a-g** qui combinent les systèmes cycliques de la coumarine et de la pyrazoline. Ces composés sont préparés par une cyclocondensation des dérivés de la 3-acétoacétylcoumarine **8a-g** et l'hydrazide de

l'acide isonicotinique **9** en présence de HCl concentré à température ambiante du laboratoire.

- Les structures des composés synthétisés ont été identifiées par différentes méthodes d'analyse spectroscopiques (^1H , ^{13}C , 2D-NMR et LC-MS). Des analyses RMN-HMBC ^1H - ^{15}N ont été également réalisées pour déterminer la régiochimie des composés finaux.
- Les composés obtenus ont été évalués pour leur activité antifongique et deux d'entre eux ont montré des activités inhibitrices antifongiques potentiellement élevées (MIC= 31,25 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ et 15,62 $\mu\text{g. mL}^{-1}$).
- Les résultats de l'activité antioxydante étaient également satisfaisants. Les études SAR ont démontré que la présence de groupes nitro et hydroxyle dans le cycle aromatique des cycles coumarine et pyrazoline conférait une activité antioxydante et antifongique accrue.
- En outre, des études de docking moléculaire ont été réalisées pour le composé présentant une bonne activité antifongique afin d'évaluer son potentiel en tant qu'inhibiteur de la protéine fongique d'*Aspergillus niger* (Phytase A) et les résultats suggèrent que notre isonicotinoylpyrazolylcoumarine peut agir comme un agent antifongique prometteur.

Les résultats de cette partie ont fait l'objet d'une publication internationale dans le journal « **Journal of Molecular Structure** ».

En perspective il serait intéressant de :

- Réaliser une étude plus approfondie pour améliorer les conditions de la réaction de synthèse des produits obtenus (réduire le temps de la réaction, étude de l'effet de la quantité stœchiométrique des réactifs, utilisation de catalyseurs plus rentables, accessibles et moins toxiques, travailler sans solvant ...etc).
- D'utiliser le four à micro-onde pour la synthèse des molécules **5**.
- Approfondir l'étude biologique des produits synthétisés: tester d'autres souches bactériennes et d'autres microorganismes ainsi que l'évaluation d'autres activités biologiques (anti-tumorale, anti-cholinestérase, antituberculeuse...etc) dans des laboratoires spécialisés.
- Rechercher d'autres composés hétérocycliques possédant des activités biologiques potentielles.

Annexe

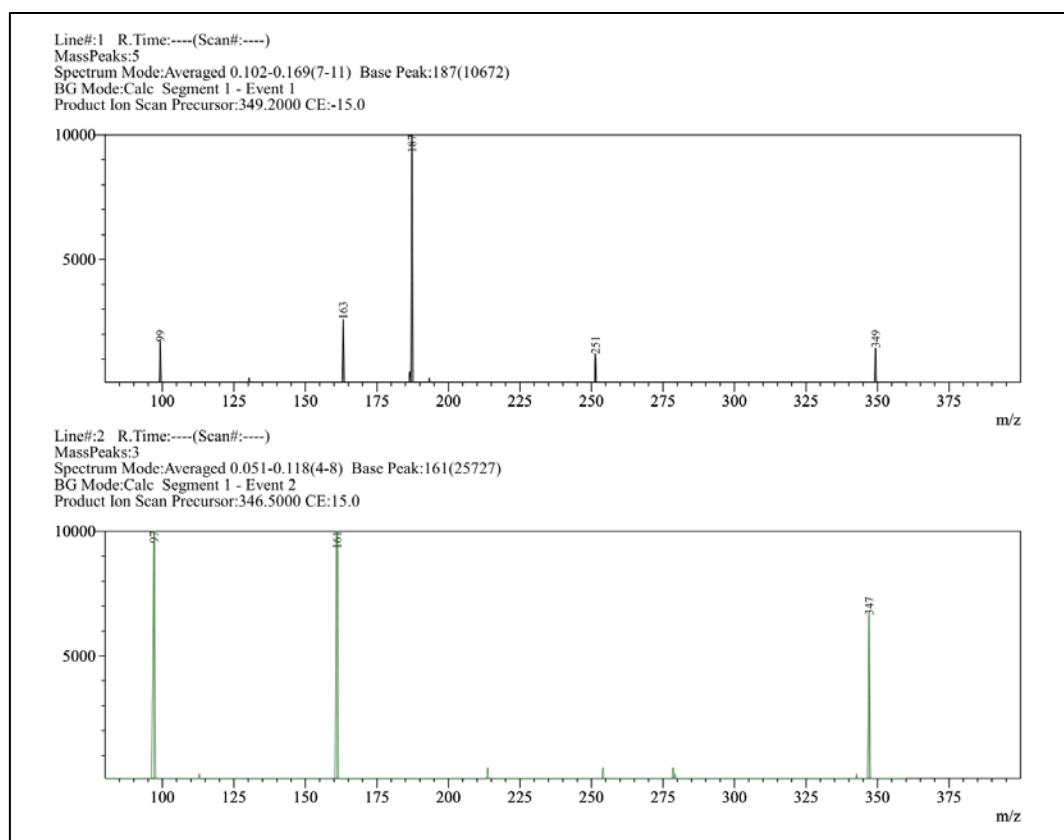
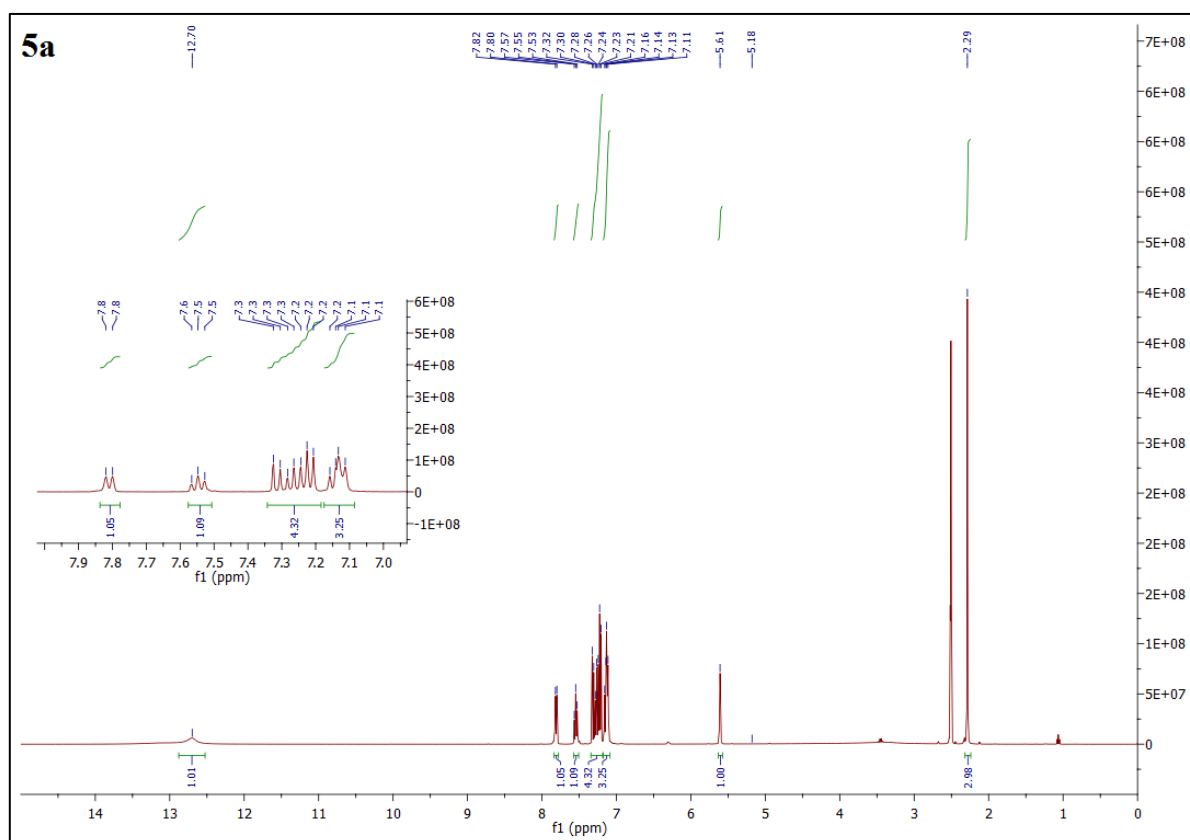


Figure 1 : Spectre de masse GC-MS du composé 5a

Figure 2 : Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) du composé 5a

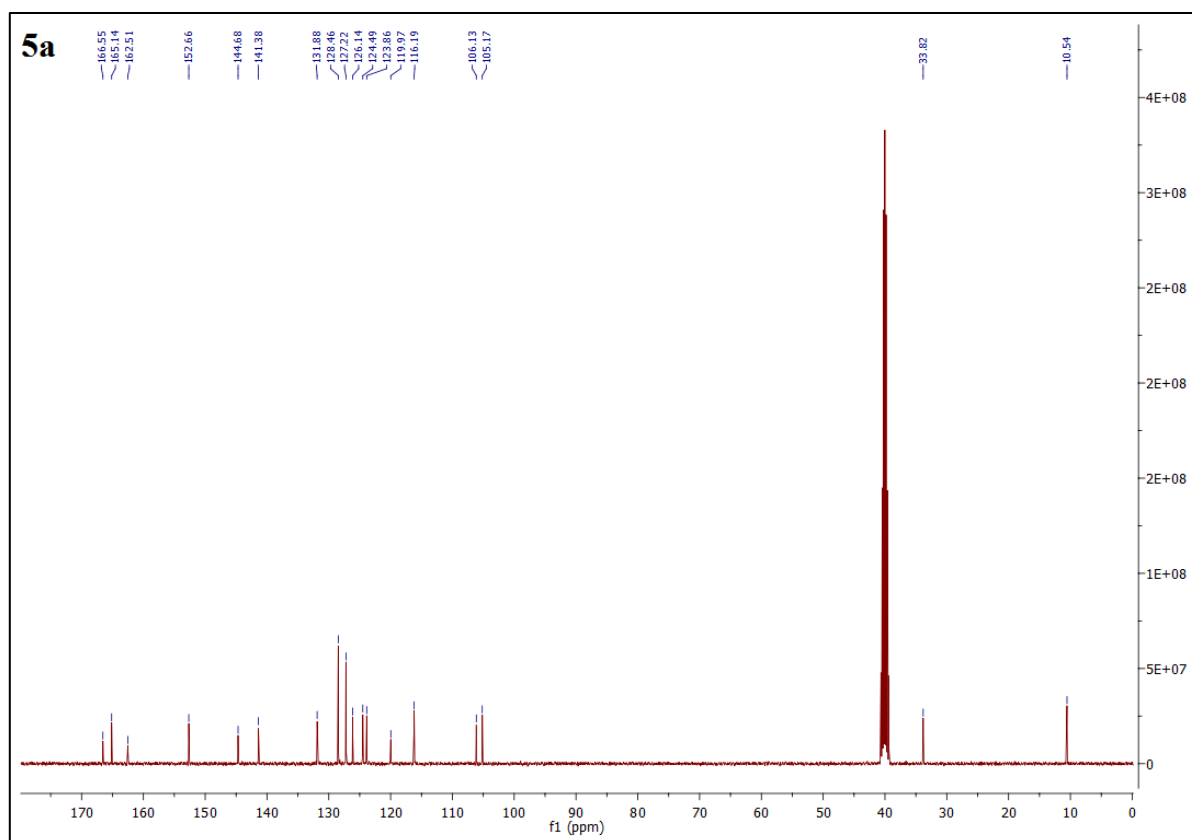


Figure 3 : Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz) du composé 5a

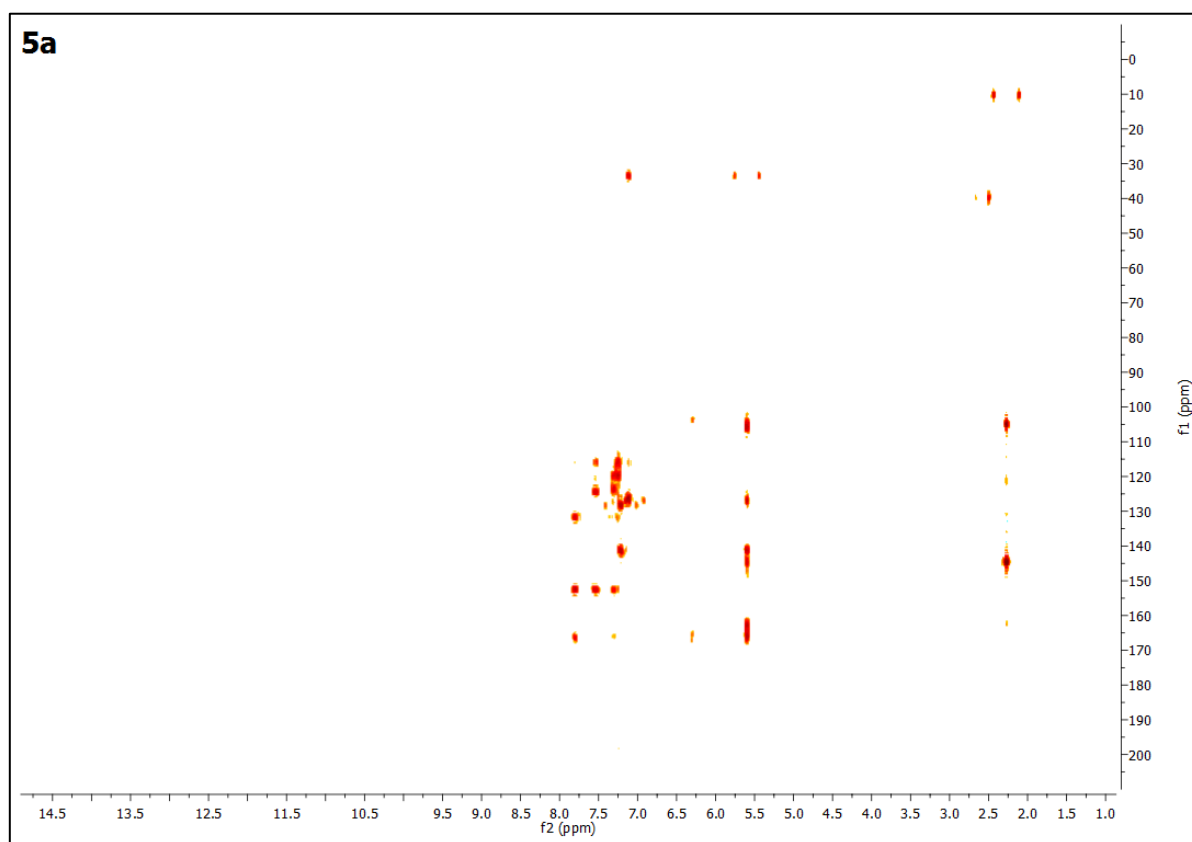


Figure 4 : Spectre HMBC du composé 5a

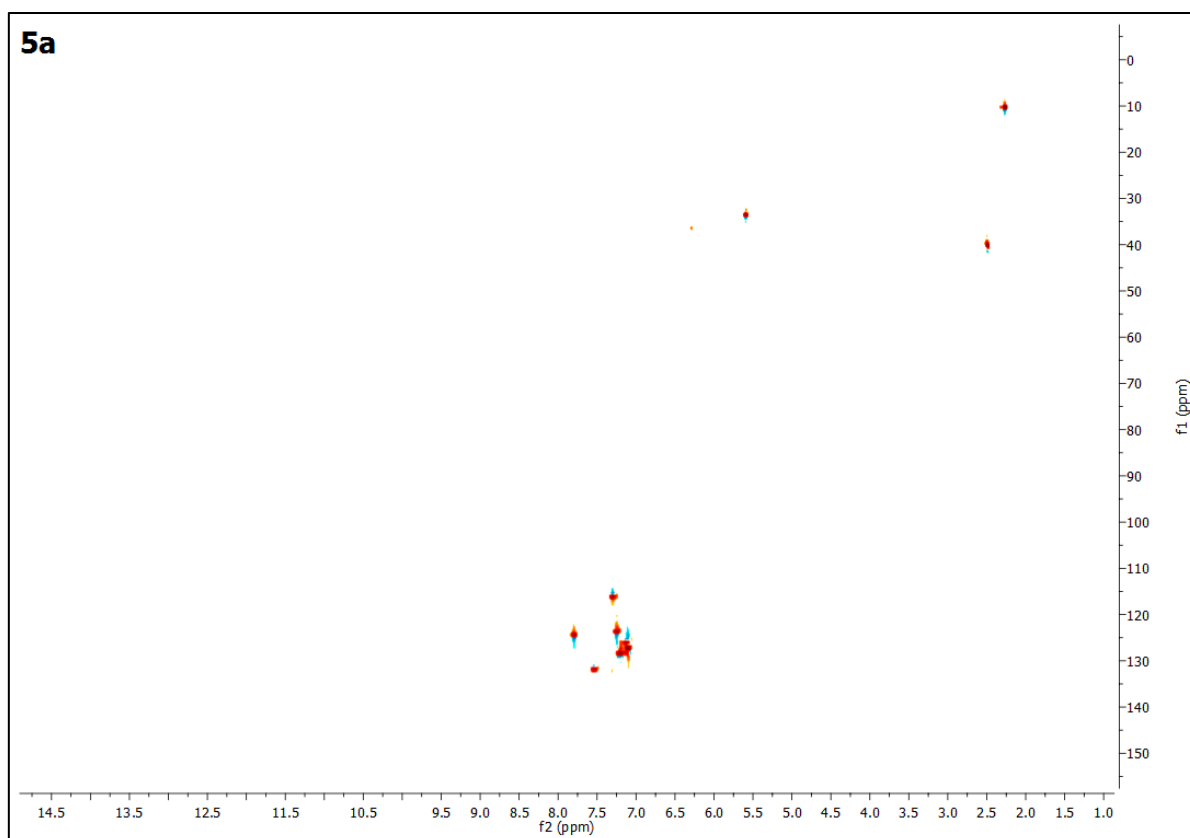
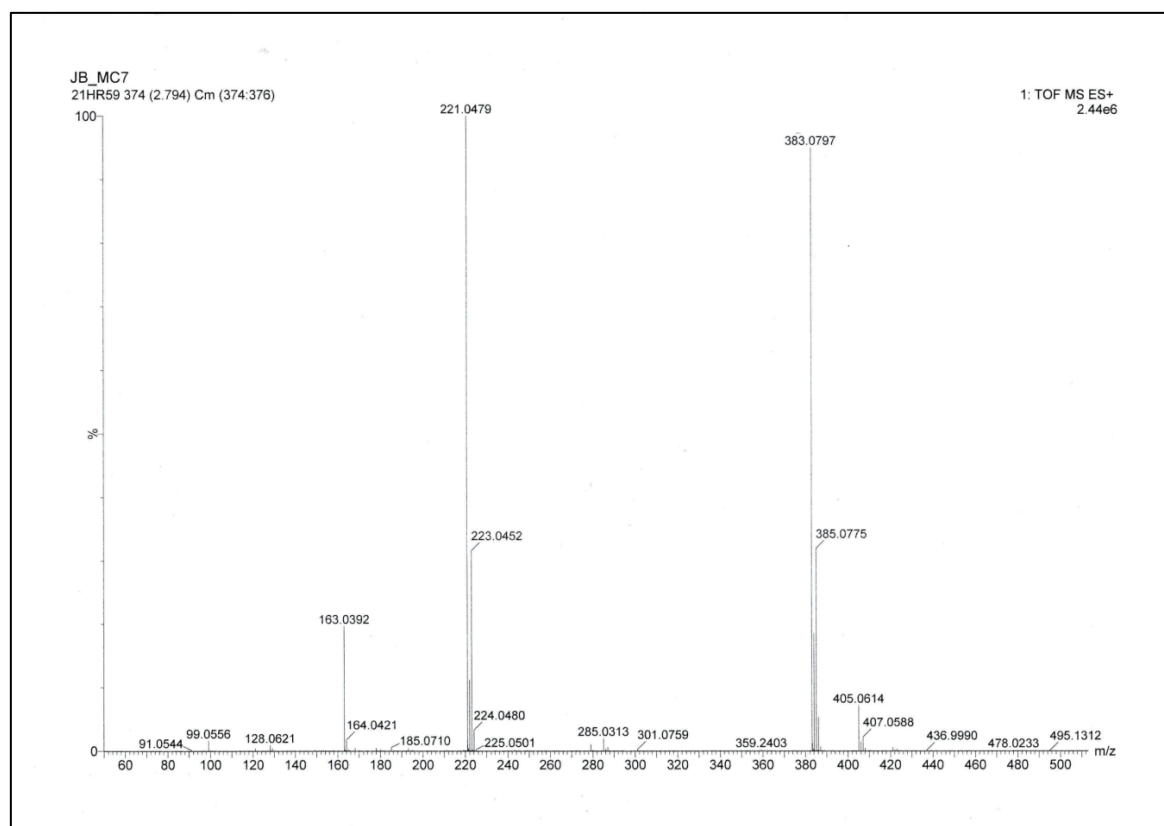


Figure 5 : Spectre HSQC du composé 5a

Figure 6 : Spectre de masse ES-MS+ des Produits obtenue avec la 2^{ème} méthode ($\text{R}_1=4\text{-ClC}_6\text{H}_4\text{-}$)

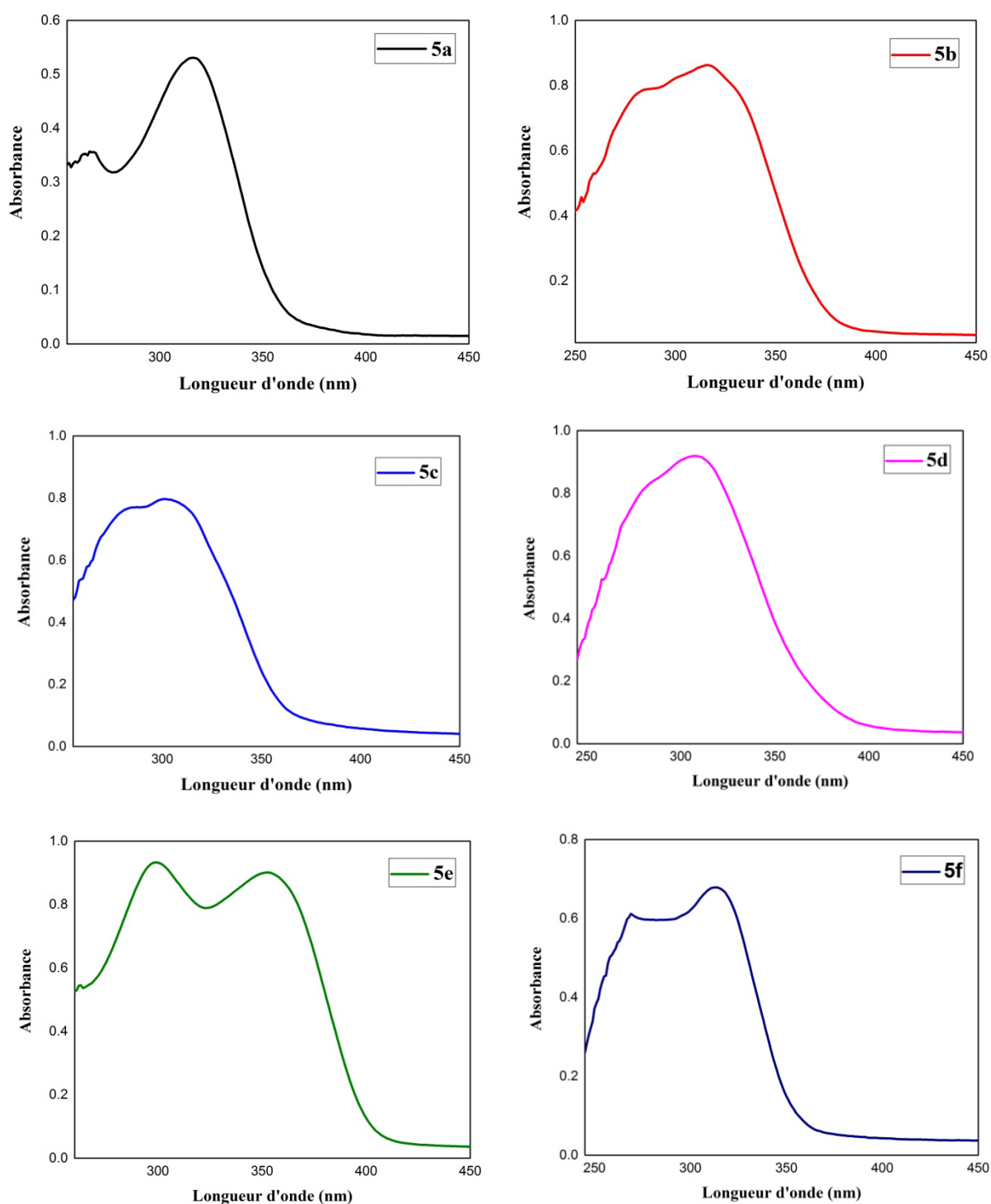


Figure 7 : Spectres d'absorption UV-Vis des composés 5a-f dans le DMSO à 10^{-5} M

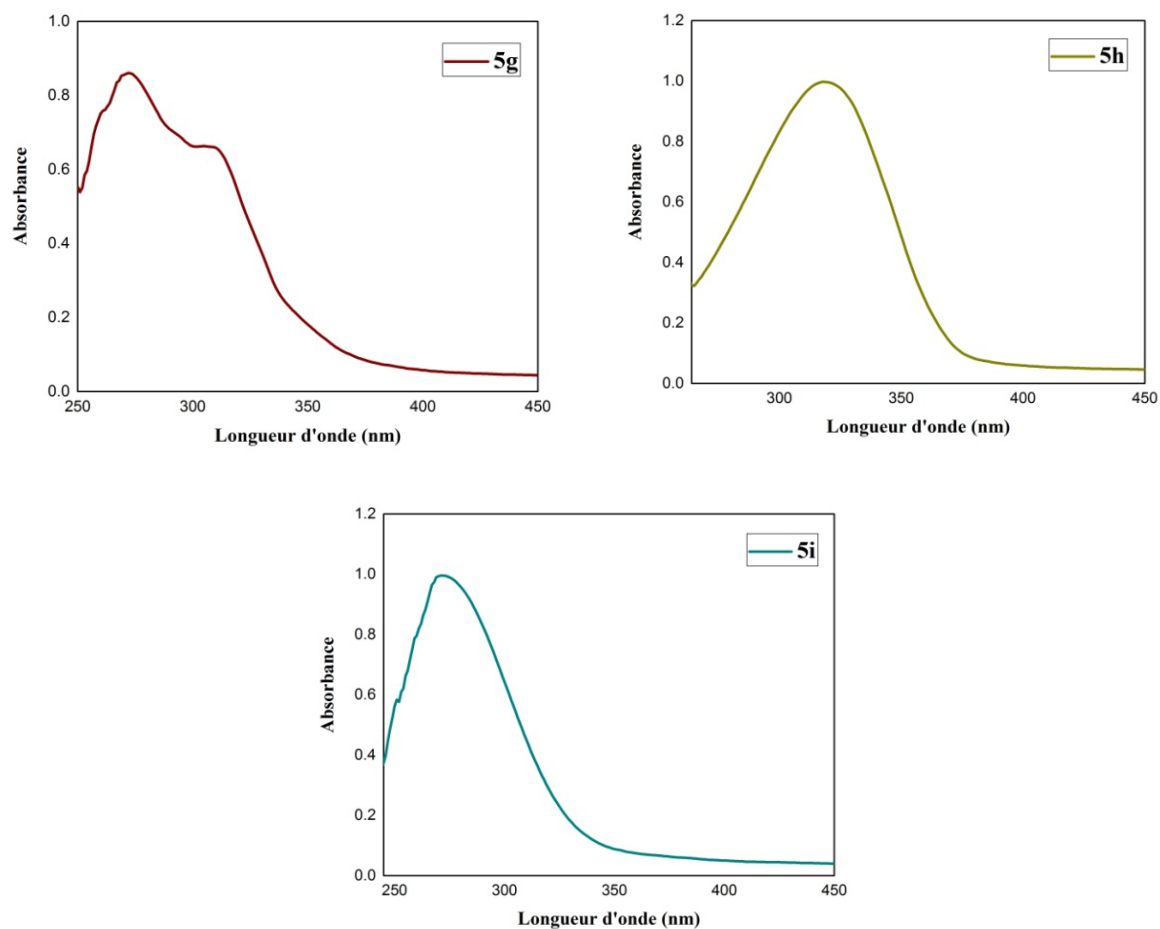


Figure 8 : Spectres d'absorption UV-Vis des composés 5g-i dans le DMSO à 10^{-5} M

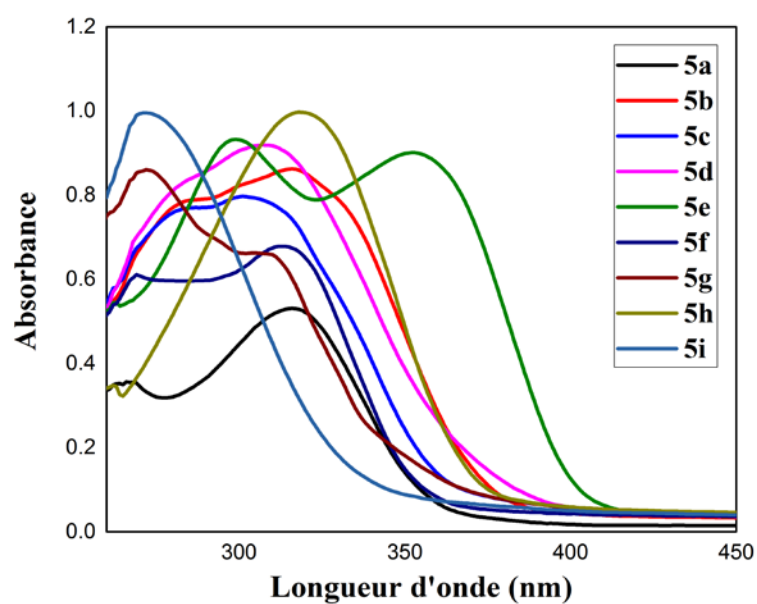


Figure 9 : Spectre d'absorption UV-Vis des composés 5a-i dans le DMSO à 10^{-5} M

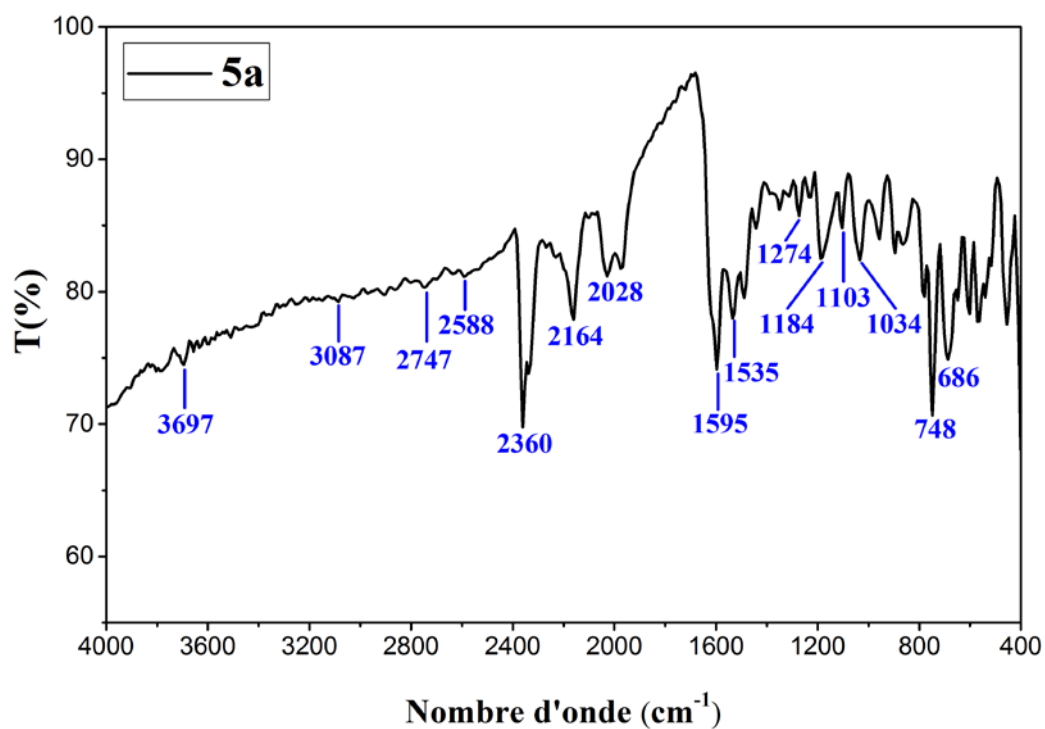


Figure 10 : Spectre IR du composé 5a

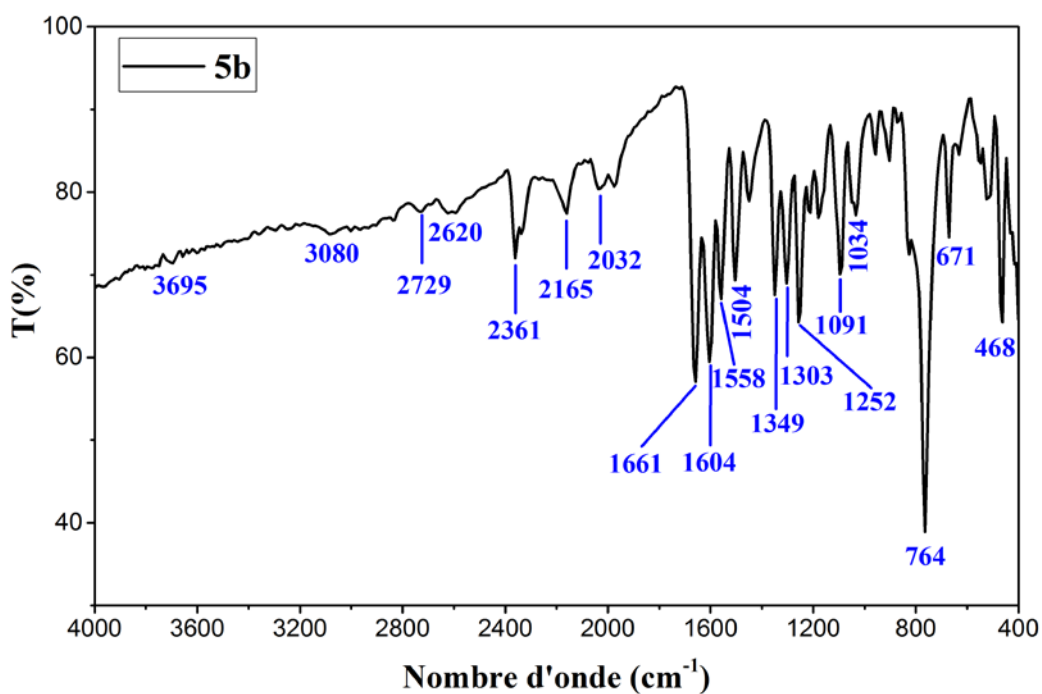


Figure 11 : Spectre IR du composé 5b

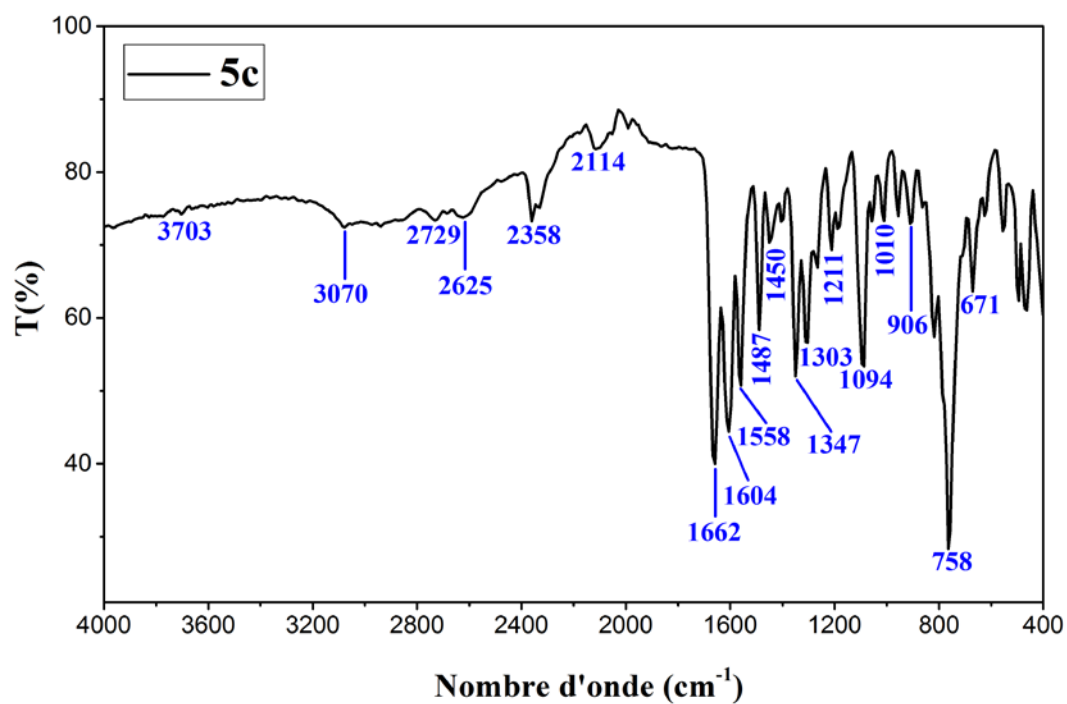


Figure 12 : Spectre IR du composé 5c

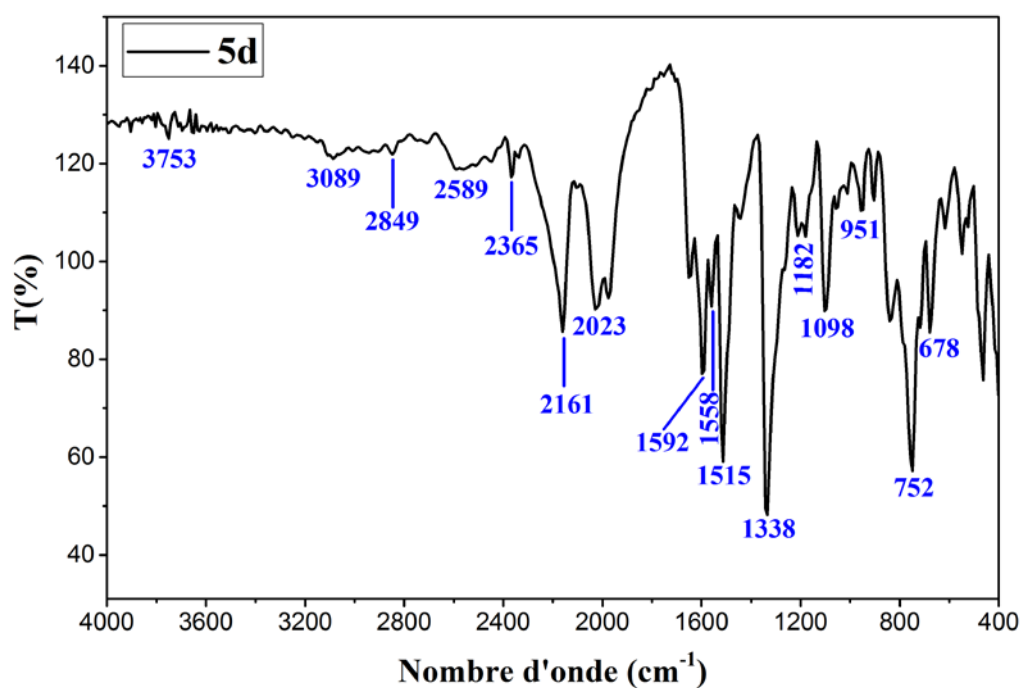


Figure 13 : Spectre IR du composé 5d

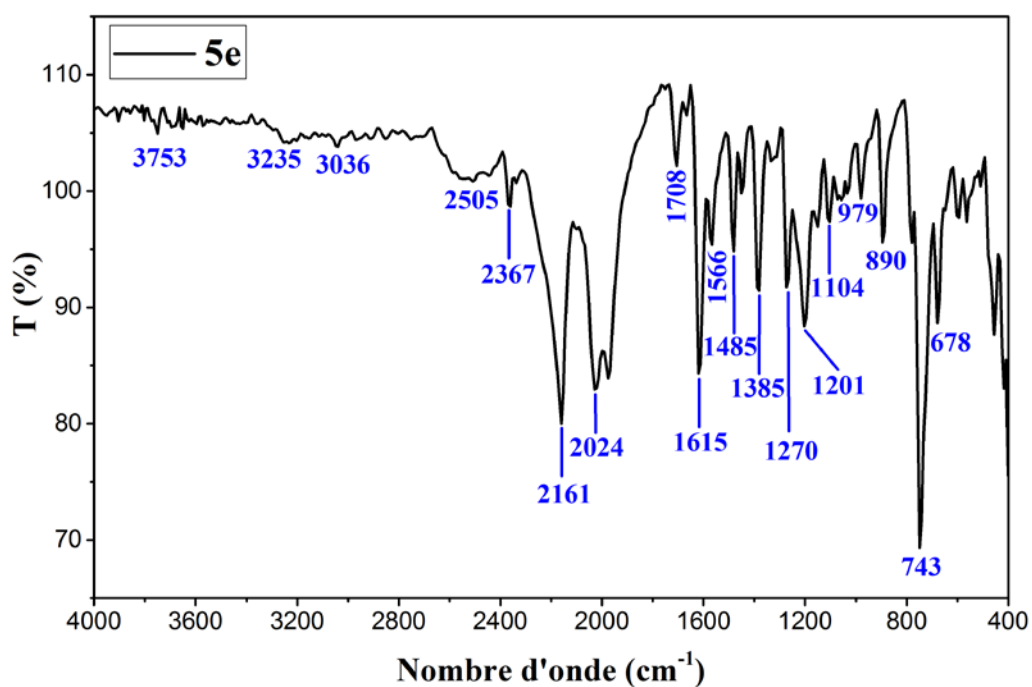


Figure 14 : Spectre IR du composé 5e

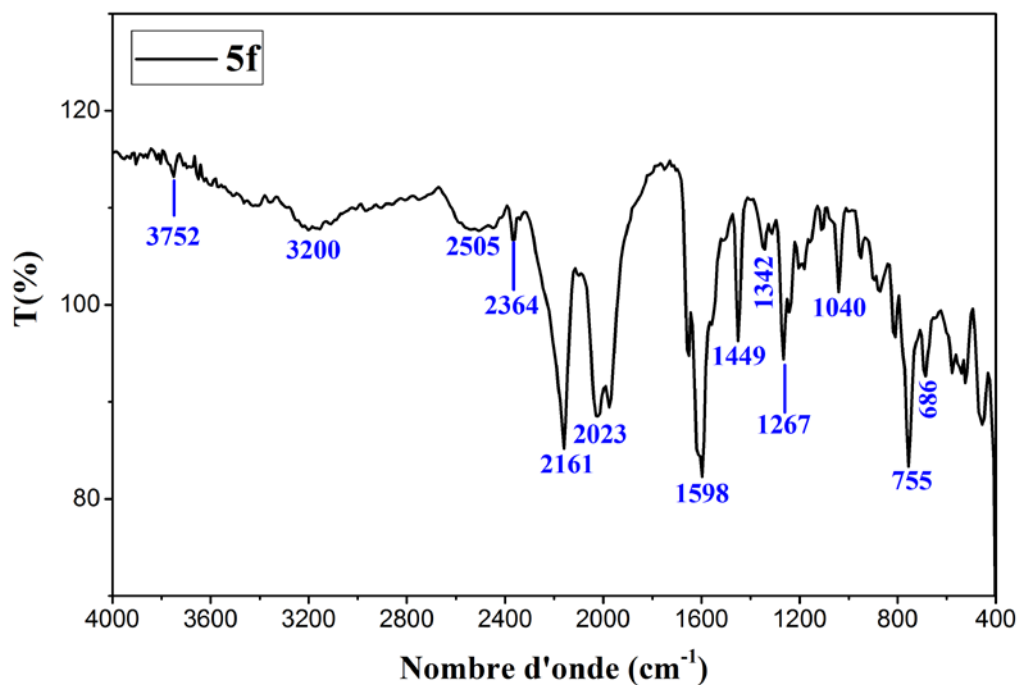


Figure 15 : Spectre IR du composé 5f

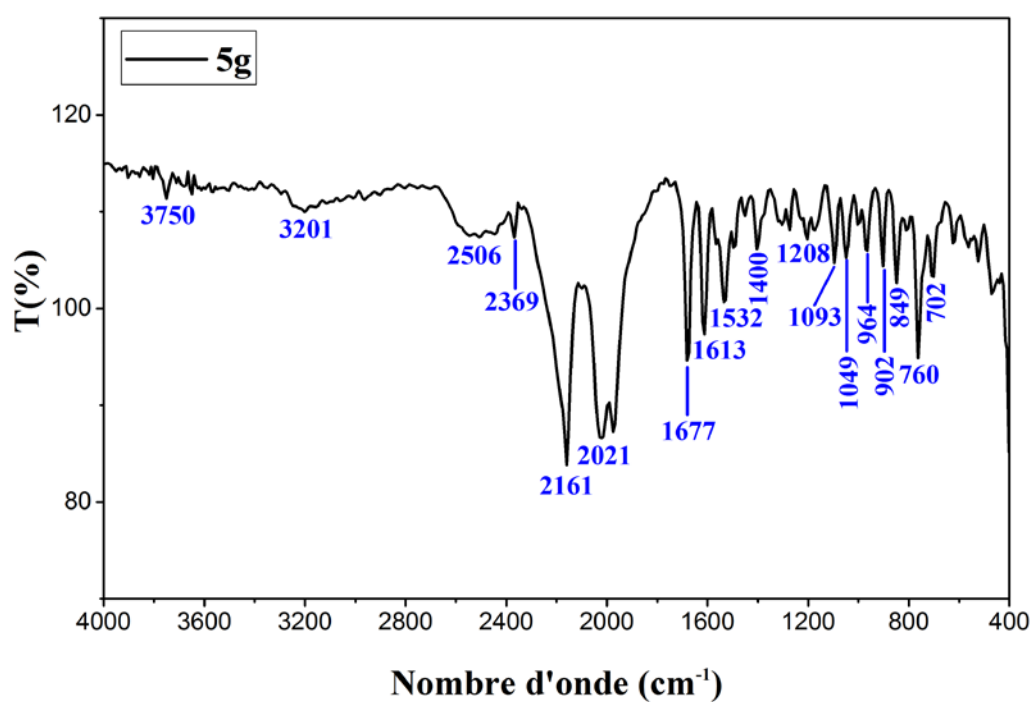


Figure 16 : Spectre IR du composé 5g

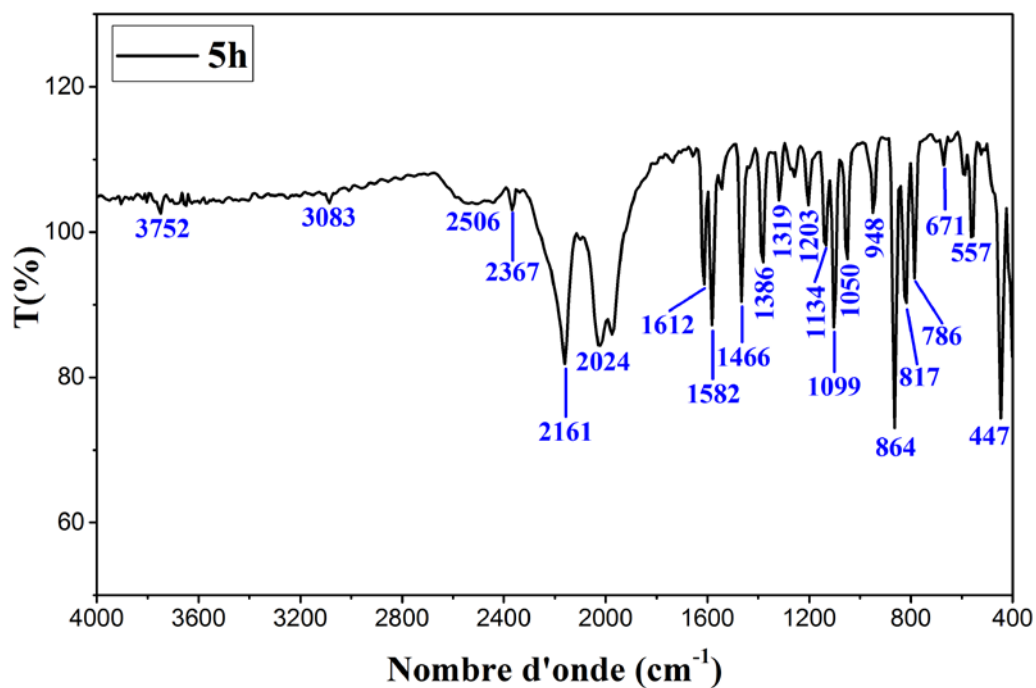


Figure 17 : Spectre IR du composé 5h

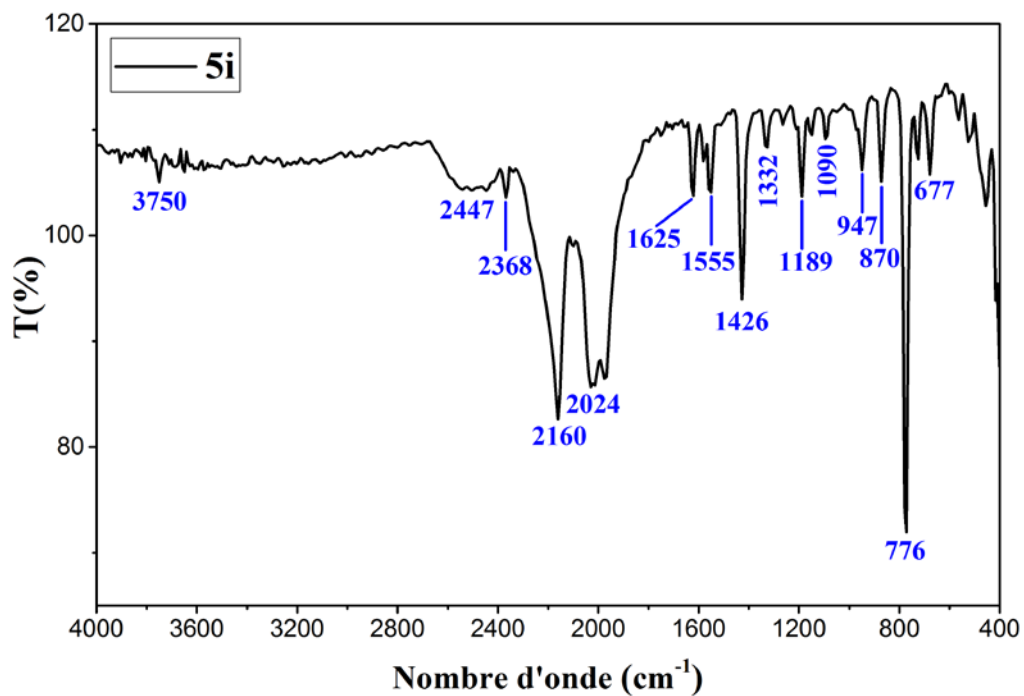


Figure 18 : Spectre IR du composé 5i

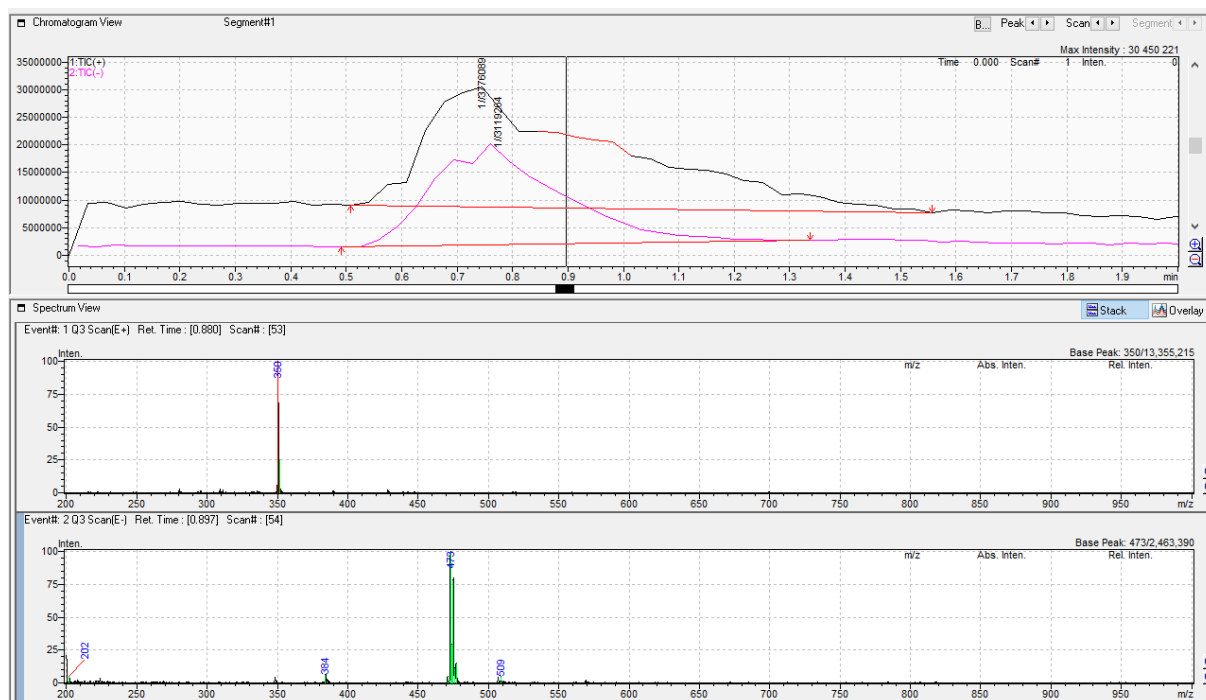


Figure 19 : Spectre de masse ES-MS⁺ du composé 10a

[MS Spectrum] mode (+)

of Peaks 2
 Raw Spectrum [0.880], (scan:[53])
 Background No Background Spectrum
 Base Peak m/z 350.3500 (Inten : 13 355 215)

m/z	Absolute Intensity	Relative Intensity
350.3500	13355215	100.00
351.3500	3423067	25.63

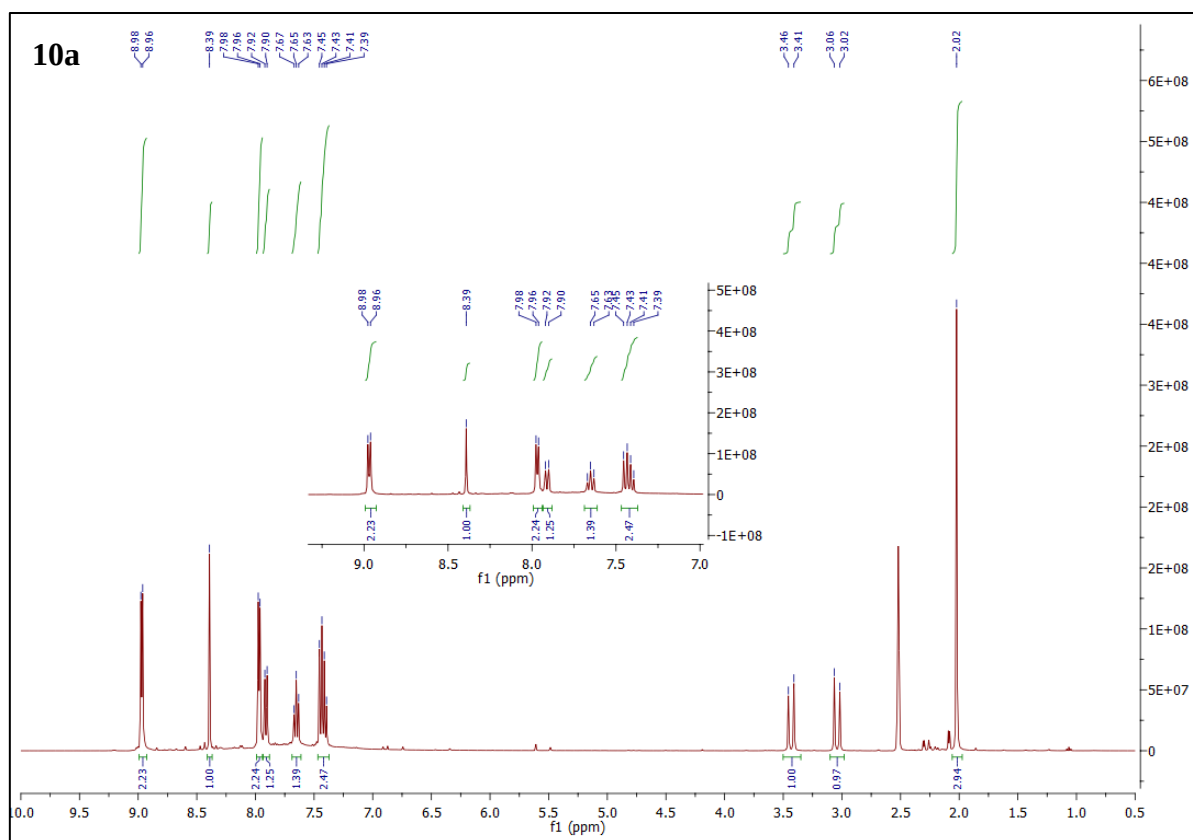
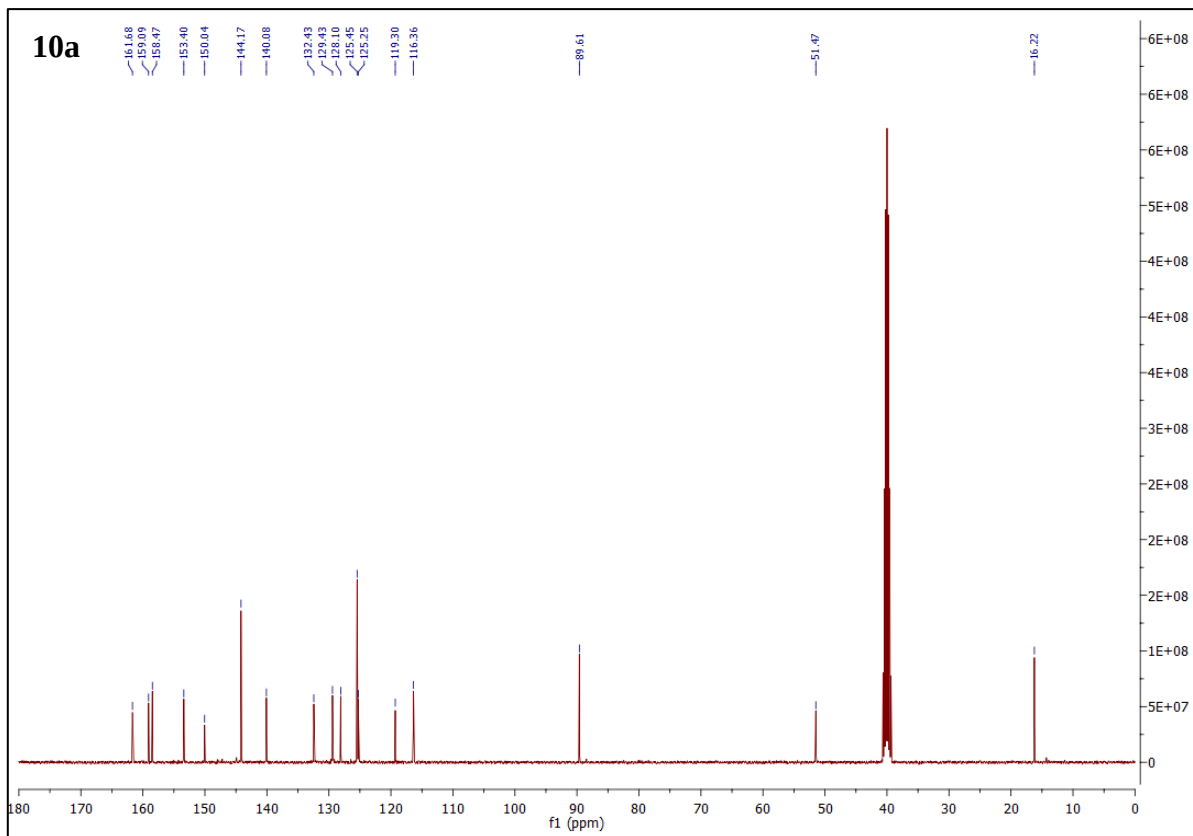
Event 1

[MS Spectrum] Mode (-)

of Peaks 9
 Raw Spectrum [0.897], (scan:[54])
 Background No Background Spectrum

Base Peak	m/z 473.0000 (Inten : 2 463 390)	
m/z	Absolute Intensity	Relative Intensity
201.9000	126344	5.13
384.2000	168643	6.85
471.0500	126767	5.15
473.0000	2463390	100.00
474.0000	721238	29.28
474.9500	1944712	78.94
475.9500	287436	11.67
477.0000	374059	15.18
508.9500	125927	5.11

Event 2

Figure 20 : Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) du composé 10aFigure 21 : Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz) du composé 10a

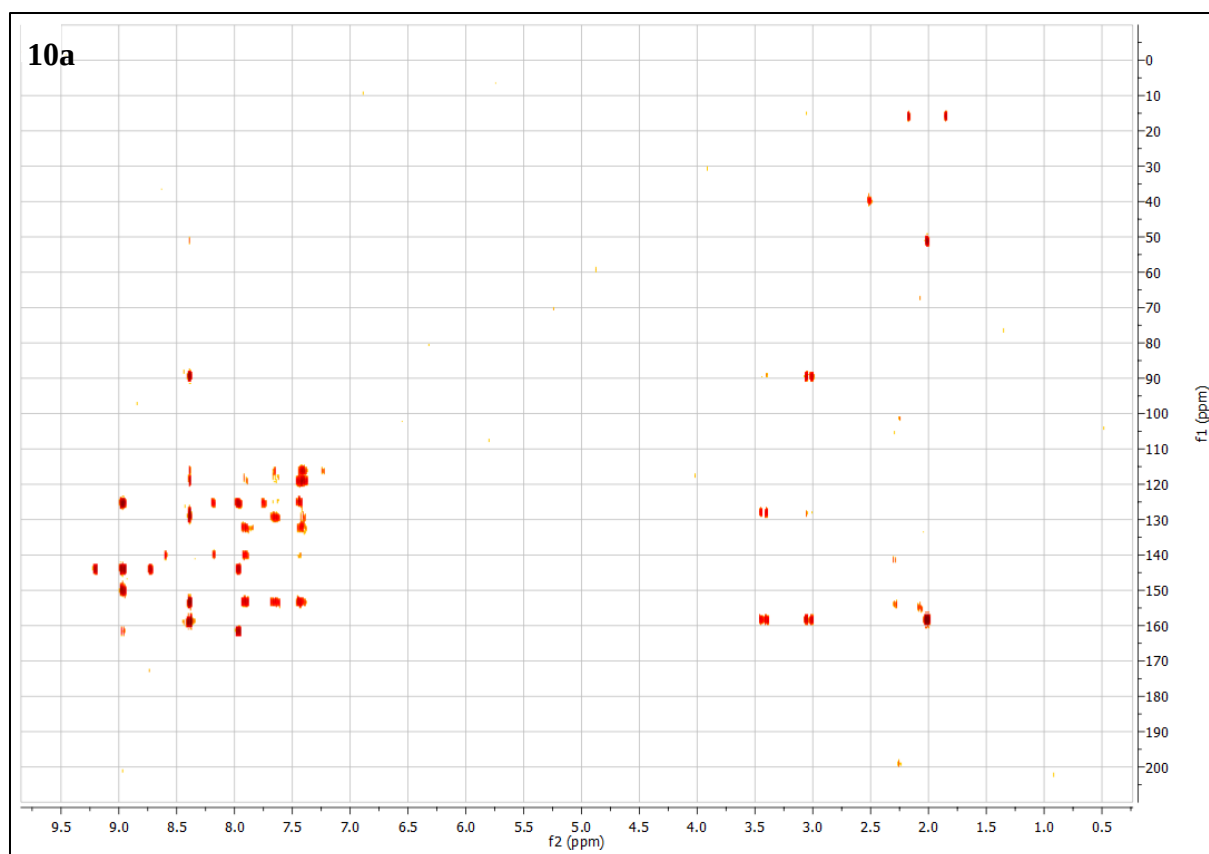


Figure 22 : Spectre HMBC du composé 10a

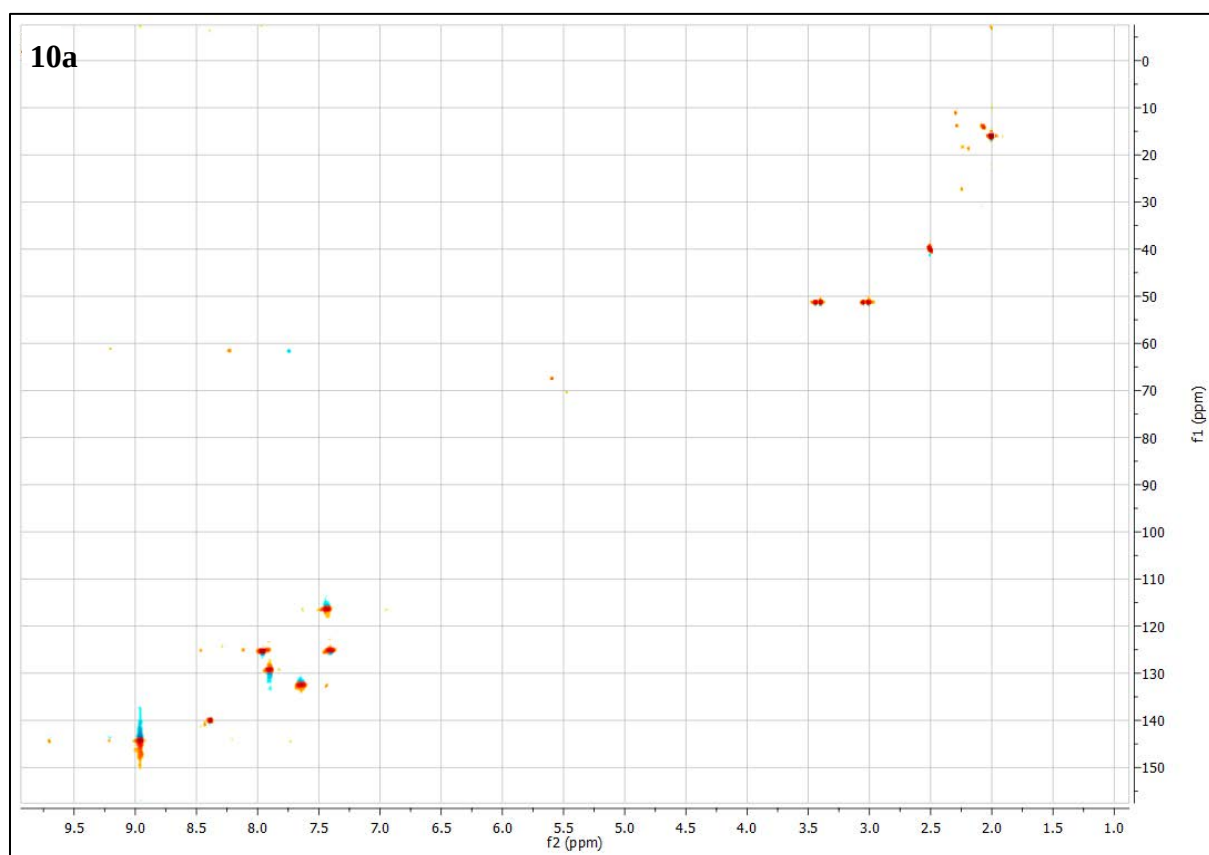


Figure 23 : Spectre HSQC du composé 10a

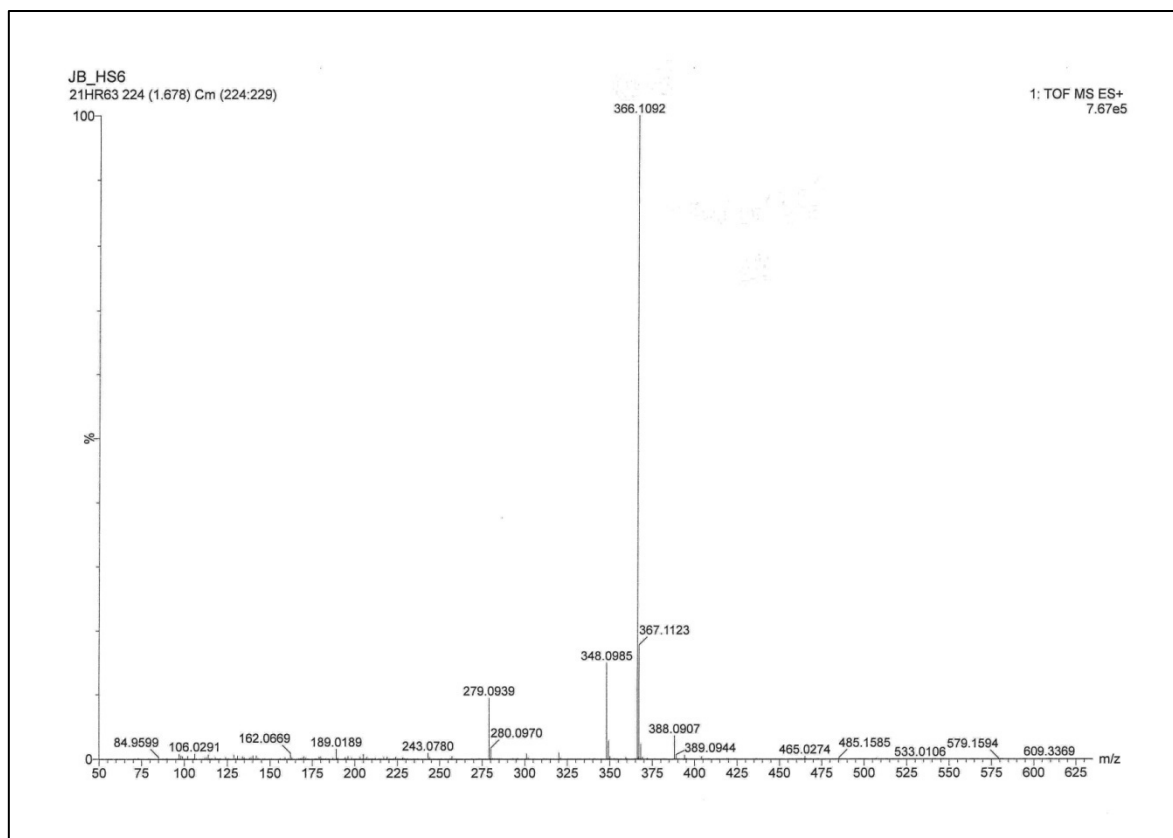
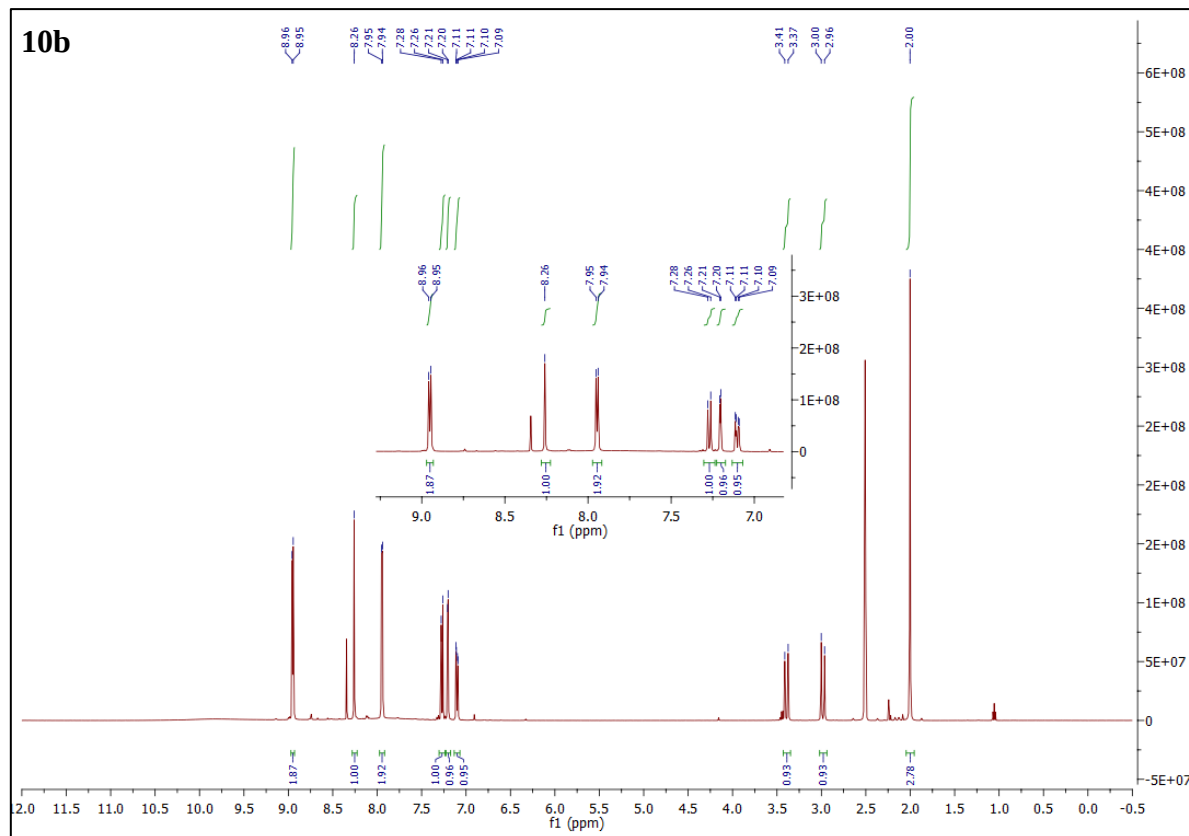


Figure 24 : Spectre de masse MS-ES+ du composé 10b

Figure 25 : Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) du composé 10b

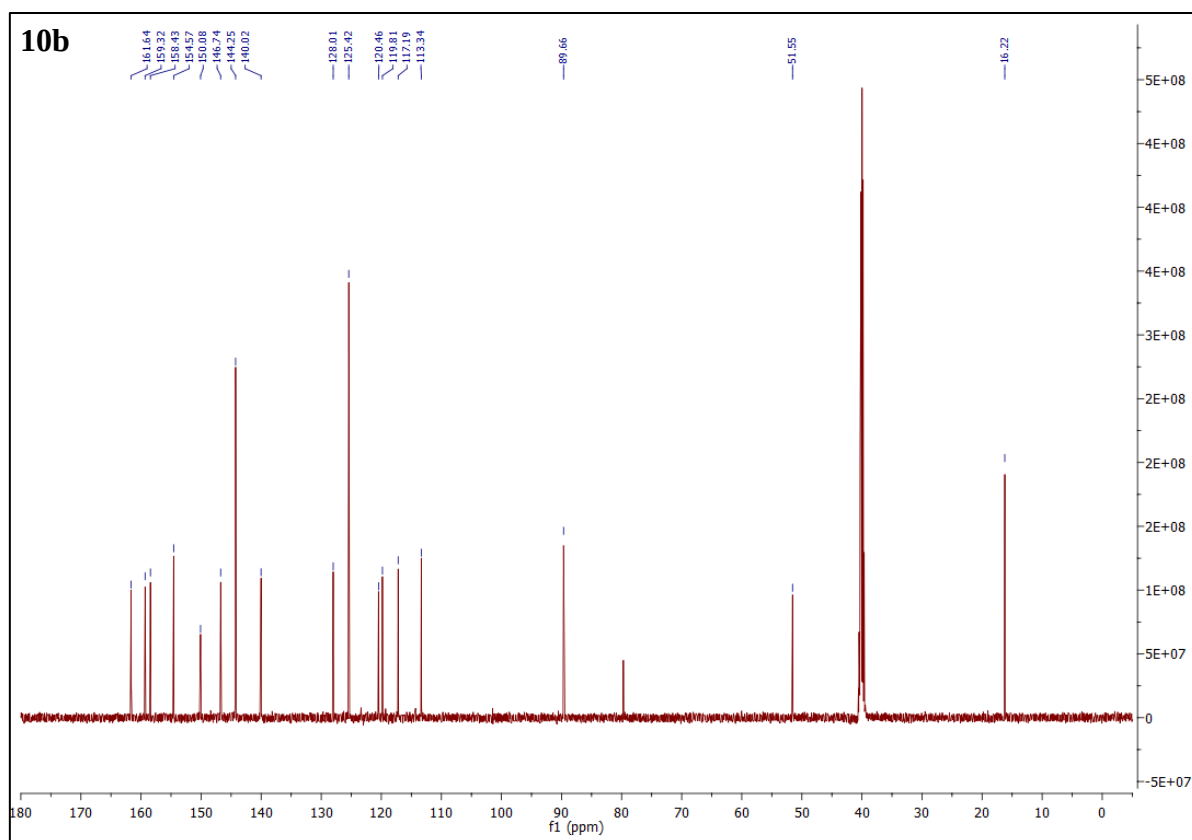


Figure 26 : Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) du composé 10b

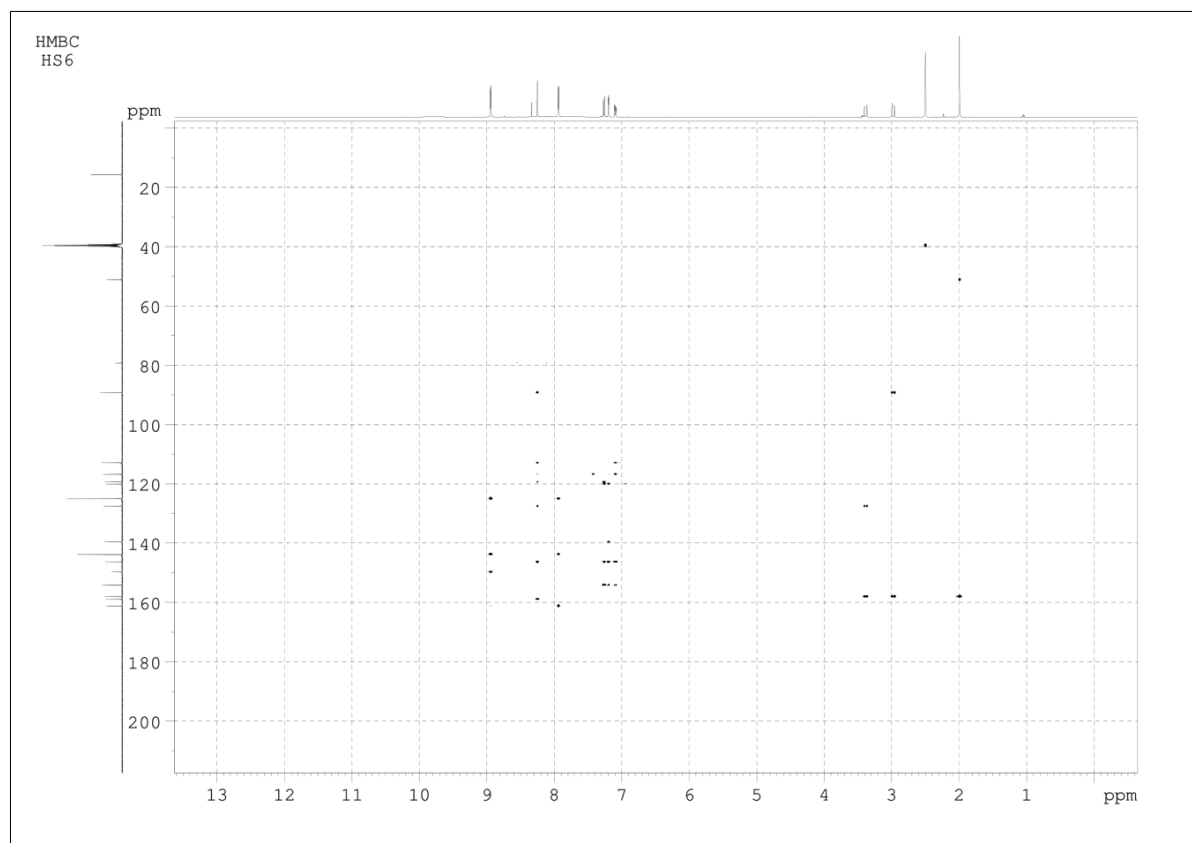
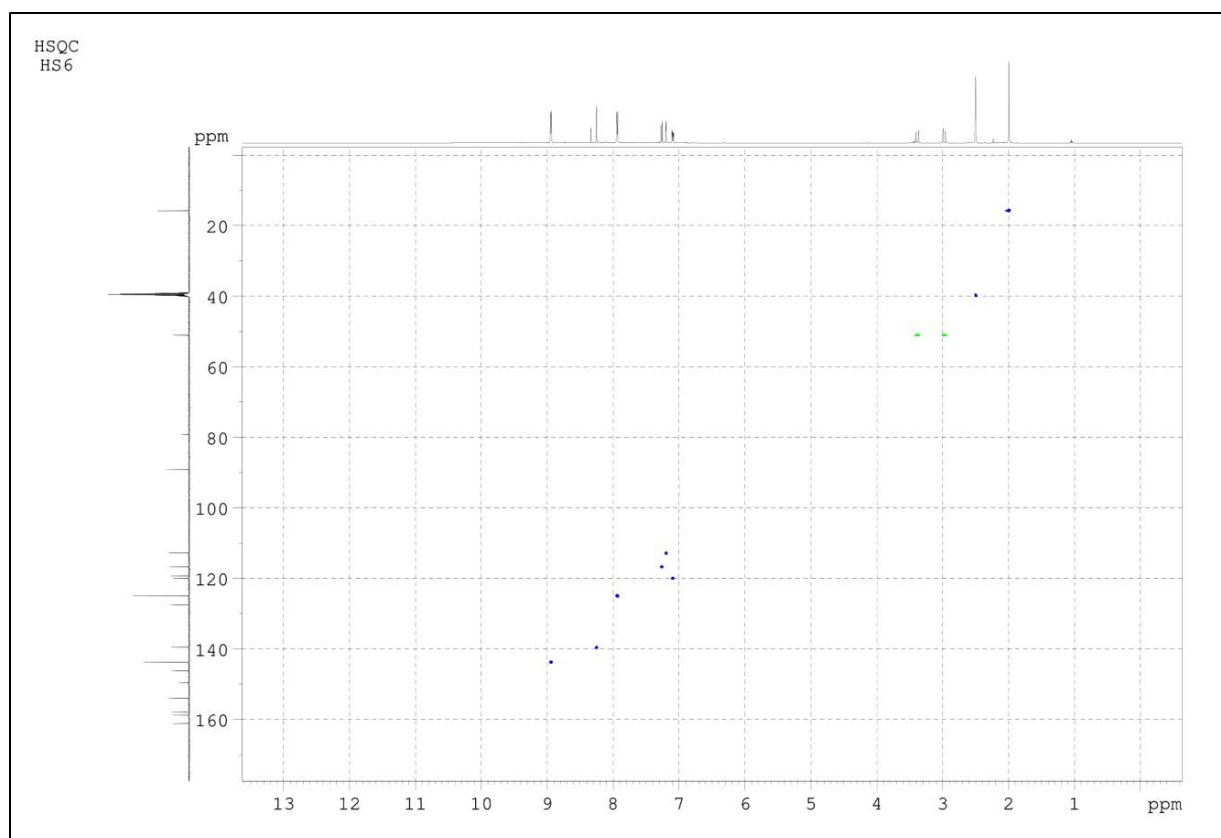
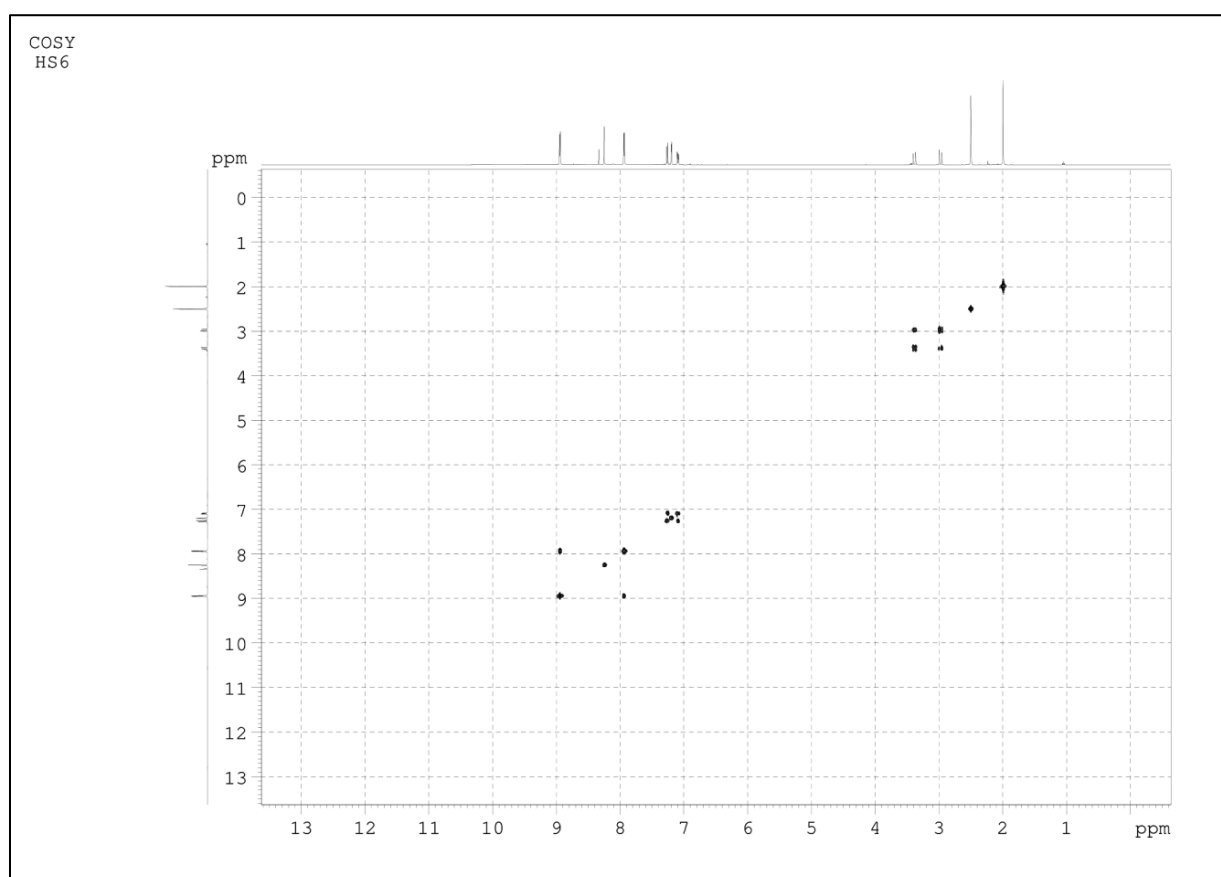


Figure 27 : Spectre HMBC du composé 10b

**Figure 28 : Spectre HSQC du composé 10b****Figure 29 : Spectre COSY du composé 10b**

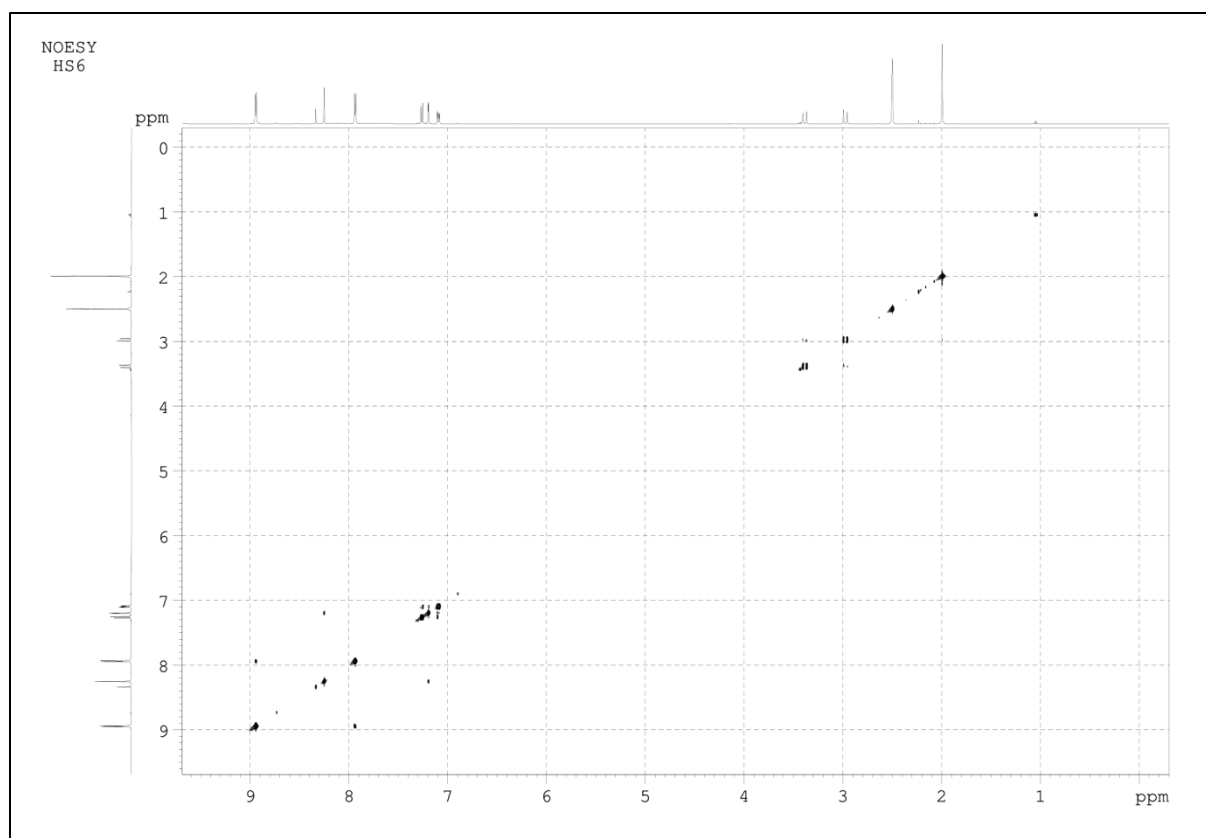


Figure 30 : Spectre NOESY du composé 10b

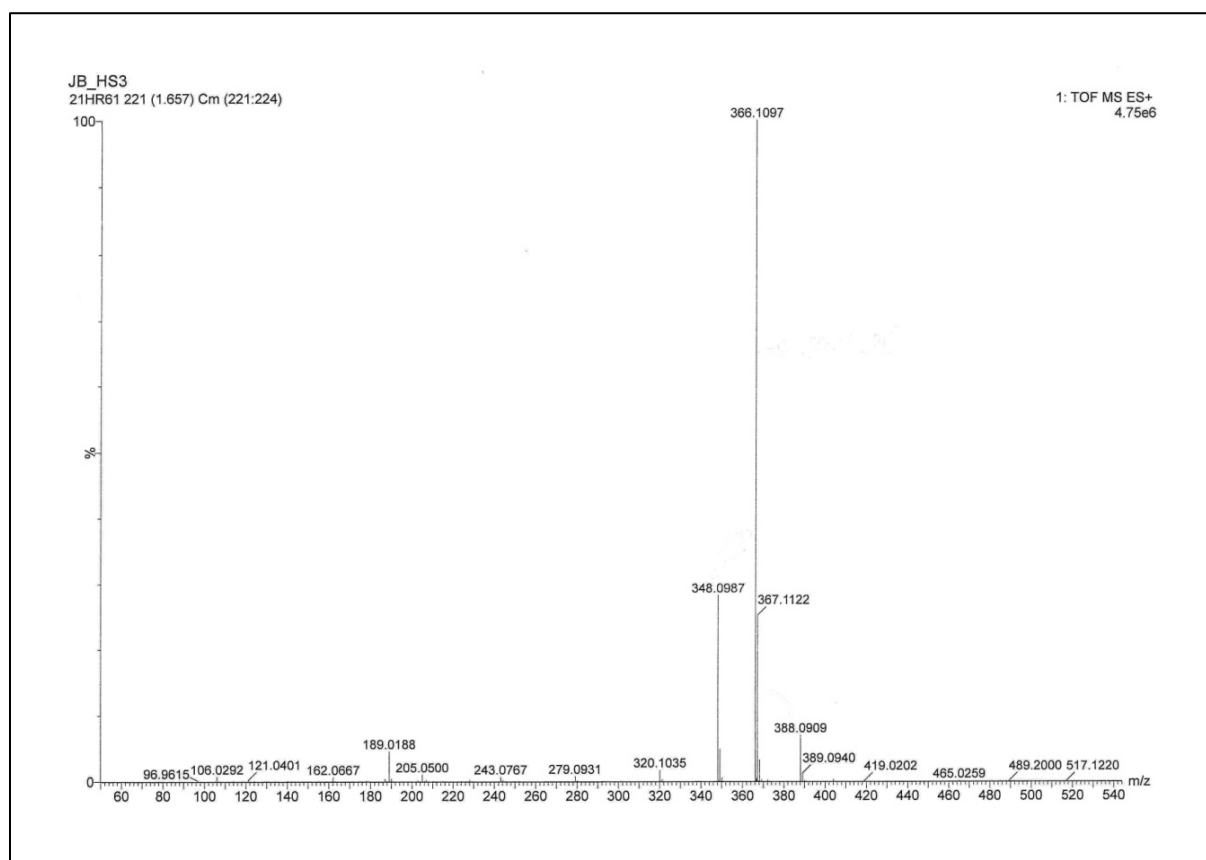
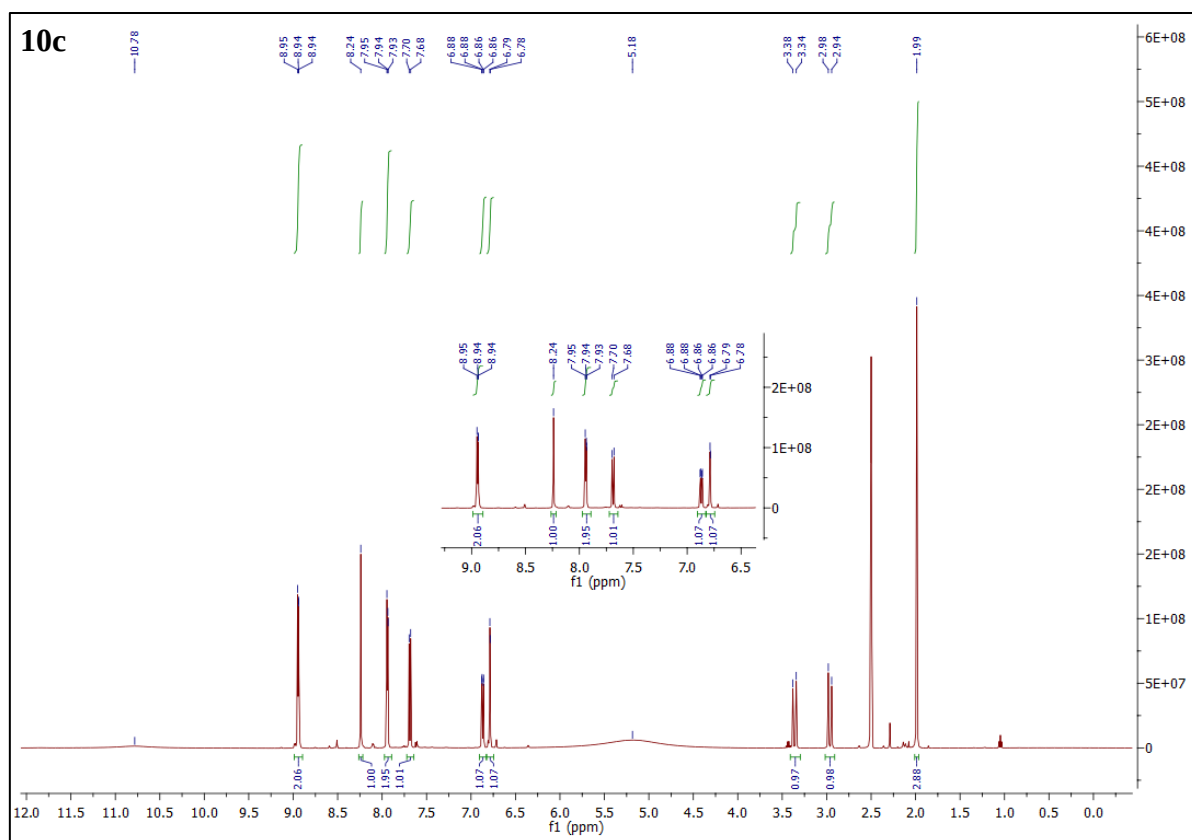
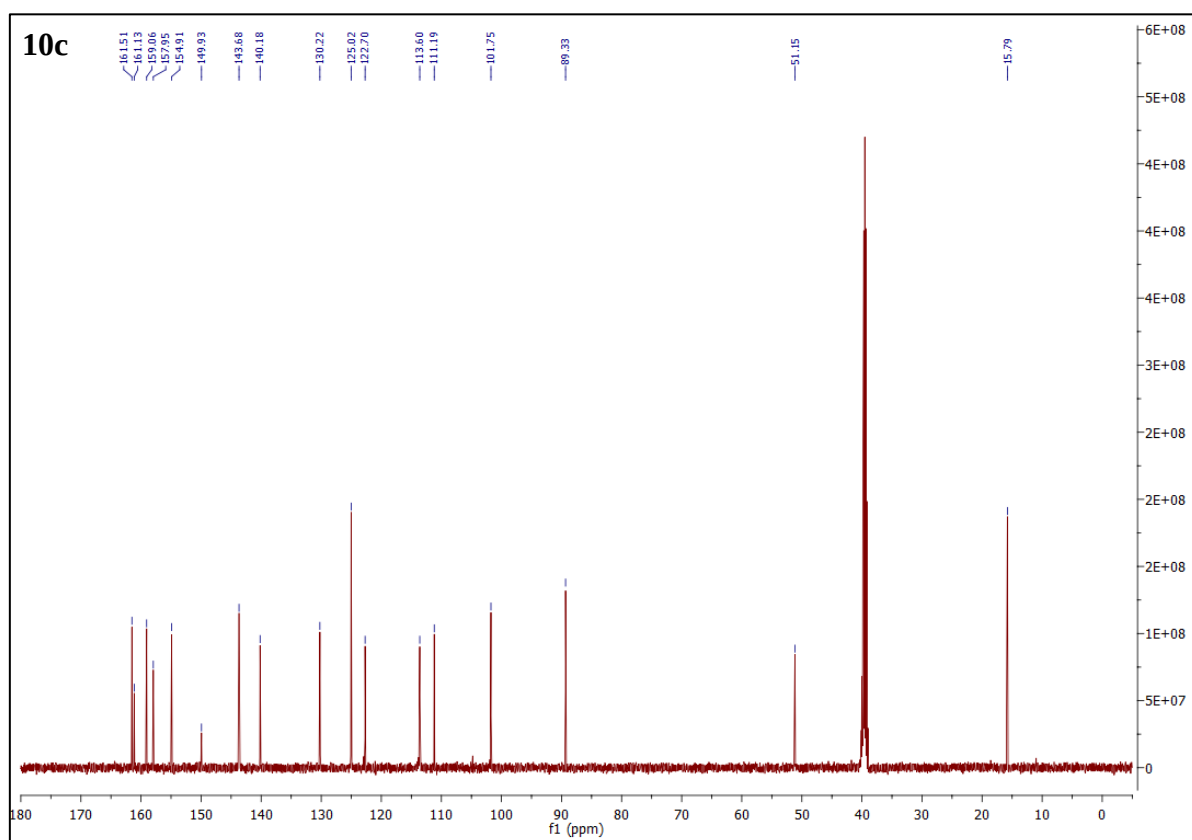


Figure 31 : Spectre de masse MS-ES+ du composé 10c

Figure 32 : Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) du composé 10cFigure 33 : Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) du composé 10c

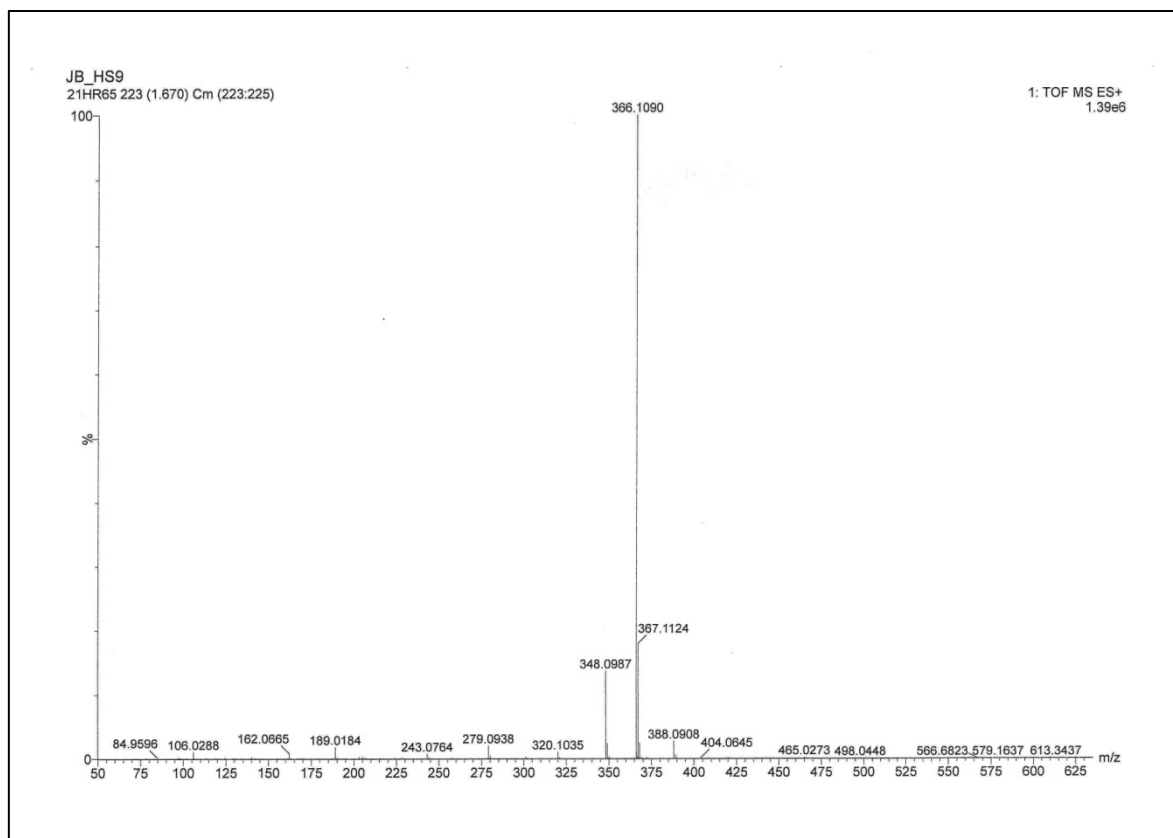
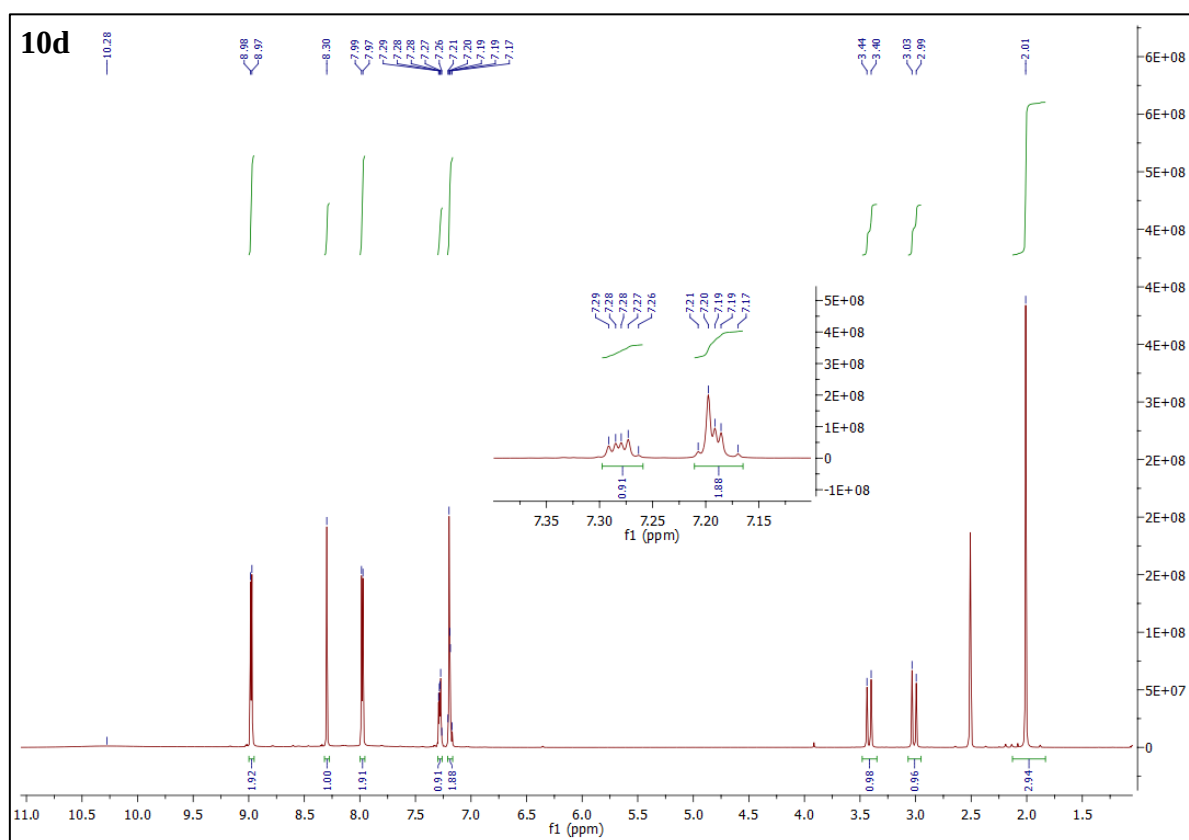


Figure 34 : Spectre de masse MS-ES+ du composé 10d

Figure 35 : Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) du composé 10d

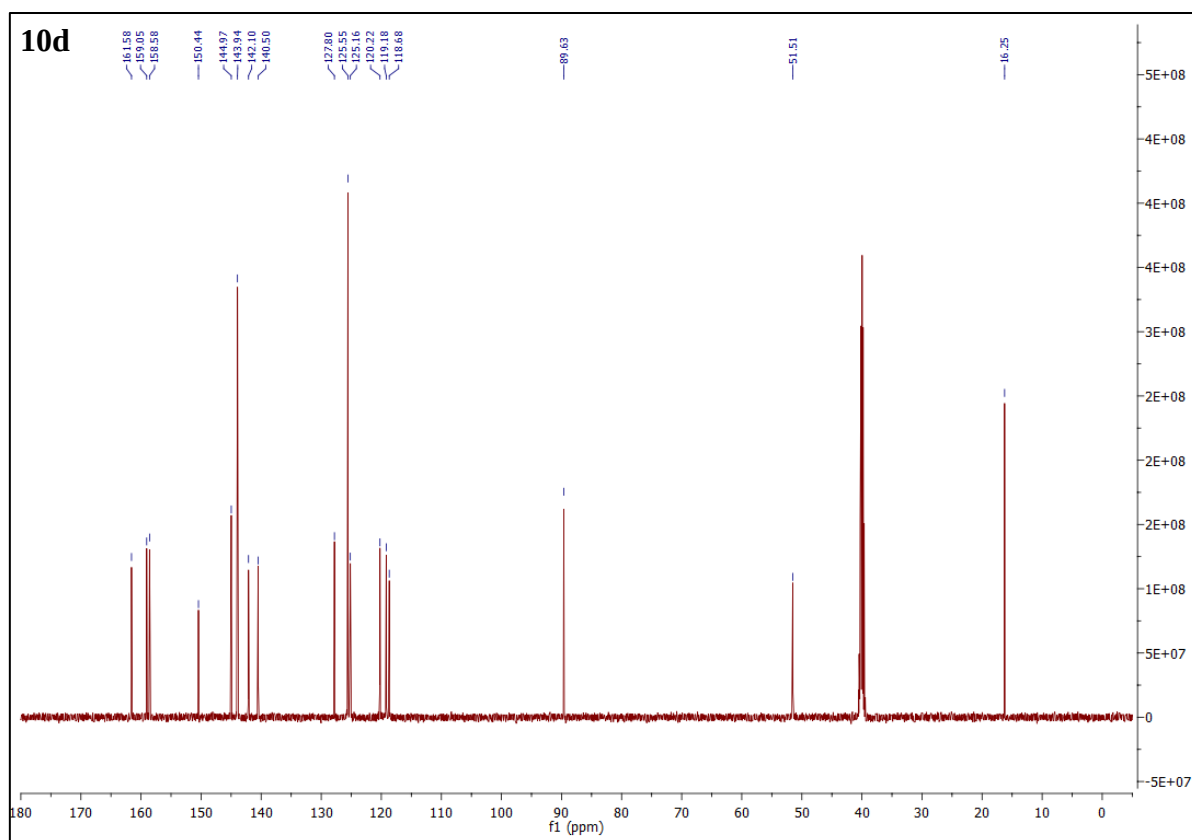


Figure 36 : Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) du composé 10d

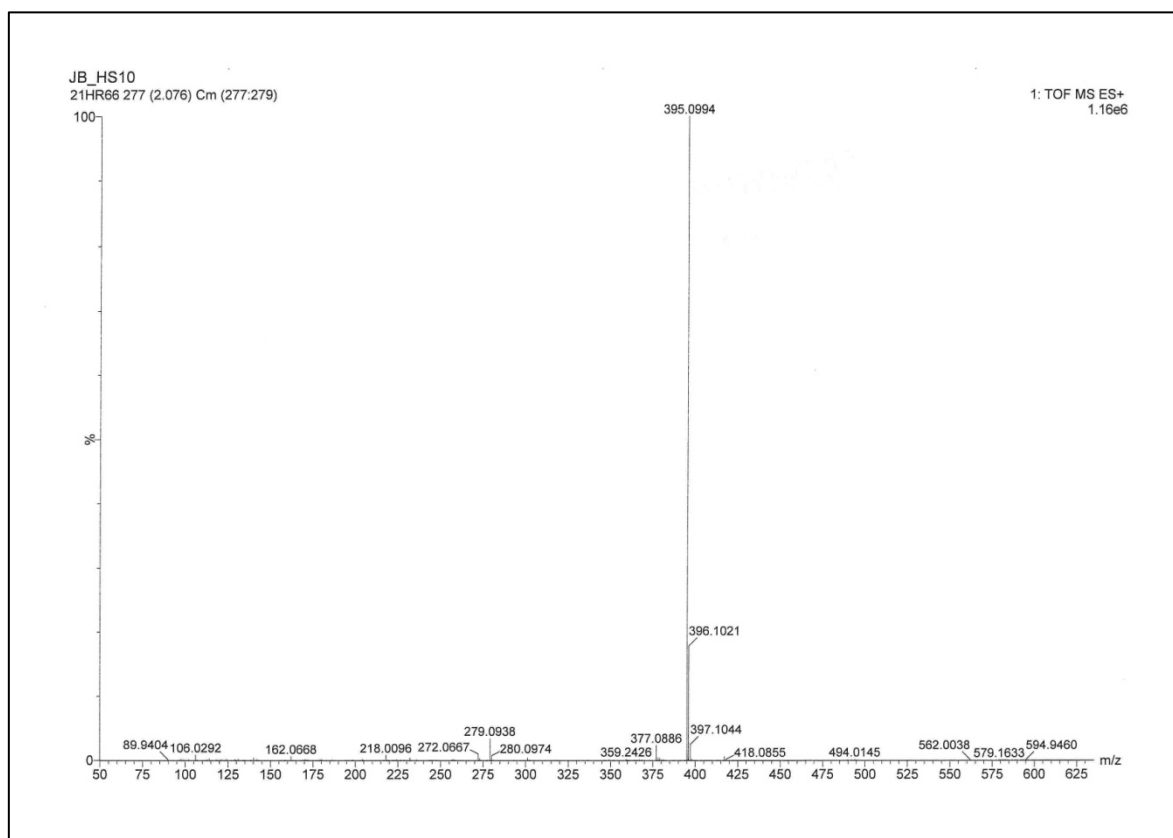
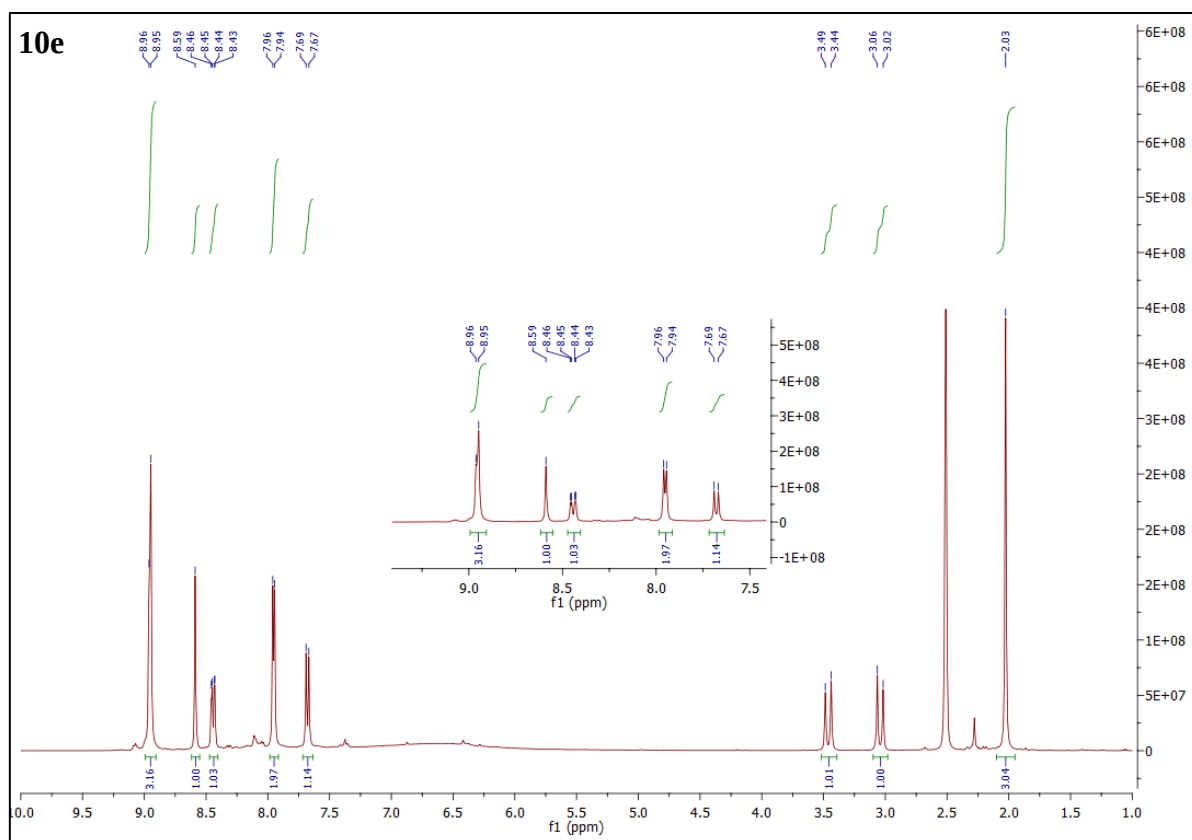
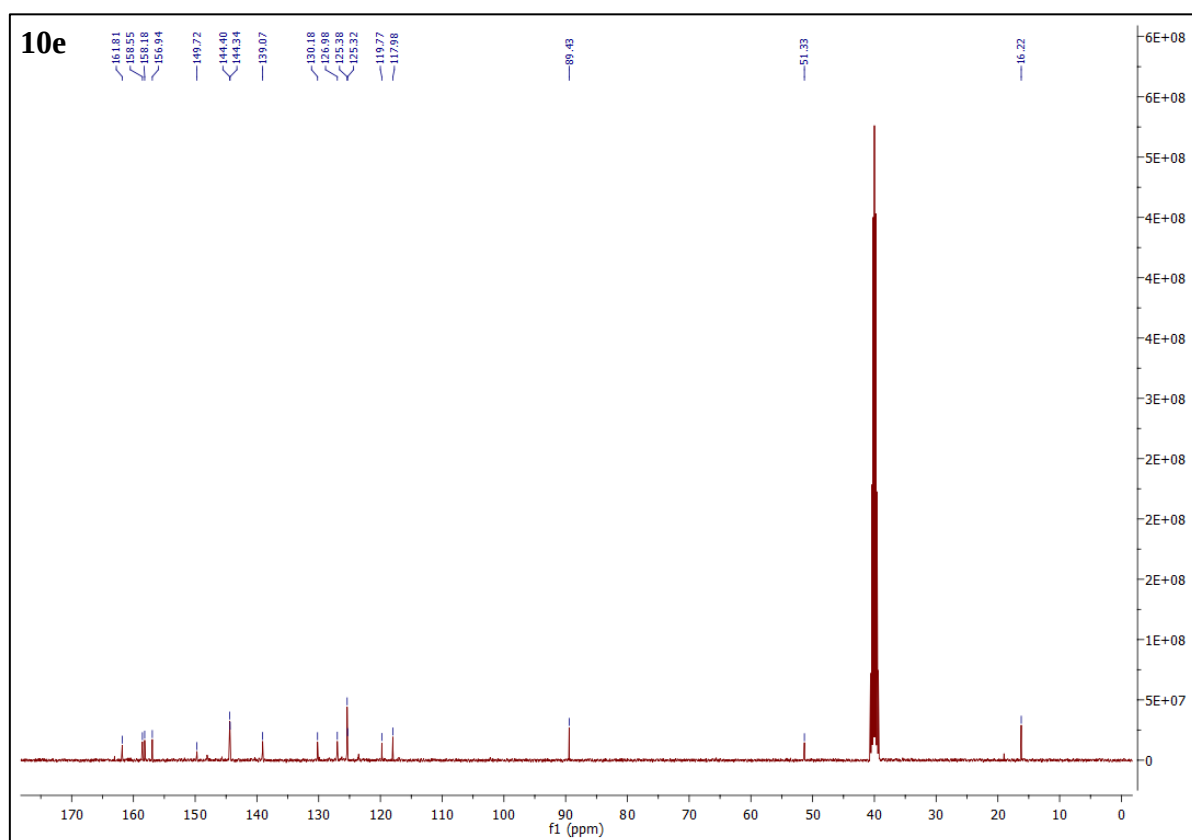


Figure 37 : Spectre de masse MS-ES+ du composé 10e

Figure 38 : Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) du composé 10eFigure 39 : Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 101 MHz) du composé 10e

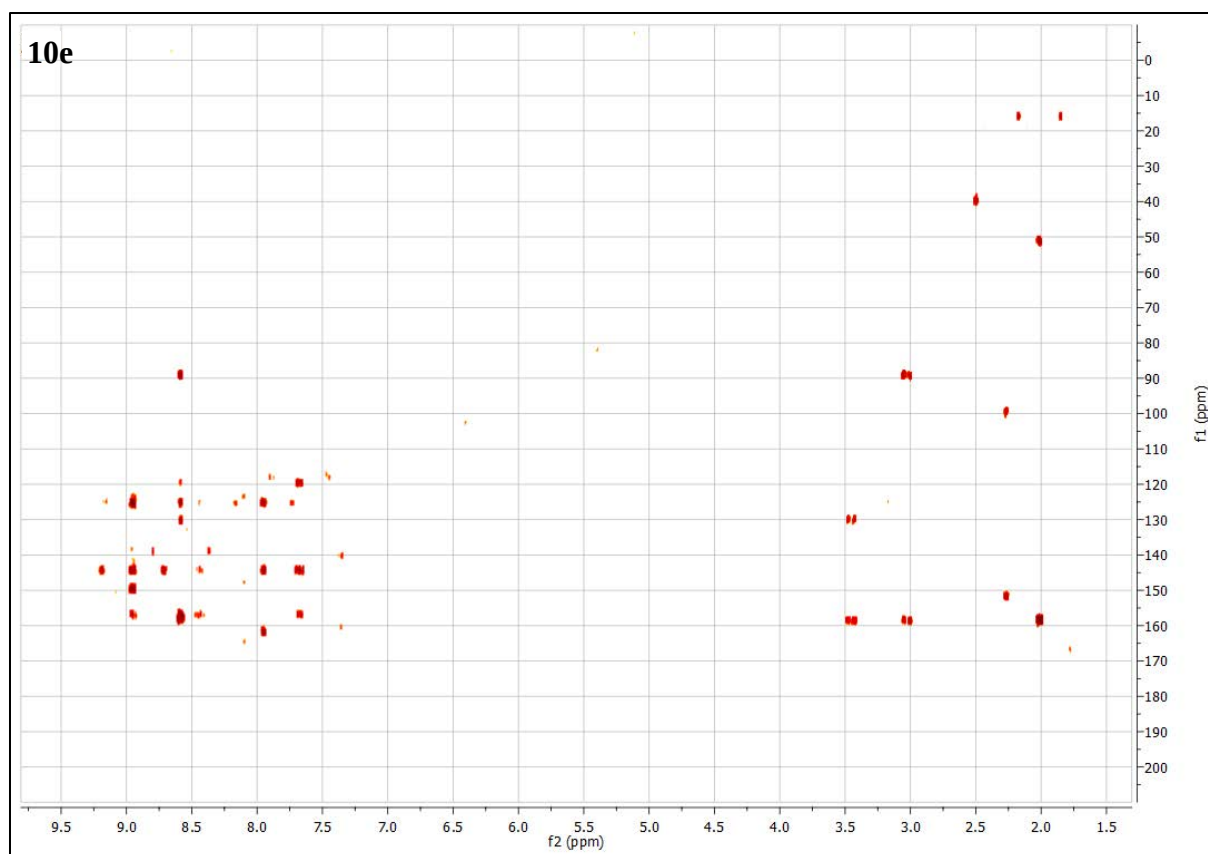


Figure 40 : Spectre HMBC du composé 10e

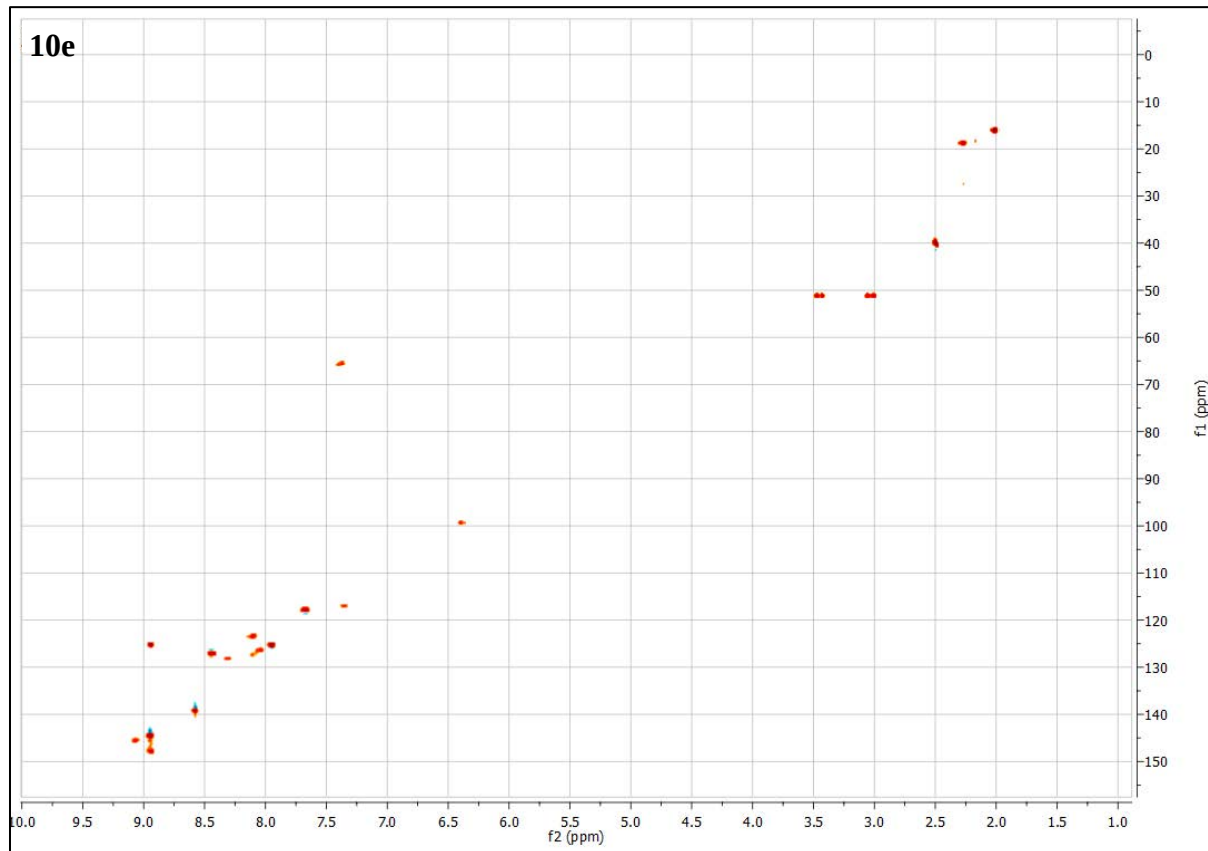


Figure 41 : Spectre HSQC du composé 10e

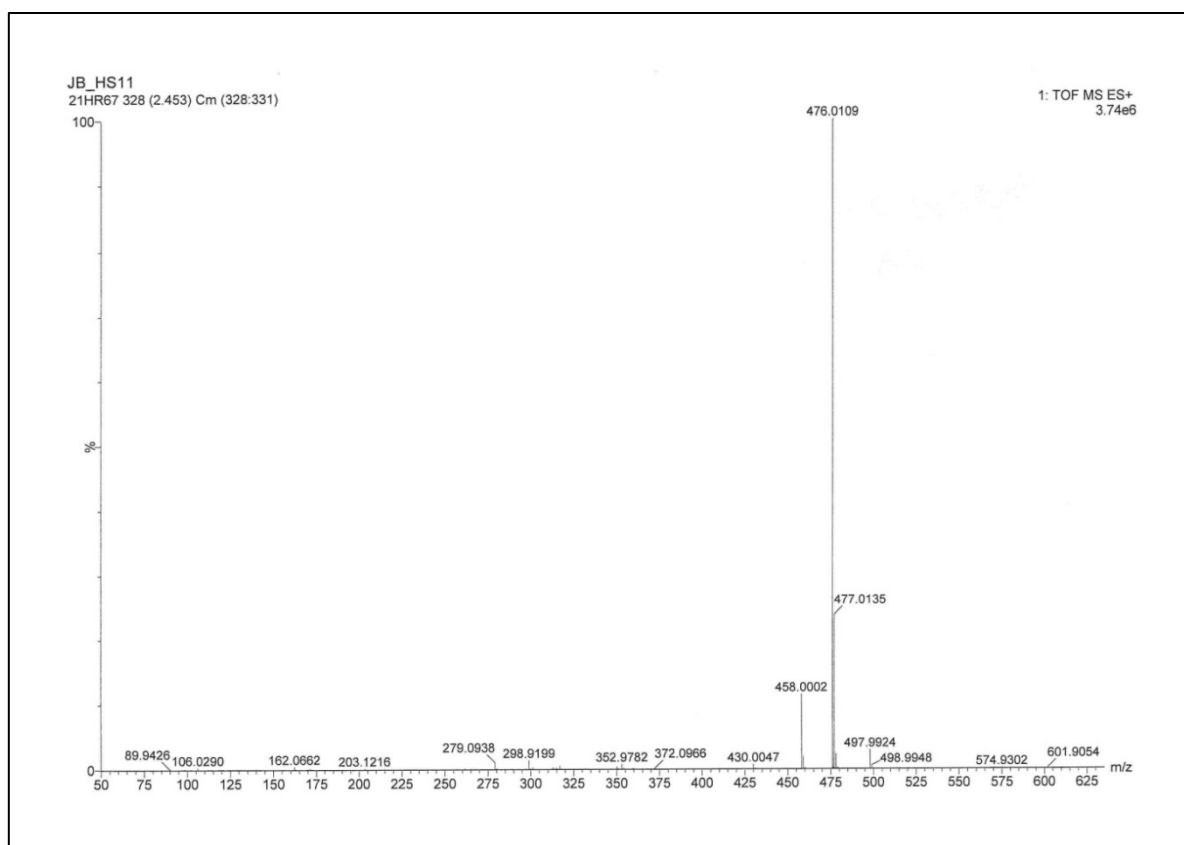
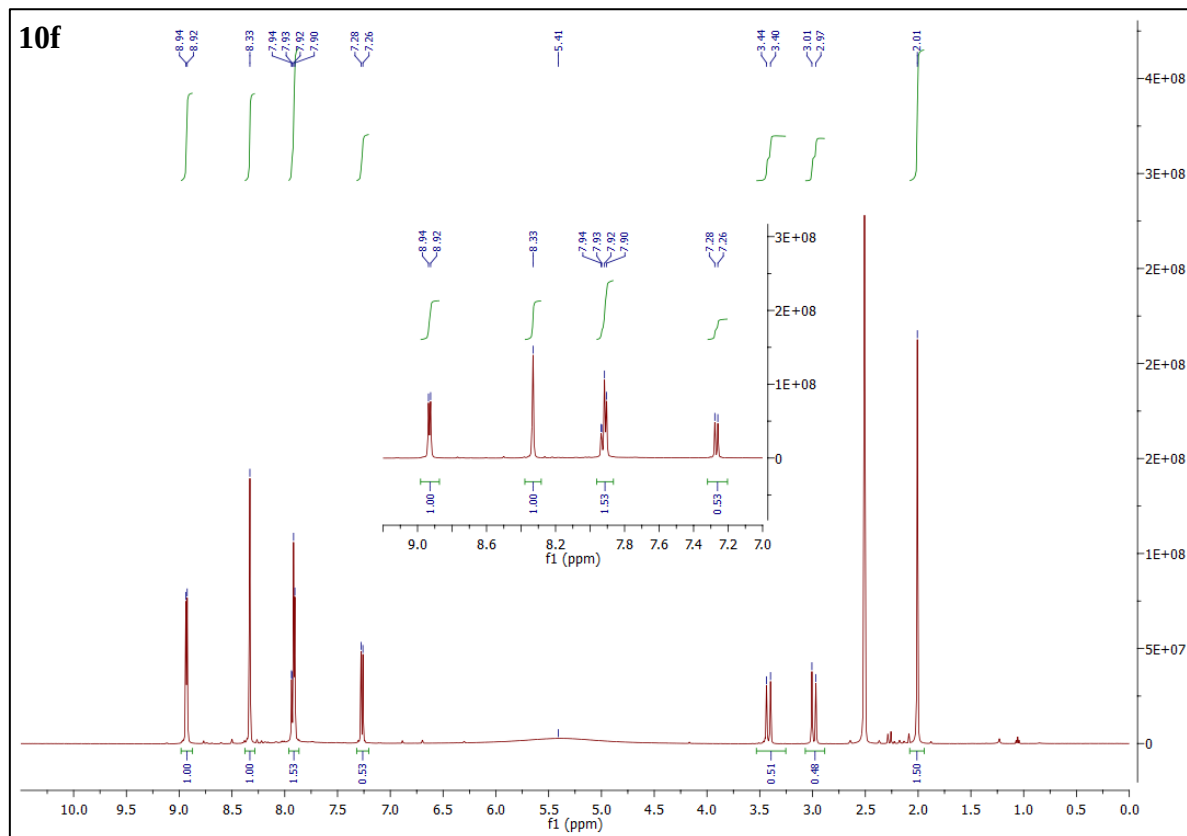


Figure 42 : Spectre de masse MS-ES+ du composé 10f

Figure 43 : Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz) du composé 10f

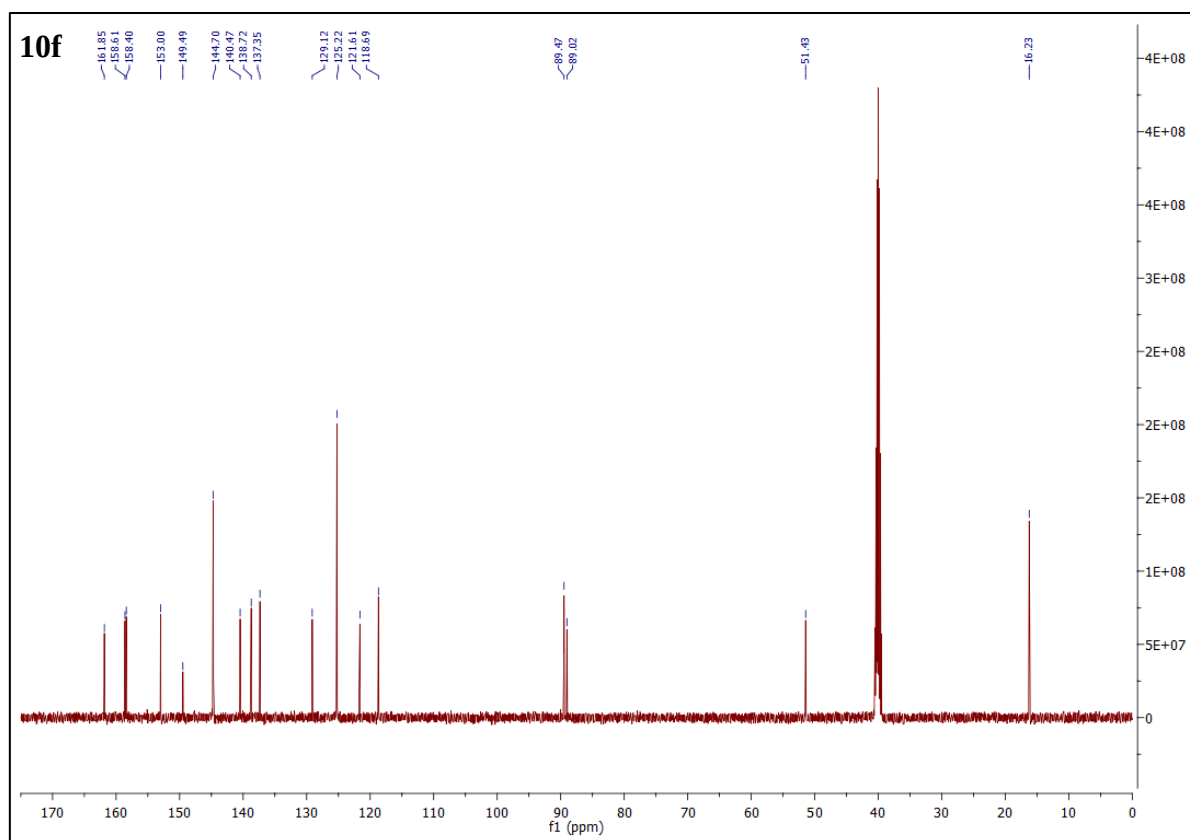


Figure 44 : Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) du composé 10f

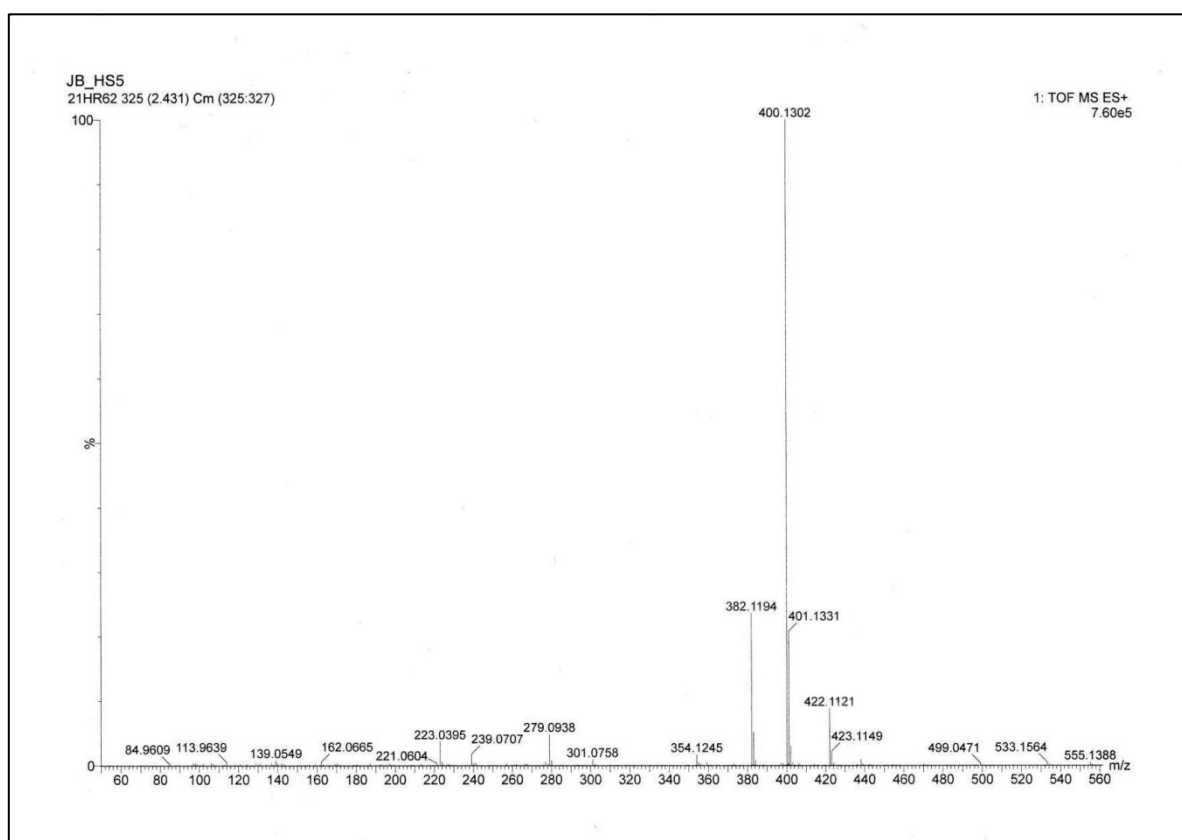


Figure 45 : Spectre de masse MS-ES+ du composé 10g



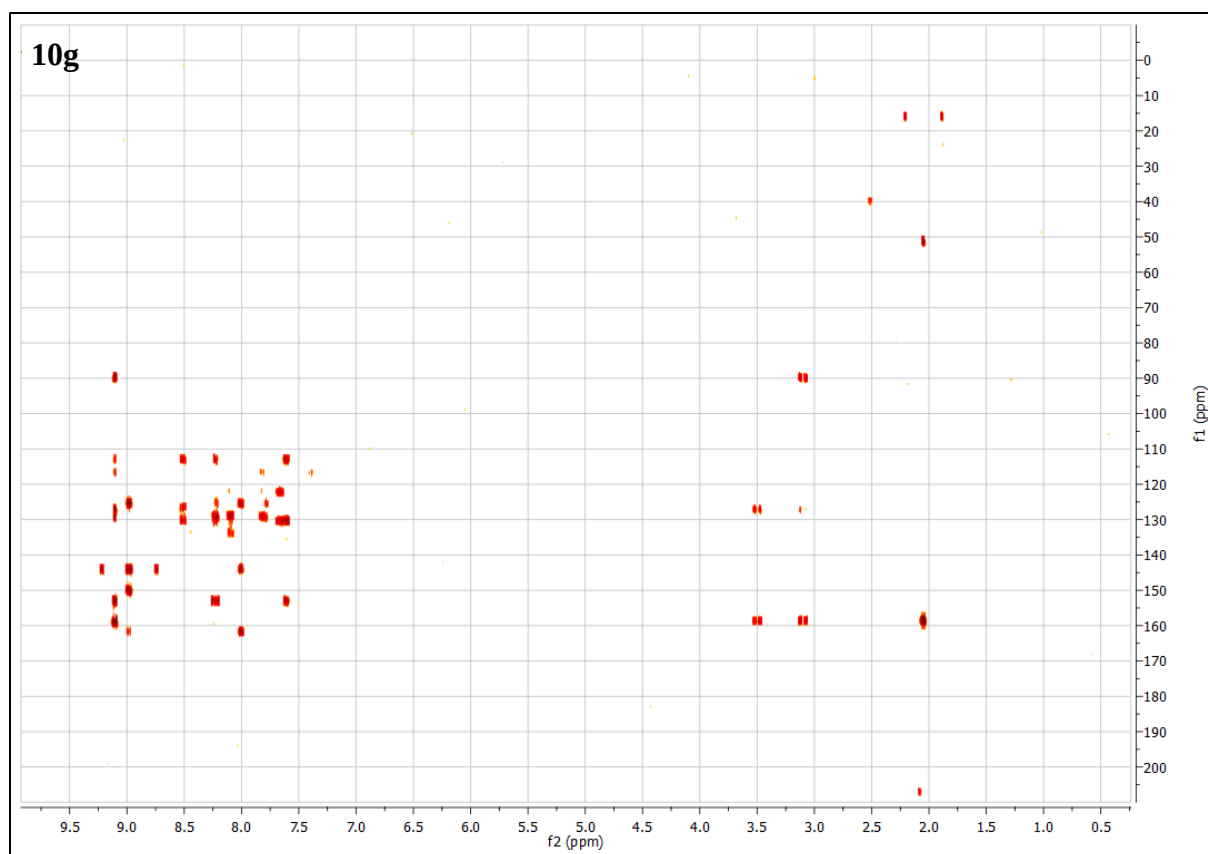


Figure 48 : Spectre HMBC du composé 10g

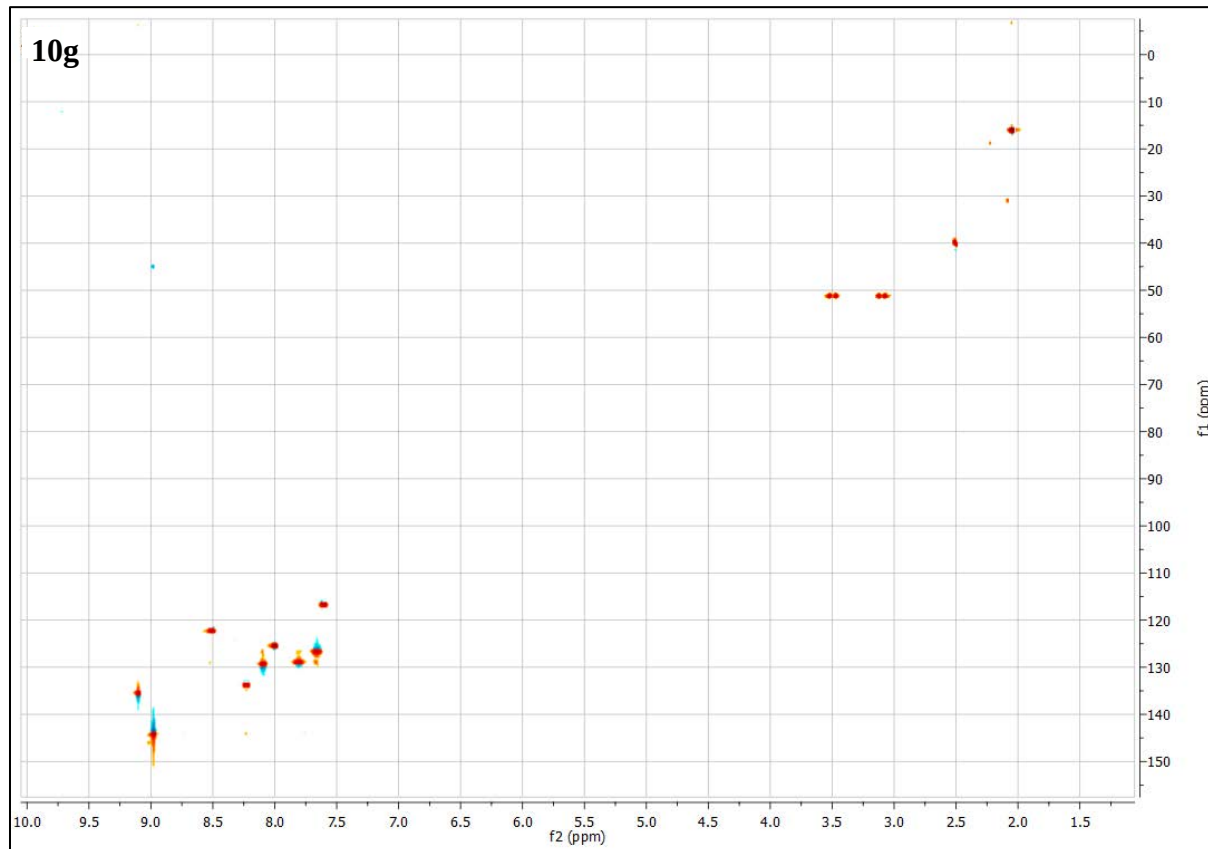


Figure 49 : Spectre HSQC du composé 10g

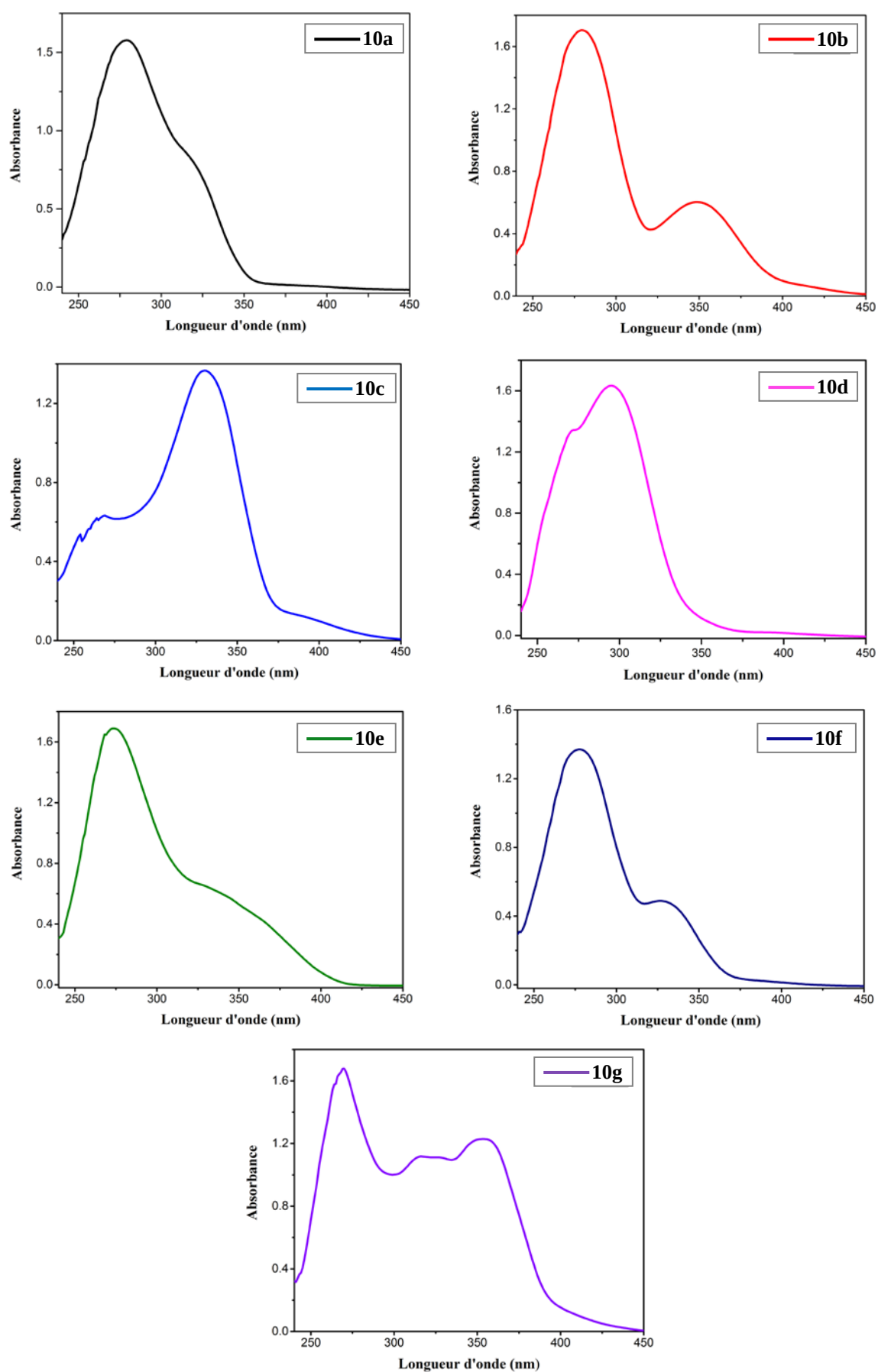


Figure 50 : Spectres d'absorption UV-Vis des composés 10a-g dans le DMSO à 10^{-5} M

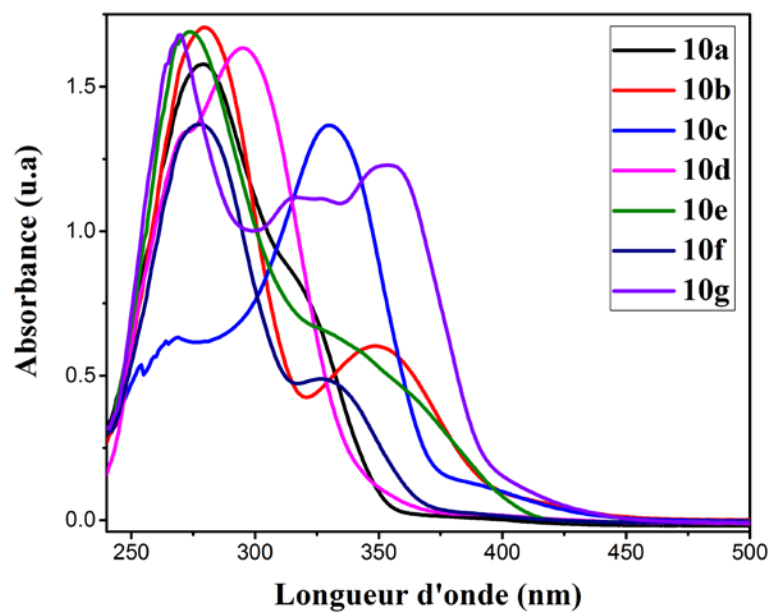
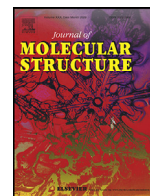


Figure 51 : Superposition des spectres d'absorption UV-Vis des composés 10a-g



Sodium dodecyl benzene sulfonate-catalyzed reaction for green synthesis of biologically active benzylpyrazolyl-coumarin derivatives, mechanism studies, theoretical calculations

Sabrina Halit^a, Amina Benazzouz-Touami^a, Malika Makhoulfi-Chebli^{a,*},
Souhila Terrachet Bouaziz^{b,c}, Karima Ighil Ahriz^a

^a Laboratoire LPCM, Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Mouloud Mammeri, TiziOuzou 15000, Algeria

^b Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University Mohamed Bouguerra, Boumerdes, Algeria

^c Laboratoire de Physico-Chimie Théorique et de Chimie Informatique, Faculté de Chimie, USTHB, BP 32 El Alia, 16111 Bab-Ezzouar, Alger, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2022

Revised 11 March 2022

Accepted 21 March 2022

Available online 23 March 2022

Keywords:

Sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS)

Benzylpyrazolylcoumarin

Multicomponent reaction

Antioxidant activity

Antifungal activity

ABSTRACT

In the present work, a multicomponent protocol has been described for the synthesis of various benzylpyrazolyl-coumarin **5a-i** structures, involving the reaction of 4-hydroxycoumarin, ethyl acetoacetate, hydrazine hydrate, and aldehydes, using an ethanol-water (1:1) mixture as the reaction medium and sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS) as the catalyst. This new approach has advantages such as short reaction time, recovery of the catalysts after the catalytic reaction and their reuse without loss of activity, as well as the lightening of the process. The structures of the obtained benzylpyrazolylcoumarins were determined and confirmed by melting point, ¹H NMR and ¹³C NMR. The determination of antioxidant activity of the obtained benzylpyrazolylcoumarin **5a-i** derivatives was studied using the DPPH scavenging assay. Molecular modeling studies using DFT (density function theory) calculations showed that there are six tautomeric structures **A** to **F** in which structure **C** is more stable than the others.

© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The discovery of new reactions, which are able to form multiple bonds in a single step, with good yields, while being environmentally friendly, has become an important challenge for the organic chemist. Thus, multi-component reactions (MCR) [1], which meet these criteria, play an innovative role and are the object of particular attention in combinatorial chemistry allowing the elaboration of complex structures with interesting biological aspects from simple and easily available raw materials. Most of these reactions require organic solvents as the reaction medium; although current environmental concerns dictate the use of water as a solvent [2], organic solvents are still used due to the limited solubility of most organic compounds in water. It has recently been shown that incorporating surfactants into aqueous mixtures can enhance the reactivity of water-mediated reactions via the formation of colloidal particles. The use of surfactant catalysts in organic reactions has been of particular interest and has been studied in a number of synthetic multicomponent transformations in water, as they have a dual function: both as a catalyst to activate reactive molecules

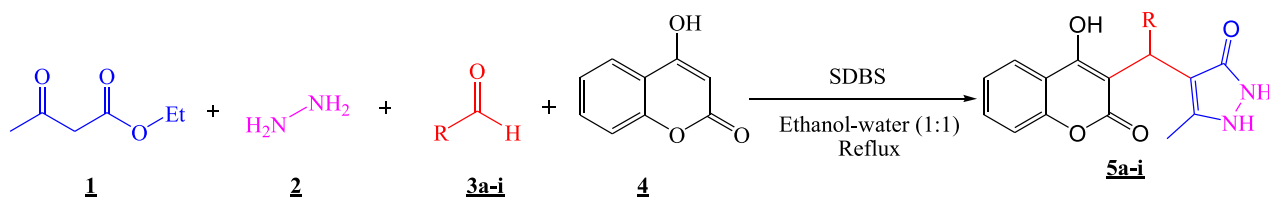
and as a surfactant to form micellar aggregates to increase the reaction rate or improve the regio- and chemio-selectivity of the reaction [3]. In addition, at the end of the reaction, the surfactants are removed by water without using any organic solvent [4].

On the other hands, heterocycles possessing a C–N and C–C bonds, have attracted wide attention in medicinal chemistry due to their broad spectrums of pharmacological and biological activities. Therefore, in recent times, many efforts have been made for the preparation of this class of heterocycles [5–9].

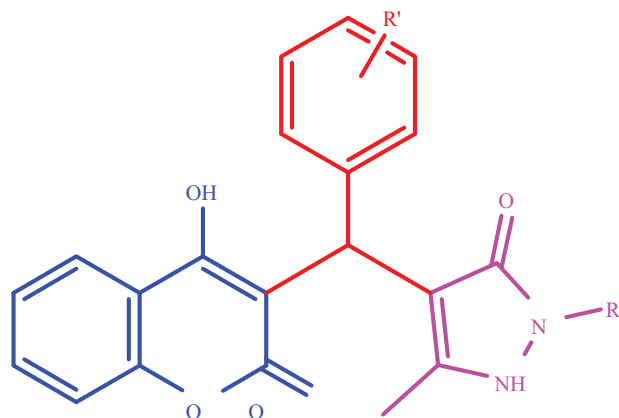
Benzylcoumarin and pyrazolone derivatives are widely distributed in nature and exhibit various biological properties [10–16]. Considering their interesting properties and structural features, the fusion of the two moieties 3-benzylcoumarin and pyrazolone leading to the molecule benzylpyrazolyl-coumarin is expected to be more biologically attractive. The development of a general protocol for multicomponent reactions using a green catalyst leading to the benzylpyrazolyl-coumarin compound has already been the subject of some work using various catalysts such as acetic acid [17], ZrO₂ nanoparticles [18], catalyst (Ca²⁺) [19] and recently with the Fe₃O₄@SiO₂@PTS-DABA nanocatalyst [20]. However, the use of Sodium Dodecylbenzene Sulfonate (SDBS) as a catalyst in aqueous media for the synthesis of benzylpyrazolyl-coumarin has not been

* Corresponding author.

E-mail address: malika.chebli@ummto.dz (M. Makhoulfi-Chebli).



Scheme 1. Synthesis of benzylpyrazolyl-coumarin derivatives **5a-i** using SDBS as a catalyst.



5a: R'=H ; R=H

5j: R'=p-CH₃ ; R=H

6k: R'=p-N(CH₃)₂ ; R=H

6a: R'=H; R=C₆H₅-

6b: R'=p-CH₃ ; R=C₆H₅-

6c: R'=p-NO₂ ; R=C₆H₅-

Fig. 1. Some biologically active substituted benzylpyrazolyl-coumarin derivatives. Antimicrobial activity (**5a**, **5j**, **5k**), antioxidant activity (**6a-c**) [2] and anti-inflammatory activity (**6c**) [3].

reported. SDBS has been used in a number of organic reactions as a good catalyst [21,22].

In the present work, we report an efficient and environmentally friendly synthetic route for the synthesis of benzylpyrazolyl-coumarin derivatives **5a-i** via a one-pot condensation reaction of hydrazine **1**, ethyl acetoacetate **2**, aromatic aldehyde **3a-i**, and 4-hydroxycoumarin **4** in the presence of SDBS as catalyst (Scheme 1). This new process is characterized by short reaction time, moderate yields and simple preparation. The obtained products were also evaluated for their antioxidant and antifungal activities. Till date there are only two reports available on the antimicrobial and Anti-inflammatory activity studies of some benzylpyrazolylcoumarins [23,24] (see Fig. 1). In addition, molecular docking studies were performed for compound **5e** to evaluate its potential as an inhibitor of the N-myristoyltransferase (NMT) protein from *Candida albicans*.

2. Experimental

2.1. Materials and methods

The chemicals reagents (Aldrich products) were used without further purification. Melting points were determined on a Stuart scientific SPM3 apparatus fitted with a microscope and are uncorrected. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded in DMSO-d₆ solutions on Bruker Ascend™ 400 (400 MHz for ¹H and 101 MHz for ¹³C) spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (δ, ppm) using TMS as internal reference and coupling constants (J) are given in Hertz (Hz). UV-visible spectra were recorded using a Thermo scientific spectrophotometer-Evolution 220; measurements were made from 200 to 800 nm. The progress of the reactions was monitored throughout by TLC plates (silica gel G) using mobile phase, chloroform: methanol (5:1), and the spots were identified by iodine vapors or UV-light.

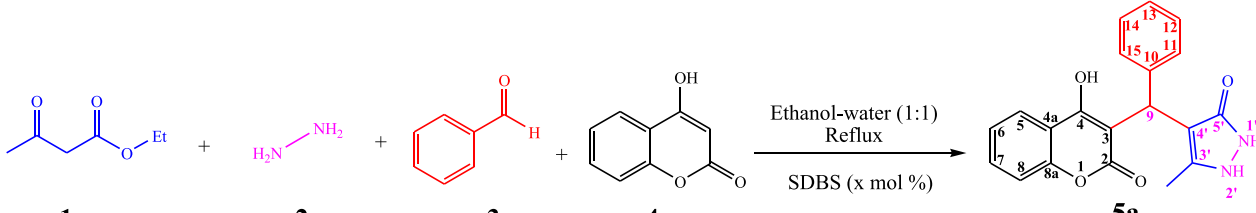
2.2. General procedure for the synthesis of benzylpyrazolylcoumarin derivatives **5a-i** catalyzed by SDBS

To an equimolar mixture of two reagents ethyl acetoacetate **1** (5 mmol) and hydrazine hydrate **2** (5 mmol) in the presence of SDBS as a catalyst (x mol%) was added EtOH-H₂O (1:1, 5 mL) in a 250 mL round-bottom tricol flask equipped with a condenser and heated in a refluxing sand bath under stirring. After the formation of the pyrazolone product (monitored by TLC), the aromatic aldehyde derivative **3a-i** (5 mmol) and the 4-hydroxycoumarin derivative **4** (5 mmol) were added simultaneously to the reaction mixture after dissolving them in 5 mL of ethanol separately and finally supplemented with 10 mL of water. The resulting mixture was stirred under reflux conditions and the progress of the reaction was monitored by TLC. After completion of the reaction, the mixture was filtered directly under heat. Then the products were washed with a hot ethanol-H₂O (1:1) mixture and dried at room temperature to give the corresponding benzylpyrazolyl-coumarin derivatives **5a-i**. All products were identified by melting point measurement and the structure of compound **5a** was confirmed by mass and NMR spectroscopic methods.

2.3. Spectral characterization of compound **5a**

2.3.1. 4-((4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)(phenyl)methyl)-5-methyl-1,2-dihydro-3Hpyrazol-3-one (**5a**)

White powder; mp 230–232 °C (229–230 [12]); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 2.29 (s, 3H, CH₃-5'), 5.61 (s, 1H, H-9), 7.11–7.16 (m, 3H, H_{coum}-7,8, H_{ar}-13), 7.21–7.32 (m, 4H, H_{ar}), 7.53–7.57 (t, J = 8.4 Hz, H_{coum}-6), 7.81 (d, J = 8 Hz, 1H, H_{coum}-5), 12.69 (s br, 1H, OH-4); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 10.54, 33.82, 105.17, 106.13, 116.19, 119.97, 123.86, 124.49, 126.14, 127.22, 128.46, 131.88, 141.38, 144.68, 152.66, 162.51, 165.14, 166.55; Ms (ESI⁺) m/z (%) = 349 (100%) [M + H]⁺.

Table 1
optimization of the amount of SDBS (mol%) for the synthesis of benzylpyrazolyl-coumarin **5a**.^a


Entry	Catalyst (mol%)	Time (h)	Yield ^b (%)
1	1	2	58
2	2	2	62
3	3	2	65
4	5	2	45

^a Reactions conditions: 4-hydroxy coumarin (5 mmol), ethyl acetoacetate (5 mmol), hydrazine hydrate (5 mmol), benzaldehyde (5 mmol) and SDBS (x mol%), using a mixture of ethanol-water (1:1) as a solvent.

^b Isolated yield.

2.4. Antioxidant activity

The antioxidant activity of the synthesized compounds **5a-i** was performed by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH[•]) scavenging assay under the following protocol [25,26]. 40 μ L of each sample of different concentrations (400, 200, 100, 50 and 25 μ g/mL) was mixed with 2 mL of freshly prepared DPPH (0.1 mM) in methanol and incubated at room temperature for 1 h in darkness at 25 °C. The violet color of DPPH solution disappeared when it was reduced by the test samples. The decrease in absorbance was recorded at 517 nm. DPPH scavenging effect was calculated as percentage of DPPH discoloration using Eq. (1):

$$\text{RSA (\%)} = \frac{[(\text{Ac} - \text{As})/\text{Ac}] \times 100}{(1)}$$

Where Ac is the absorbance of the control (absorbance of DPPH[•] in ethanol solution without sample), and As is the absorbance of the sample compounds tested after 60 min of incubation. Ascorbic acid (AA) was used as standard for the antioxidant activity screening. Each measurement was performed in triplicate.

2.5. Antifungal activity

The synthesized compounds **5a-i** were screened *in vitro* against strains of *Candida albicans* and *Aspergillus niger* by disk diffusion technique [27]. A disk of 6 mm in diameter impregnated with the compound to be tested previously dissolved in DMSO at a concentration of 5 mg/mL is deposited aseptically in the petri dish previously inoculated with the microbial suspension. After 7 days of incubation at 37 °C for *Aspergillus niger* and 48 °C for *Candida albicans*, the antifungal activity was evaluated by measuring the diameter of the zone of inhibition.

The MIC is defined as the lowest concentration of the product for which no growth is visible to the naked eye. To determine it, a series of dilutions in DMSO of different solutions of the active compounds at concentrations ranging from 500 to 62.5 μ g/mL was prepared, 1 mL of each concentration was mixed with 9 mL of Sabouraud agar medium distributed in Petri dishes, and then the fungal suspension was seeded on the surface of the agar medium. The plates were then incubated for 48 h for *Candida albicans* and 7 days for *Aspergillus niger* at 37 °C.

2.6. DFT analysis

The 2D structures of the synthesized compounds were drawn and preoptimized using Avogadro 1.2 program [28]. Then, obtained geometries of synthesized compounds were optimized by using

DFT (density functional theory) level and B3LYP method with 6-311G** basis set using ORCA V 4.0 software [29,30].

2.7. Molecular docking studies

In order to understand the antifungal activities of synthesized compounds at the atomic level, molecular docking studies were performed. The crystallographic structure PDB ID 1IYL with resolution of 3.20 Å corresponding to candida albicans N-myristoyltransferase (NMT) protein complexed with its inhibitor R64 having a benzofuran core was downloaded from the Royal Collaboratory for Structural Bioinformatics, RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>). NMT is the therapeutic target for the development of antifungal chemotherapeutic agents [31]. All heteroatoms, non-receptor atoms, water and other ions were removed [32]. Polar hydrogen atoms and partial Gasteiger charges were performed using AutodockTools 1.5.7 [33]. The amino acids nearest of R64 and optimized structures of synthesized compounds were treated as flexible during the molecular docking simulations while the rest of the protein was kept rigid [34]. Molecular docking studies were performed on prepared compounds to predict the binding mode, binding energies and orientation at the active site of selected NMT protein. Thus, a grid map of 48×50×50 points around the modeled domain was used. The spacing dimensions of the grid were of 0.375 Å. The Lamarckian genetic algorithm (LGA) as implemented in Autodock 4 software [35] with default docking parameters were used. At the end of docking, the best conformation of the ligand was analyzed for its binding interactions.

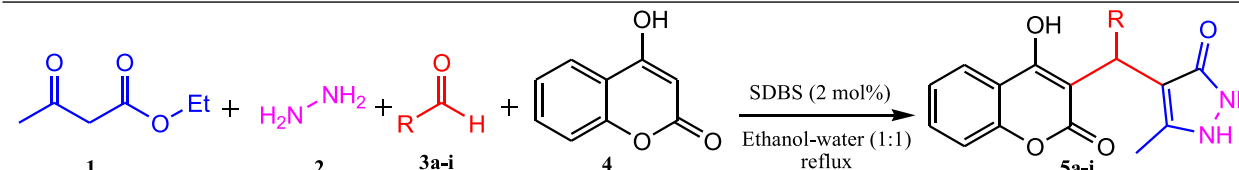
3. Results and discussion

3.1. Chemistry

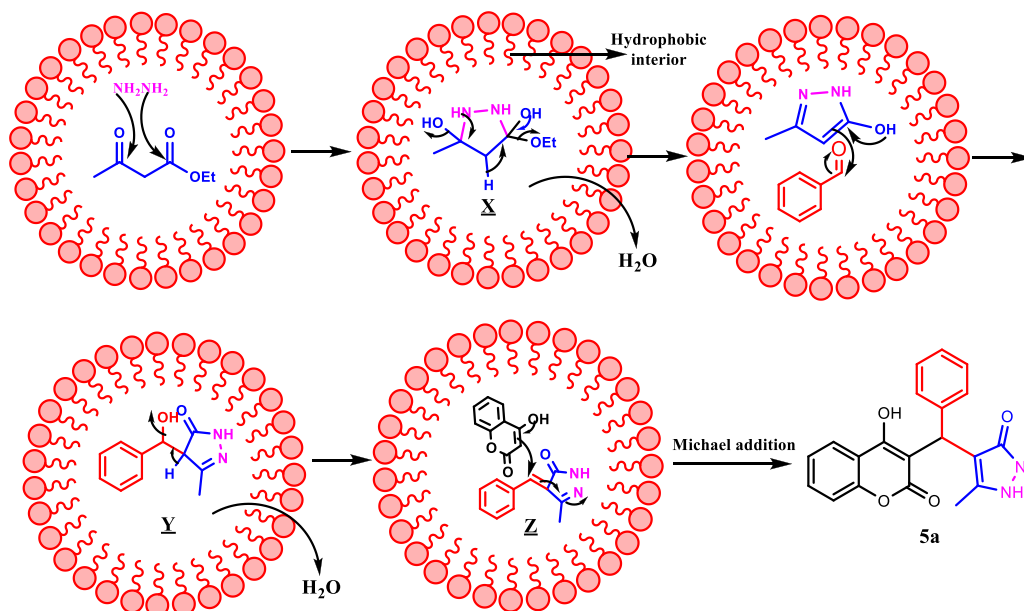
3.1.1. Reaction condition optimization

To evaluate the catalytic activity of the surfactant, the condensation between ethyl acetoacetate **1**, hydrazine **2**, benzaldehyde **3** and 4-hydroxycoumarin **4** was selected as a simple model substrate in a mixture of ethanol-water (1:1) using SDBS (ionic surfactant) as a catalyst. In order to optimize the reaction conditions for improving the yield of the desired product, the model reaction was checked in different amounts of SDBS (Table 1, entries 1–4) under reflux. The best result was observed when 3 mol% of SDBS was applied in the reaction; the desired product was obviously produced in the high yield (64%). When the amounts of SDBS was from 1% to 3% the yield increases from 58% to 64%, respectively. Thus, 2 mol% SDBS was chosen for further reaction condition optimization

Table 2
SDBS (2 mol%) catalyzed synthesis of benzylpyrazolylcoumarin derivatives **5a-i**.^a

					
Entry	1 R	Compound 2	Yields (%) 3a-i	m.p (°C) Found	Reported
1	C ₆ H ₅ -	5a	65	230–232	229–230 [17]
2	4-OCH ₃ C ₆ H ₄ -	5b	25	203–205	202–204 [17]
3	4-ClC ₆ H ₄ -	5c	20	225–230	–
4	4-NO ₂ C ₆ H ₄ -	5d	36	233–235	237–239 [36]
5	2-OHC ₆ H ₄ -	5e	16	220–223	221–223 [36]
6	3-OHC ₆ H ₄ -	5f	53	210–213	217–219 [36]
7	C ₈ H ₇ -	5g	27	230–233	–
8	2,4-(Cl) ₂ -C ₆ H ₃ -	5h	24	215–220	–
9	2,6-(Cl) ₂ -C ₆ H ₃ -	5i	23	148–150	–

^a Reactions conditions: 4-hydroxy coumarin (5 mmol), ethyl acetoacetate (5 mmol), hydrazine hydrate (5 mmol), benzaldehyde (5 mmol) and SDBS (2 mol%), using a mixture of ethanol-water (1:1) as a solvent.

**Scheme 2.** Micelle-promoted synthesis and a possible mechanism for the formation of benzylpyrazolyl-coumarin **5a i**.

(Table 1, entry 2), because no considerable increase was found in yield from 2 to 3 mol% of SDBS.

Based on all these experiments, the optimal reaction conditions chosen are the use of 2 mol% SDBS in a mixture of ethanol-water solvent (1:1), under reflux. The reaction was then carried out with different series of substituted aromatic aldehydes and the results are summarized in Table 2. The aromatic aldehydes carrying both electron-withdrawing and electron-donating functional groups (Table 2) underwent successful condensation with ethyl acetoacetate. The structures of compound **5a** were confirmed by their spectroscopic data, ¹H NMR spectra and their melting points are compared with literature reports.

In the ¹H NMR of compound **5a**, two characteristic singlets at 2.29 and 5.61 ppm were assigned to the methyl protons and the proton H-9 respectively, in accordance with the literature data for other benzylpyrazolyl-coumarin derivatives [17,20].

3.1.2. Catalytic mechanism analysis

A plausible reaction mechanism is shown in Scheme 2. It should be noted that the addition of SDBS transformed the reagents ini-

tially suspended in water into a homogeneous mixture, which formed an emulsion under magnetic stirring, when the last two reagents (aldehyde derivatives **3** and 4-hydroxycoumarin **4**) were added, a precipitate started to appear in the reaction mixture after a few minutes of reaction and the reaction mixture was homogeneous throughout the reaction in the presence of SDBS.

Since we know that SDBS is a surfactant, i.e., a substance that changes the surface tension between two surfaces, and is composed of amphiphilic molecules with a lipophilic side (affinity for lipids) and a hydrophilic side (affinity for water), we assumed that micelles were formed. Based on the above observations, we hypothesized the mechanism of the condensation reaction described in Scheme 2. First, upon dissolution of SDBS in water, the lipophilic side of SDBS moved away from the aqueous region and the hydrophilic side arranged around the aqueous periphery. Due to the hydrophobic interactions of SDBS with the reactants, droplets with a hydrophobic interior were formed in the emulsion [37]. As shown in Scheme 2, ethyl acetoacetate and hydrazine hydrate first react to give the intermediate 3-methyl-1H-pyrazol-5-ol (**X**)

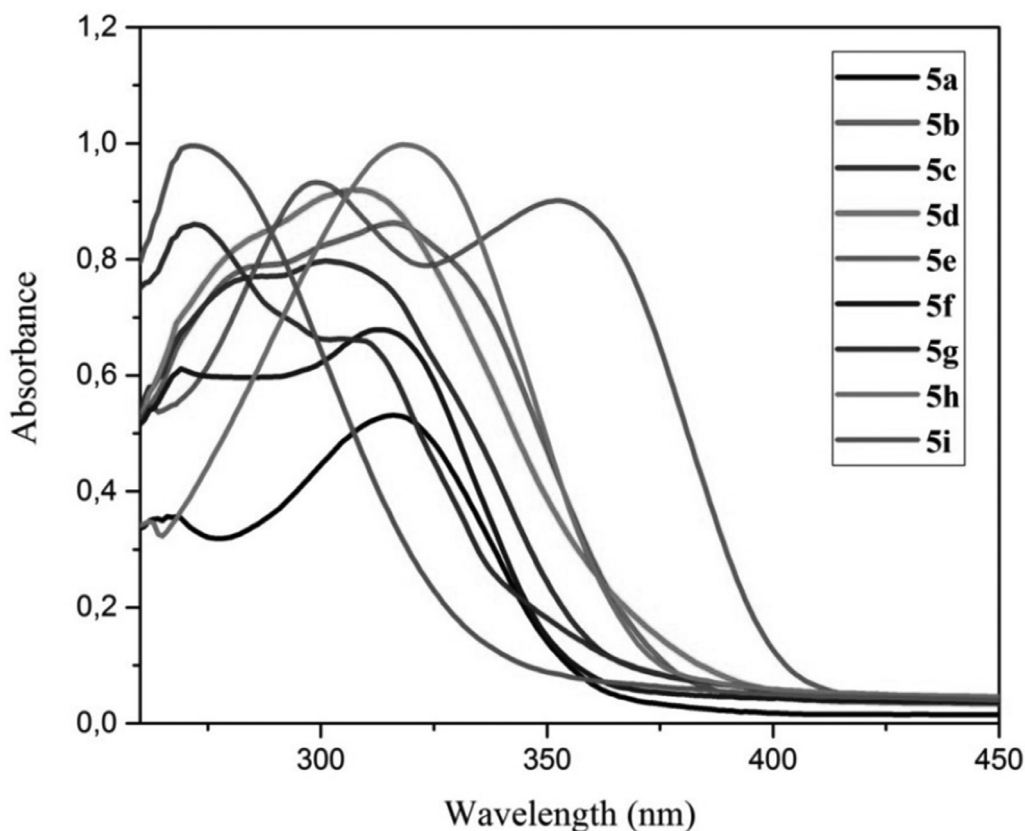


Fig. 2. UV-vis absorption spectra of compounds **5a-i** in DMSO.

in the hydrophobic interior of the micelles formed by SDBS. Inside the droplets, the hydrogen atom of the hydroxyl group that exists in the enol form of pyrazolone combines with the oxygen atom of the carbonyl group of benzaldehyde. Therefore, the carbon **4** of pyrazolone attacks the carbon (carbonyl group), the intermediate (**Y**) is generated by the nucleophilic addition. The hydroxyl group of the benzyl group of (**Y**) and the hydrogen atom of carbon **4** of pyrazolone generate water and intermediate (**Z**) via the elimination reaction. The dehydrated α,β -unsaturated ketone remained inside the droplets, and the generated water was expelled to the outside of the droplets due to its hydrophobic nature [38], the α,β -unsaturated and a 4-hydroxycoumarin molecule proceeded by Michael addition inside the droplets to produce the molecule 4-((4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)(phenyl)methyl)-5-methyl-3H-pyrazol-3-one **5a** in the reaction system.

3.2. Spectroscopic study, effect of the substituent on the UV-visible spectrum

The UV-vis absorption spectra of compounds **5a-i** at a concentration of 10^{-5} M were recorded after dissolving the products in DMSO. The maximum absorption wavelengths ($\lambda_{\max}^{\text{abs}}$) were observed in the range of 250 to 400 nm (Fig. 2). All compounds show two absorption bands which are attributed to the $\pi - \pi^*$ transition of the conjugated backbones (Table 3), except for compounds **5h** and **5i**. The absorption spectra of the obtained products showed that the spectral shapes are very similar because all these compounds have the same central core. The difference in absorption wavelengths and absorption intensities is due to the substituted phenyl ring.

Table 3

UV-Visible spectroscopic characteristics of compounds **5a-i** in DMSO.

Compound	λ_{abs} (nm)	Compound	λ_{abs} (nm)
5a	316	5e	299
5b	315	5f	352
	285	5g	269
5c	301		313
	285	5h	273
5d	307	5i	308
			318
			271

3.3. Antioxidant activity

The antioxidant potential of the corresponding compounds **5a-i** was investigated based on their electron or hydrogen donating powers to the DPPH radical. Fig. 3 shows the variation of absorbance as a function of the concentration of compounds, all tested compounds have moderate to good activity. The IC_{50} values for compounds **5a-i** (Fig. 4) show that compound **5g** have the lowest IC_{50} value among the synthesized compounds ($\text{IC}_{50} = 445,77 \mu\text{g/mL}$) with higher antioxidant activity than that of the standard ascorbic acid ($\text{IC}_{50} = 481,5 \mu\text{g/mL}$). Compound **5a** exhibit a comparable antioxidant activity ($\text{IC}_{50} = 508,53 \mu\text{g/mL}$) than that of the standard ascorbic acid. The results showed that the introduction of chloro, methoxyl and nitro groups in the benzyl ring decreased the antioxidant activity of these compounds compared to compound **5a** (IC_{50} between 2 mg/mL and 8 mg/mL for the 4-methoxyl, 4-nitro, 4-chloro and 2,6-dichloro groups and up to 30 mg/mL for the 2,4-dichloro group).

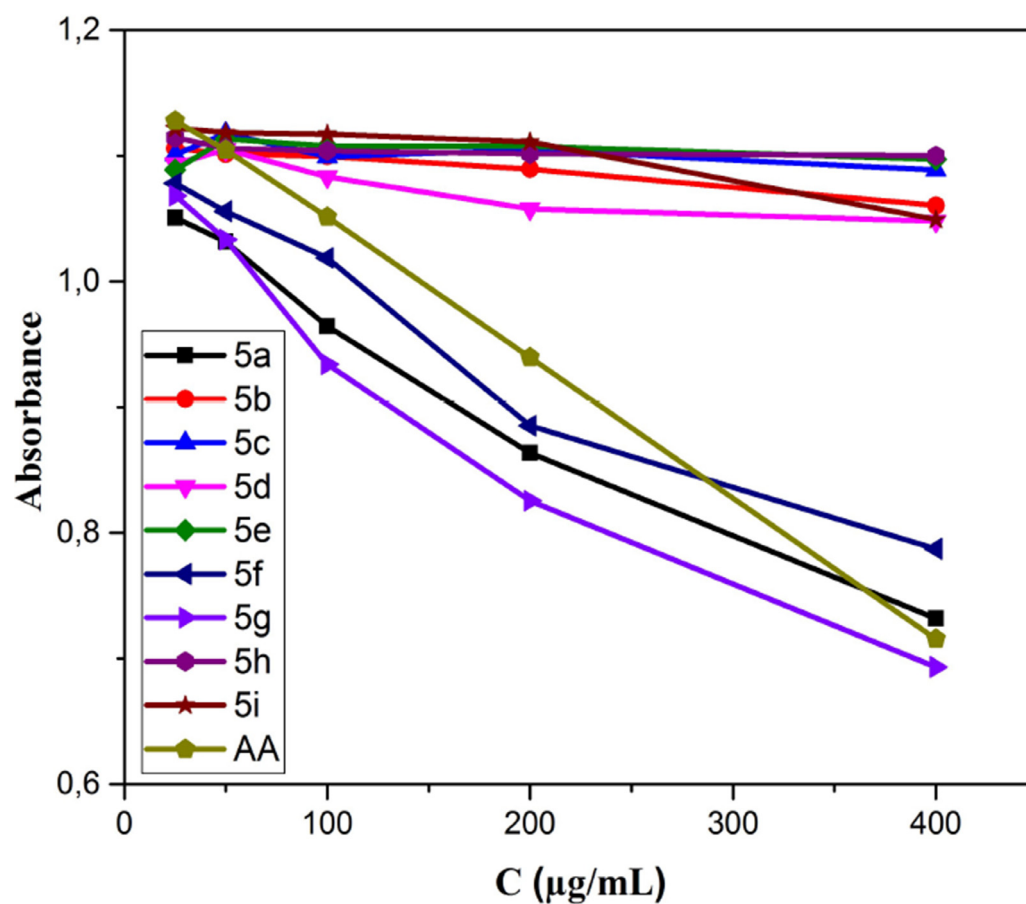


Fig. 3. Absorbance at 517 nm vs concentration of **5a-i** and of the standard ascorbic acid **AA**.

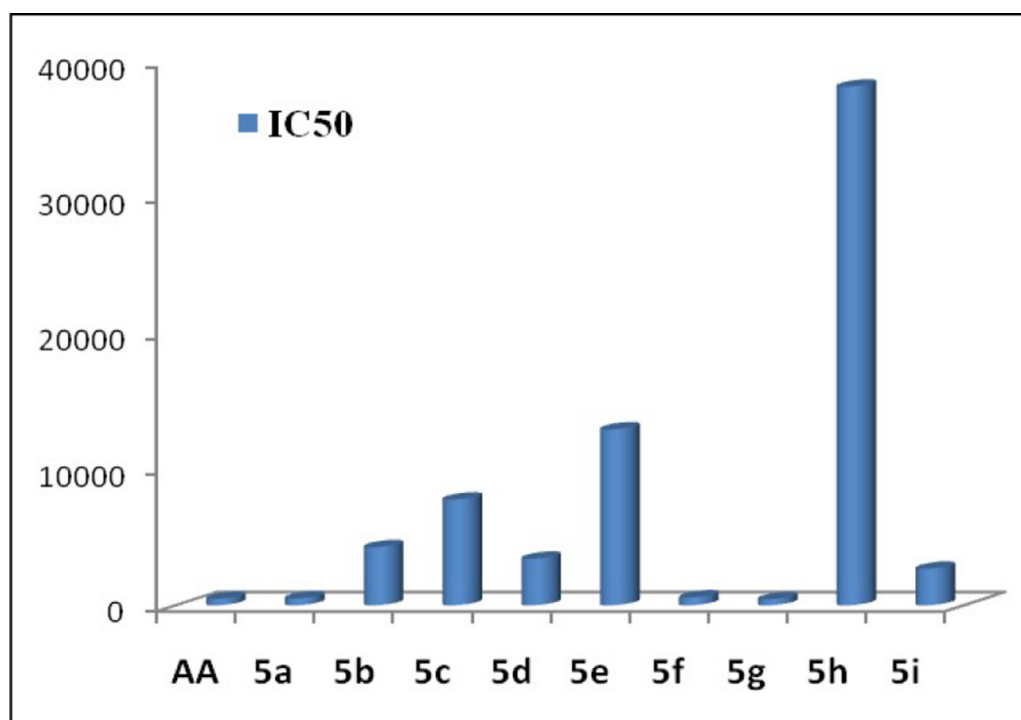


Fig. 4. IC₅₀ (µg/mL) values of the antioxidant compounds **5a-i** compared to the reference **AA**.

Table 4

Diameter (mm) of the inhibition zone of benzylpyrazolyl-coumarin derivatives **5a-i** at 5 mg/mL concentrations.

Tested compound	Diameter of the inhibition zone of the synthesis products (mm)	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
5a	09	–
5b	09	–
5c	10	–
5d	11	–
5e	10	–
5f	07	–
5 g	10	–
5h	–	–
5i	10	–
Ketoconazole	22	22

The IC₅₀ data indicated in Fig. 4 also showed that the antioxidant activity of compound **5e** was lower than that of compound **5f**, which means that the substitution of the benzyl ring with a hydroxyl group at the meta-position was less favorable for the free radical scavenging activity than the ortho-position.

3.4. Antifungal activity

The in vitro antifungal activity of the new benzylpyrazolyl coumarin **5a-i** derivatives was evaluated against two fungi *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. The results of in vitro antifungal activity are presented in Tables 4 and 5. Examination of the obtained results (Table 4) revealed that all compounds have moderate activity against *Candida albicans* strain, except for compound **5 h**. However, the newly synthesized compounds did not show any zone of inhibition against *Aspergillus niger*. To evaluate the minimum inhibitory concentrations, the active products were diluted. The best result was obtained with the compound **5e** (MIC=125 µg/mL) followed by compound **5c** (MIC= 250 µg/mL) and finally compound **5d**, **5 g** and **5i** (MIC =500 µg/mL) (Table 5).

3.5. DFT analysis, geometries of synthesized compounds

Geometries of synthesized compounds were optimized by using B3LYP method with 6–311G** basis set. The compound **5** thus obtained can exist in the form of six tautomers **A**, **B**, **C**, **D**, **E** and **F** (Fig. 5). Theoretical calculations with the ORCA program carried out with the DFT (density functional theory) level with the base 6–311G** and the functional B3LYP confirm the stability of the structure **C** (*E* = -742,305.235 kcal/mol) with respect to that of the others. Optimized geometries for the tautomers are shown in Fig. 6.

3.6. Molecular docking simulations

Binding modes of the synthesized compound **5e** and standard drug ketoconazole with NMT protein were examined by docking studies with Autodock 4. According to the docking calculations results, the compound **5e** showed better binding energy (-14.16 kcal/mol) than standard drug Ketokonazole (-12.91 kcal/mol).

Table 6

Predicted interacting residues for synthesized compound **5e** and Ketoconazole with N-myristoyltransferase (NMT) protein.

Compound	5e	Ketoconazole
H-Bonds/ Halogen bond	Tyr107 (1.93 Å), Leu451 (2.51 Å)	Thr211 (2.10 Å), Phe176 (2.72 Å)
Carbon Hydrogen bond	Gly212	Tyr107, Asn392, Tyr225, Phe339
π - π T-shaped	Phe176, Phe117	
Van Der Waals	Gly213, Asn416, Phe414, Gly212, Thr211, Leu415, Asn175, Ala127, Phe123, Tyr119, Leu337, Tyr335, Tyr354, Phe339, Asp110, Glu109	Phe123, Leu177, Leu177, Tyr119, Val108, Gly213, Glu109, Gly212, Phe414, Gly413, Asn416, Ile111, Asp110, Val341, Phe115, Ser241, Val238, Leu350, Val238, Leu350, Asp389, Leu235, Phe391, Gly351, Lys234, Pro229, Gln226, Ala353, Tyr335, Tyr354, Phe117, Leu394, Leu337, Leu450, Ile174, Tyr210
Alkyl/ π -alkyl	Val108	Leu415, Phe240, His227, Val390, Ile352, Leu451
π -cation/ π -anion	Leu451	

Based on this result, it can be assumed that the synthesized compound **5e** shows higher affinity for NMT protein than Ketokonazole [39]. However, details of docked conformation of compound **5e**, having the best experimental antifungal activity (MIC=125 µg/mL), are listed in Table 6 and Fig. 7. Indeed, this compound occupied the binding site composed of aromatic residues as determined experimentally [40]. The phenyl ring of chromen-2-one and hydroxyphenyl ring of compound **5e** were arranged almost perpendicular

Table 5

Minimum Inhibitory Concentration (MIC in µg/mL) of **5c-e**, **5 g** and **5i**.

Antifungal activity <i>Candida albicans</i>						
Tested compounds	5c	5d	5e	5 g	5i	Ketoconazole
Minimum inhibitory concentration (MIC's) in µg mL ⁻¹	≥250	≥500	≥125	≥500	≥500	6.25

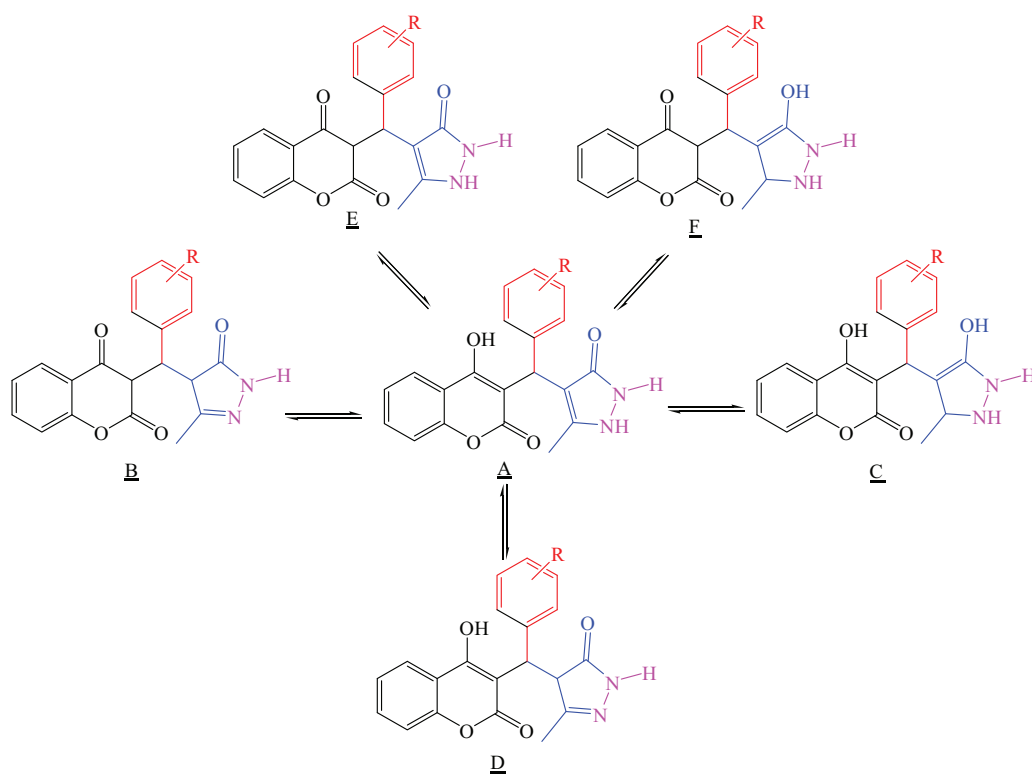


Fig. 5. Different tautomers possible of compounds 5a-i.

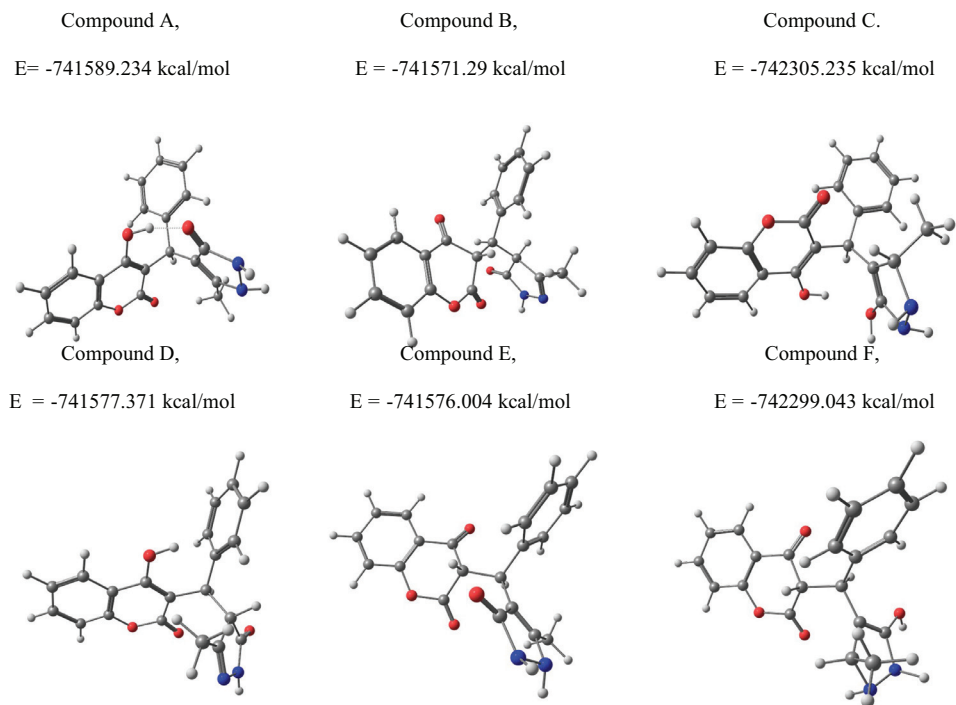


Fig. 6. Optimized 3D geometrical structures for compounds 5a-i.

ular to the phenyl rings of side chains of residues Phe176 and Phe117, respectively, leading to attractive, noncovalent interactions, π - π T-shaped (Table 6). In contrast, the phenyl ring between the methoxy group and piperazine ring of ketoconazole was arranged almost perpendicular to the phenyl rings of side chains of residues Phe339. Remember that these residues were presumed to be im-

portant not only for the architecture of the binding site but also for inhibitors binding [40].

Besides, the nitrogen atom of backbone of Leu451 is located in the proximity of the hydroxyl oxygen atom of the hydroxyphenol moiety (at 2.51 Å), leading to hydrogen bond interaction, which might contribute to the inhibitor binding. Also, the dis-

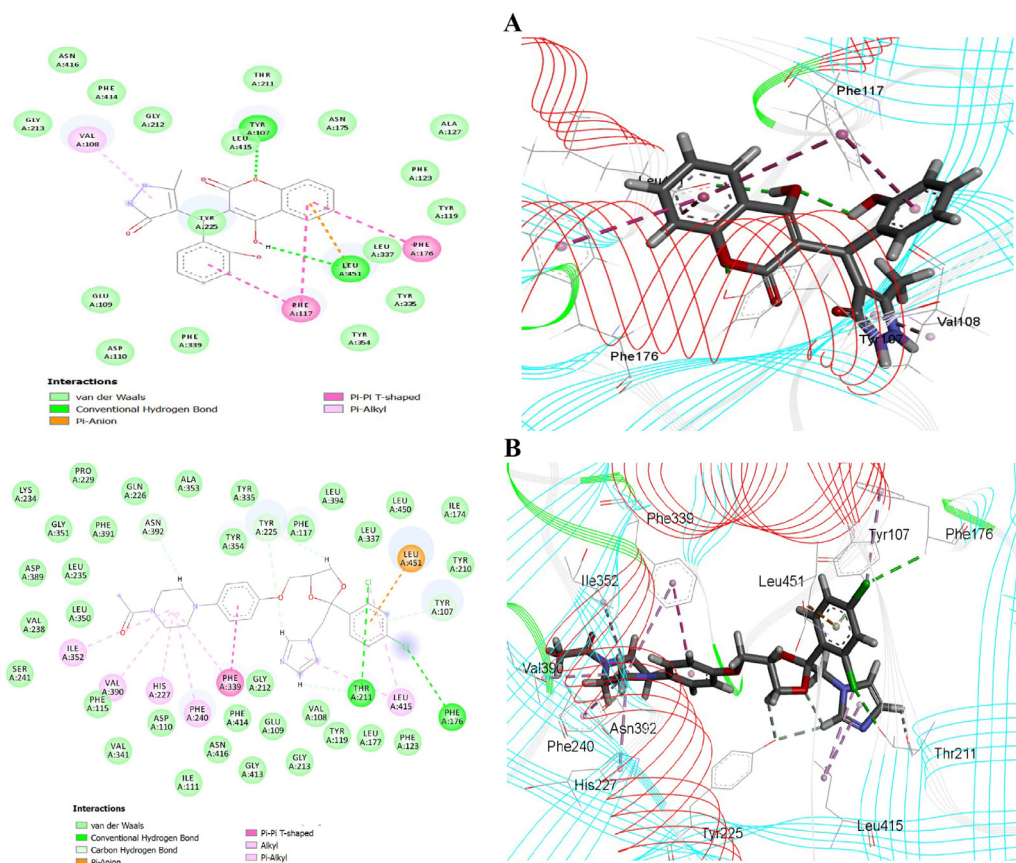


Fig. 7. 2D and 3D views of binding modes of compounds A- **5e** and B-ketoconazole to N-myristoyltransferase (NMT) protein.

tance between hydrogen atom of hydroxyl group of the Tyr107 side chain and oxygen atom of the chromen-2-one moiety is 1.93 Å, leading to the formation of hydrogen bond. On the other hand, ketoconazole is involved in two halogen bonds with C-terminal and N-terminal of residues Thr211 (2.10 Å), Phe176 (2.72 Å), respectively, (Fig. 7 and Table 6). visualization of docked conformation of compound **5e** show that C-terminal of Leu451 is located at distance 4.21 Å from phenyl ring of chromen-2-one moiety, leading to π -Anion interaction. It should be noted that the same residue (Leu451) makes attractive and non-covalent interaction with imidazole ring of Ketoconazole. Additionally, the aliphatic side chain of Val108 was pointing directly toward the hydroxyphenyl (5.76 Å) and methylpyrazole (3.97 Å) rings, leading to favorable hydrophobic interactions. Also, the aliphatic side chain of Leu415 was located in vicinity of methyl group of methylpyrazole moiety (5.13 Å), leading to favorable hydrophobic interactions.

In view of the above analysis, the docking results obtained in the present study showed that compound **5e** forms hydrogen bonds and favorable hydrophobic interactions with important residues of the binding site of N-myristoyltransferase (NMT) protein, stabilizing thus the ligand in the active site of studied protein.

4. Conclusion

In summary, we have demonstrated a highly efficient and environmentally friendly procedure for the synthesis of benzylpyrazolylcoumarin via the SDBS-catalyzed Knoevenagel-Michael tandem reaction in dilute ethanol (50%) of ethyl acetoacetate, hydrazine, aromatic aldehydes with 4-hydroxycoumarin. The advantages of this method are the simplicity of the reaction, very mild reaction conditions, short reaction times and good yields. These are

due to the formation of colloidal particles stabilized by SDBS in an aqueous medium. The antifungal and antioxidant properties of the synthesized compounds were also evaluated and the results were promising. Docking studies verified that compound **5e** could function of novel classes of clinically useful antifungal agent since it possesses high affinity for N-myristoyltransferase (NMT) protein (-16.34 kcal/mol).

Credit author statement

Sabrina Halit: Conceptualization, Methodology, synthesis. **Amina Benazzouz-Touami:** Biological activity, Writing- Original draft. **Malika Makhloufi-Chebli:** Reviewing and Editing. **Souhila Terrachet-Bouaziz:** Theoretical calculations. **Karima Ighilahriz-Boubchir:** analyse of product.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

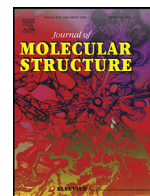
Acknowledgements

The authors are thankful to Jean-Bernard Behr, Professor at Reims university in France for his invaluable discussions and guidance.

References

- [1] Majid M. Heravi, V. Zadsirjan, Introduction. Recent advances in applications of name reactions in multicomponent reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 6(11), 951–952. 506 (2021) 2013–2015. 10.1016/B978-0-12-818584-1/00001-X.

- [2] C. Capello, U. Fischer, K. Hungerbühler, What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents, *Green Chem.* 9 (2007) 927–993, doi:[10.1039/b617536h](https://doi.org/10.1039/b617536h).
- [3] M. Shiri, M.A. Zolfigol, Surfactant-type catalysts in organic reactions, *Tetrahedron* 65 (2009) 587–598, doi:[10.1016/j.tet.2008.09.085](https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.09.085).
- [4] K. Manabe, Y. Mori, T. Wakabayashi, S. Nagayama, S. Kobayashi, Organic synthesis inside particles in water: lewis acid – surfactant-combined catalysts for organic reactions in water using colloidal dispersions as reaction media, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 7202–7207, doi:[10.1021/ja001420r](https://doi.org/10.1021/ja001420r).
- [5] Z. Zarnegar, R. Alizadeh, M. Ahmadzadeh, J. Safari, C–N bond formation in alicyclic and heterocyclic compounds by amine-modified nanoclay, *J. Mol. Struct.* 1144 (2017) 58–65, doi:[10.1016/j.molstruc.2017.05.004](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.05.004).
- [6] H.M. Patel, Synthesis of New Mannich Products Bearing Quinoline Nucleous Using Reusable Ionic Liquid and Antitubercular Evaluation, *Green Sustain. Chem.* 5(4) (2015) 137–144. DOI: 10.4236/gsc.2015.54017
- [7] H.M. Patel, D.P. Rajani, M.G. Sharma, H.G. Bhatt, Synthesis, molecular docking and biological evaluation of mannich products based on thiophene nucleus using ionic liquid, *Lett. Drug Des. Discov.* 16 (2) (2019) 119–126, doi:[10.2174/1570180815666180502123743](https://doi.org/10.2174/1570180815666180502123743).
- [8] P.C.A. Tripathi, A comparative computational study of C–N and C–C bonding visible to NIR absorbing croconines, *J. Mol. Struct.* 1155 (2018) 561–567 Doi:, doi:[10.1016/j.molstruc.2017.11.014](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.11.014).
- [9] D. Roy, K. Ali, G. Panda, Unveiling p-quinone methide (QM) chemistry to synthesize bedaquiline (TMC 207) like architectures, *J. Mol. Struct.* 1239 (2021) 130493 doi:, doi:[10.1016/j.molstruc.2021.130493](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130493).
- [10] T. Quadri-Spinelli, J. Heilmann, T. Rali, O. Sticher, Bioactive coumarin derivatives from the fern *Cyclosorus interruptus*, *Planta Med.* 66 (2000) 728–733, doi:[10.1055/s-2000-9908](https://doi.org/10.1055/s-2000-9908).
- [11] Y. Guo, Y. Wang, H. Li, K. Wang, Q. Wan, J. Li, Y. Zhou, Y. Chen, Novel nitric oxide donors of phenylsulfonylfuroxan and 3-benzyl coumarin derivatives as potent antitumor agents, *ACS Med. Chem. Lett.* 9 (2018) 502–506, doi:[10.1021/acsmchemlett.8b00125](https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00125).
- [12] N.O. Mahmoodi, Z. Jalalifard, G.P. Fathanbari, Green synthesis of bis-coumarin derivatives using Fe(ND)3 as a catalyst and investigation of their biological activities, *J. Chin. Chem. Soc.* 67 (2020) 172–182, doi:[10.1002/jccs.201800444](https://doi.org/10.1002/jccs.201800444).
- [13] C.R. Sahoo, J. Sahoo, M. Mahapatra, D. Lenka, P. Kumar Sahu, B. Dehury, R. Nath Padhy, S. Kumar Paidesetty, Coumarin derivatives as promising antibacterial agent(s), *Arabian J. Chem.* 14 (2021) 102922, doi:[10.1016/j.arabj.2020.102922](https://doi.org/10.1016/j.arabj.2020.102922).
- [14] M. Himly, B. Jahn-Schmid, K. Pittersschatscher, B. Bohle, K. Grubmayr, F. Ferreira, H. Ebner, C. Ebner, Ig E-mediated immediate-type hypersensitivity to the pyrazolone drug propylphenazone, *J. Allergy Clin. Immunol.* 111 (2003) 882–888, doi:[10.1067/mai.2003.163](https://doi.org/10.1067/mai.2003.163).
- [15] F. Moreau, N. Desroy, J.M. Genevard, V. Vongsouthi, V. Gerusz, G.Le Fralliec, C. Oliveira, S. Floquet, A. Denis, S. Escaich, K. Wolf, M. Busemann, A. Aschenbrenner, Discovery of new gram-negative antivirulence drugs: structure and properties of novel E. coli WaaC inhibitors, bioorganic and medicinal chemistry letters. 18 (2008) 4022–4026. [10.1016/j.bmcl.2008.05.117](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.117).
- [16] R. Parajuli, J. Banerjee, H. Khanal, Synthesis of some pyrazolone derivatives and evaluation of its antibacterial and cytotoxic activity, *Orient. J. Chem.* 31 (2015) 2099–2106, doi:[10.13005/ojc/310430](https://doi.org/10.13005/ojc/310430).
- [17] P.P. Ghosh, G. Pal, S. Paul, A.R. Das, Design and synthesis of benzylpyrazolyl coumarin derivatives via a four-component reaction in water: investigation of the weak interactions accumulating in the crystal structure of a signified compound, *Green Chem.* 14 (2012) 2691–2698, doi:[10.1039/c2gc36021g](https://doi.org/10.1039/c2gc36021g).
- [18] A. Saha, S. Payra, S. Banerjee, One-pot multicomponent synthesis of highly functionalized bio-active pyran[2,3-c]pyrazole and benzylpyrazolyl coumarin derivatives using ZrO₂ nanoparticles as a reusable catalyst, *Green Chem.* 17 (2015) 2859–2866, doi:[10.1039/c4gc02420f](https://doi.org/10.1039/c4gc02420f).
- [19] S. Yaragorla, A. Pareek, R. Dada, Ca(II)-catalyzed, one-pot four component synthesis of functionally embellished benzylpyrazolyl coumarins in water, *Tetrahedron. Lett.* 56 (2015) 4770–4774, doi:[10.1016/j.tetlet.2015.06.049](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.06.049).
- [20] S. Karami, M.G. Dekamin, E. Valiey, P. Shakib, DABA MNPs, A new and efficient magnetic bifunctional nanocatalyst for the green synthesis of biologically active pyran[2,3-c] pyrazole and benzylpyrazolyl coumarin derivatives, *New J. Chem.* 44 (2020) 13952–13961, doi:[10.1039/d0nj02666b](https://doi.org/10.1039/d0nj02666b).
- [21] B. Pawar, V. Shinde, A. Chaskar, n-dodecylbenzene sulfonic acid (DBSA) as a novel brønsted acid catalyst for the synthesis of bis(indolyl)methanes and bis(4-hydroxycoumarin-3-yl)methanes in water, *Green Sustain. Chem.* 03 (2013) 56–60, doi:[10.4236/gsc.2013.32010](https://doi.org/10.4236/gsc.2013.32010).
- [22] Y. Zheng, Y. Zheng, Z. Wang, Y. Cao, Q. Shao, Z. Guo, Sodium dodecyl benzene sulfonate-catalyzed reaction for aromatic aldehydes with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone in aqueous media, *Green Chem. Lett. Rev.* 11 (2018) 217–223, doi:[10.1080/17518253.2018.1465600](https://doi.org/10.1080/17518253.2018.1465600).
- [23] H. Jelali, A. Chakchouk-Mtibaa, L. Baklouti, H. Bilel, Y. Bathich, L. Mellouli, N. Hamdi, Development of new multicomponent reactions in eco-friendly media-greener reaction and expeditious synthesis of novel bioactive benzylpyranocoumarins, *J. Chem.* 2019 (2019), doi:[10.1155/2019/8693614](https://doi.org/10.1155/2019/8693614).
- [24] A. Saha, S. Payra, S.K. Verma, M. Mandal, S. Thareja, S. Banerjee, In silico binding affinity to cyclooxygenase-II and green synthesis of benzylpyrazolyl coumarin derivatives, *RSC Adv.* 5 (2015) 100978–100983, doi:[10.1039/c5ra16643h](https://doi.org/10.1039/c5ra16643h).
- [25] B. Nickavar, M. Kamalinejad, H. Izadpanah, In vitro free radical scavenging activity of five *Salvia* species, *Pak J Pharm Sci* 20 (2007) 291–294.
- [26] B. Nickavar, N. Esbati, Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three thymus species, *JAMS* 5 (2012) 119–125, doi:[10.1016/j.jams.2012.03.003](https://doi.org/10.1016/j.jams.2012.03.003).
- [27] I. Rasooli, M.H. Fakoor, D. Yadegarinia, L. Gachkar, A. Allameh, M.B. Rezaei, Antimycotoxicogenic characteristics of rosmarinus officialis and trachyspermum coticum L. Essential oils, *Int. J. Food Microbiol.* 122 (2008) 135–139, doi:[10.1016/j.jfoodmicro.2007.11.048](https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2007.11.048).
- [28] M.D. Hanwell, D.E. Curtis, D.C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G.R. Hutchison, Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminform.* 4 (2012) 1–17, doi:[10.1186/1758-2946-4-17](https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17).
- [29] R.G. Parr, W. Yang, Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 4049–4050, doi:[10.1021/ja00326a036](https://doi.org/10.1021/ja00326a036).
- [30] C. Morell, A. Grand, A. Toro-Labbé, New dual descriptor for chemical reactivity, *J. Phys. Chem. A* 109 (2005) 205–212, doi:[10.1021/jp046577a](https://doi.org/10.1021/jp046577a).
- [31] H.P. Price, M.R. Menon, C. Panethymitaki, D. Goulding, P.G. McKean, D.F. Smith, Myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase, an essential enzyme and potential drug target in kinetoplastid parasites, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7206–7214, doi:[10.1074/jbc.M211391200](https://doi.org/10.1074/jbc.M211391200).
- [32] A. Benazzouz-Touami, A. Chouh, S. Halit, S. Terrachet-Bouaziz, M. Makhloufi-Chebli, K. Ighil-Ahriz, A.M.S. Silva, New coumarin-pyrazole hybrids: synthesis, docking studies and biological evaluation as potential cholinesterase inhibitors, *J. Mol. Struct.* 1249 (2022) 131591, doi:[10.1016/j.molstruc.2021.131591](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131591).
- [33] A. Allouche, Software news and updates gabedit – a graphical user interface for computational chemistry softwares, *J. Comput. Chem.* 32 (2012) 174–182, doi:[10.1002/jcc](https://doi.org/10.1002/jcc).
- [34] S. Bouaziz-Terrachet, A. Toumi-Maouche, B. Maouche, S. Tairi-Kellou, Modeling the binding modes of stilbene analogs to cyclooxygenase-2: a molecular docking study, *J. Mol. Model.* 16 (2010) 1919–1929, doi:[10.1007/s00894-010-0679-7](https://doi.org/10.1007/s00894-010-0679-7).
- [35] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1639–1662 [10.1002/\(sici\)1096-987x\(19981115\)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-987x(19981115)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b).
- [36] A.V. Chate, B.A. Shaikh, G.M. Bondle, S.M. Sangle, Efficient atom-economic one-pot multicomponent synthesis of benzylpyrazolyl coumarins and novel pyran[2,3-c]pyrazoles catalysed by 2-aminoethanesulfonic acid (taurine) as a bio-organic catalyst, *Synth. Commun.* 49 (2019) 2244–2257, doi:[10.1080/00397911.2019.1619772](https://doi.org/10.1080/00397911.2019.1619772).
- [37] K. Manabe, S. Iimura, X.M. Sun, S. Kobayashi, Dehydration reactions in water. Brønsted acid-surfactant-combined catalyst for ester, ether, thioether, and dithioacetal formation in water, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 11971–11978, doi:[10.1021/ja026241j](https://doi.org/10.1021/ja026241j).
- [38] C.D. Bruce, M.L. Berkowitz, L. Perera, M.D.E. Forbes, Molecular dynamics simulation of sodium dodecyl sulfate micelle in water: micellar structural characteristics and counterion distribution, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 3788–3793, doi:[10.1021/jp013616z](https://doi.org/10.1021/jp013616z).
- [39] S. Hammad, S. Bouaziz-Terrachet, R. Meghnam, D. Meziane, Pharmacophore development, drug-likeness analysis, molecular docking, and molecular dynamics simulations for identification of new CK2 inhibitors, *J. Mol. Model.* 26 (2020), doi:[10.1007/s00894-020-04408-2](https://doi.org/10.1007/s00894-020-04408-2).
- [40] A. Siwek, J. Stefanska, K. Dzitko, A. Ruszczak, Antifungal effect of 4-arylthiosemicarbazides against *Candida* species. Search for molecular basis of antifungal activity of thiosemicarbazide derivatives, *J. Mol. Model.* 18 (2012) 4159–4170, doi:[10.1007/s00894-012-1420-5](https://doi.org/10.1007/s00894-012-1420-5).



Design, Synthesis, Biological evaluation of Isonicotinoyl-pyrazolyl-coumarin derivatives and computational study

Sabrina Halit^a, Amina Benazzouz-Touami^a, Malika Makhloufi-Chebli^{a,*},
Souhila Terrachet Bouaziz^{b,c}, Karima Ighilahriz^a, Anthony Robert^d,
Carine Machado-Rodrigues^d

^a LPCM Laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University Mouloud Mammeri, 15000, Tizi-Ouzou, Algeria

^b Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University Mohamed Bouguerra, Boumerdes, Algeria

^c Laboratory of Theoretical Physics and Computer Chemistry, Faculty of Chemistry, USTHB, BP 32 El Alia, 16111 Bab-Ezzouar, Algiers, Algeria

^d University of Reims Champagne -Ardenne, Institute of Molecular Chemistry of Reims (ICMR), CNRS UMR 7312, UFR Exact and Natural Sciences, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2022

Revised 6 June 2022

Accepted 7 June 2022

Available online 10 June 2022

Keywords:

Coumarin

Isonicotinic acid hydrazide

Pyrazoline

Antioxidant activity

Antifungal activity

Molecular docking

ABSTRACT

A new series of 3-(5-Hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromen-2-one derivatives **3a-g** was efficiently synthesized under environmentally friendly reaction conditions by reaction of 3-acetoacetyl coumarin derivatives **1a-g** with isoniazid **2**. The reaction is conveniently performed at room temperature using Knorr pyrazole syntheses. The key features of this approach are its operational simplicity, the facile access to the desired products, and the good to excellent yields. The structures of the newly synthesized compounds were established by ¹H, ¹³C, 2D NMR spectroscopy and mass spectrometry. ¹H-¹⁵N HMBC experiments were also conducted to assess the regiochemistry of final compounds. All the synthesized compounds were evaluated for their *in vitro* antifungal activity against both *Candida albicans* and *Aspergillus niger* strains and compared to the standard drug Ketoconazole. Among all the compounds, **3d** and **3e** were the most effective, showing high potential antifungal inhibitory activities with respective MIC values of 15.62 µg ml⁻¹ for **3e** against *Aspergillus niger*. All the newly synthesized derivatives **3a-g** are evaluated for their antioxidant activity and showed good activity. SAR studies demonstrated that the presence of nitro and hydroxyl groups in the aromatic ring of the coumarin and pyrazoline rings conferred enhanced antioxidant and antifungal activity. In addition, molecular docking studies were performed for compound **3e** to evaluate its potential as an inhibitor of the fungal protein (Phytase A) from *Aspergillus niger* and the results suggested that our isonicotinoyl-pyrazolyl-coumarin may act as promising antifungal agent.

© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The combination of several heterocyclic entities offers the possibility to create new multicyclic compounds with new or improved biological activity [1–3]. Coumarins (2H-chromene-2-one) are natural compounds with a broad spectrum of biological activities. They are key intermediates that have acquired a special place in the heterocyclic and medical fields for the synthesis of new compounds due to their structural diversity and versatile activities such as anti-inflammatory, anticoagulant, and Alzheimer's disease (AD) inhibition [4], antiviral [5], antifungal [6], antioxidant [7] and anticancer [8,9]. Several studies have reported that the as-

sociation of the coumarin ring with various other heterocycles allows the generation of new hybrid molecules with significant biological activities. Different coumarin derivatives have shown remarkable antimicrobial and antitubercular activities in the form of heterocycle-based hybrids such as benzimidazole [10], thiazoles, imidazole, chalcones and pyrimidines [11–14]. Antimalarial potential [15] and anticancer properties of some new pyrazoline derivatives containing coumarin have also been reported [16]. In drug discovery and research, nitrogenous heterocyclic compounds have shown a wide range of pharmacological activities and the pyrazoline ring is one of the central structures of these various synthetic products. Pyrazoline derivatives are known for their different biological activities including antibacterial [17], antimicrobial [18], anti-inflammatory [19], antidepressant [20], antidiabetic [21] and antituberculosis [22]. Numerous studies have also shown that the linkage of the pyrazoline ring with other heterocyclic

* Corresponding author

E-mail addresses: malika.chebli@ummto.dz, malika_makhloufi@yahoo.fr (M. Makhloufi-Chebli).

moieties in hybridized form provides promising anti-cancer agents [23]. For the synthesis of nitrogenous heterocycles such as pyrazole, isoxazole, carbazole, imidazole and thiazole, several methods have been developed and β -diketones or 1,3-diketones are useful synthons for the preparation of these heterocycles [24–26]. Recent studies have shown that pyrazoline derivatives are active against many pathogenic mycobacteria and that incorporation of isoniazid (INH) into a pyrazoline moiety may result in more potent anti-tuberculous agents [27]. For more than 60 years, INH has been used as a first-line anti-tuberculosis drug in combination with rifampicin, ethambutol and pyrazinamide to treat TB infections and remains one of the most effective anti-tuberculosis drugs. Unfortunately, INH-resistant bacterial strains are becoming increasingly common, mainly due to the intensive and prolonged use of this drug [27]. Efforts have been made to develop INH hybrids as new anti-tuberculosis agents to overcome resistance, improve activity and decrease toxicity. In this context, we have chosen isoniazid as a reagent for the synthesis of new pyrazoline derivatives. Some pyrazole derivatives derived from the INH pharmacophore and coumarin have already been studied for their anti-mycobacterial activity in vitro and the compounds obtained have shown significant activity [28]. Therefore, the therapeutic properties associated with these three heterocycles make them useful structural units for drug discovery.

The QSAR/QSPR community has, for a good number of years, developed models for the prediction of physicochemical properties of interest in ADMET analysis (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity). This predicts candidates with a good balance of potency along with absorption, distribution, metabolism, excretion. Drug likeness is often used to show pharmacokinetic, estimate safety, toxicity and carcinogenicity of synthesized compounds. It is extensively integrated into the early stages of drug discovery and understanding of the processes in medicinal chemistry. It is a qualitative property of chemicals, based on the quantitative calculations of the relationship structure-activity [29, 30].

In view of the above considerations and in continuation of our interest in the synthesis of fused heterocycles [31–33], we describe here a novel and efficient strategy for the synthesis of a new series of 3-(5-Hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromen-2-one **3a-g** under mild conditions using 3-acetoacetyl coumarins as a key synthon. Selected compounds were also evaluated for their antioxidant and antifungal activity. Molecular docking analysis was performed to better understand the binding mode making the design antifungals inhibitors possible.

2. Experimental

2.1. Materials and methods

The chemicals reagents (Aldrich products) were used without further purification. Melting points were determined on a Stuart scientific SPM3 apparatus fitted with a microscope and are uncorrected. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in DMSO- d_6 solutions on Bruker Ascend 400 (400 MHz for ^1H and 101 MHz for ^{13}C) or on Bruker Avance Neo 500 (500.28 MHz for ^1H and 125.8 MHz for ^{13}C) spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (δ , ppm) and coupling constants (J) are given in hertz (Hz). They were recorded relative to solvent signal. Mass spectra are obtained with ESI. Positive-ion ESI mass spectra were acquired using a Q-TOF 2 instrument [diluting 1 mL of the sample chloroform solution (10^{-5} M) in 200 μL of 0.1% trifluoroacetic acid/methanol solution. Nitrogen was used as nebulizer gas and argon as collision gas. The needle voltage was set at 3000V, with the ion source at 80°C and desolvation temperature at 150°C. Cone voltage

was 35V]. UV-visible spectra were recorded using a Thermo scientific spectrophotometer-Evolution 220; measurements were made from 200 to 800 nm. The progress of these actions was monitored throughout by TLC plates (silica gel G) using mobile phase, chloroform: methanol (5:1), and the spots were identified by iodine vapors or UV light.

2.2. Procedure for the synthesis of 3-(Isonicotinoyl-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-2H-chromen-2-ones derivatives (3a-g)

In a 250 mL flat bottom flask with stirring, 1 mmol of the appropriate 3-acetoacetyl coumarin derivatives **1a-g** dissolved in 10 mL of chloroform, 1 mmol of isoniazid **2** dissolved in 5 mL of ethanol and 16 drops of hydrochloric acid were stirred at room temperature for an appropriate time. After completion of the reaction, as indicated by thin-layer chromatography (TLC), using a 5:1 mixture of CHCl_3 /methanol as eluent, the solid was separated by filtration and washed with cold chloroform and ethanol, and then air-dried.

2.2.1. 3-(5-Hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromen-2-one (3a)

White powder; Yield: 75 %; mp 209–212°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.02 (s, 3H, CH_3), 3.04 (d, $J=18.8$ Hz, 1H, CH_2), 3.43 (d, $J=18.8$ Hz, 1H, CH_2), 7.42 (m, 2H, H_{coum}), 7.65 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, H_{coum}), 7.91 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, H_{coum}), 7.97 (m, 2H, H_{pyr}), 8.39 (s, 1H, H_{coum}), 8.97 (m, 2H, H_{pyr}); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 16.22, 51.47, 89.61, 116.36, 119.30, 125.25, 125.45, 128.10, 129.43, 132.43, 140.08, 144.17, 150.04, 153.40, 158.47, 159.09, 161.68; MS (ESI+): m/z (%) = 350 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.2.2. 6-Hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromen-2-one (3b)

Yellow powder; Yield: 77 %; mp 219–222°C; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1.99 (s, 3H, CH_3), 2.97 (d, $J=18.9$ Hz, 1H, CH_2), 3.38 (d, $J=18.9$ Hz, 1H, CH_2), 7.09 (dd, $J=2.8, 8.9$ Hz, 1H, H_{coum}), 7.19 (d, $J=2.8$ Hz, 1H, H_{coum}), 7.26 (d, $J=8.9$ Hz, 1H, H_{coum}), 7.73 (s, br, OH), 7.94 (m, 2H, H_{pyr}), 8.25 (s, 1H, H_{coum}), 8.94 (m, 2H, H_{pyr}), 9.84 (s, br, OH); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 15.76, 51.09, 89.20, 112.88, 116.74, 119.35, 120.00, 124.96, 127.55, 139.56, 147.79, 146.28, 149.62, 154.10, 157.97, 158.86, 161.18; MS (ESI+): m/z (%) = 366 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.2.3. 7-Hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromen-2-one (3c)

Yellow powder; Yield: 74 %; mp 199–206°C; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1.99 (s, 3H, CH_3), 2.96 (d, $J=18.8$ Hz, 1H, CH_2), 3.36 (d, $J=18.8$ Hz, 1H, CH_2), 5.18 (s, br, OH), 6.79 (m, 1H, H_{coum}), 6.87 (dd, $J=2.0, 8.5$ Hz, 1H, H_{coum}), 7.69 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H_{coum}), 7.94 (m, 2H, H_{pyr}), 8.24 (s, 1H, H_{coum}), 8.94 (m, 2H, H_{pyr}), 10.78 (s, br, OH); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 15.79, 51.15, 89.33, 101.75, 111.19, 113.60, 122.70, 125.02, 130.22, 140.18, 143.68, 149.93, 154.91, 157.95, 159.06, 161.13, 161.51; MS (ESI+): m/z (%) = 366 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.2.4. 8-Hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromen-2-one (3d)

White powder; Yield: 88 %; mp 233–235°C; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2.00 (s, 3H, CH_3), 3.00 (d, $J=18.9$ Hz, 1H, CH_2), 3.41 (d, $J=18.9$ Hz, 1H, CH_2), 7.15–7.21 (m, 2H, H_{coum}), 7.27 (m, 1H, H_{coum}), 7.97 (m, 2H, H_{pyr}), 8.07 (s, br, OH), 8.29 (s, 1H, H_{coum}), 8.97 (m, 2H, H_{pyr}), 10.28 (s, br, OH); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 15.80, 51.07, 89.18, 118.23, 118.73, 119.78, 124.71, 125.10, 127.36, 140.05, 141.66, 143.49, 144.53, 149.99, 158.13, 158.60, 161.13; MS (ESI+): m/z (%) = 366 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.2.5. 3-(5-Hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-6-nitro-2H-chromen-2-one (3e)

White powder; Yield: 45 %; mp 211–217°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.03 (s, 3H, CH_3), 3.04 (d, $J=18.9$ Hz, 1H, CH_2), 3.46 (d, $J=18.9$ Hz, 1H, CH_2), 6.62 (s, br, OH), 7.68 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, H_{coum}), 7.95 (m, 2H, H_{pyr}), 8.44 (dd, $J=2.53, 9.09$ Hz, 1H, H_{coum}), 8.59 (s, 1H, H_{coum}), 8.95 (m, 3H, 2 H_{pyr} 1 H_{coum}); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 16.22, 51.33, 89.43, 117.98, 119.77, 125.32, 125.38, 126.98, 130.18, 139.07, 144.34, 144.40, 149.72, 156.94, 158.18, 158.55, 161.81; MS (ESI+): m/z (%) = 395 (100) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

2.2.6. 3-(5-Hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-6-iodo-2H-chromen-2-one (3f)

White powder; Yield: 85 %; mp 222–227°C; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2.00 (s, 3H, CH_3), 2.98 (d, $J=18.9$ Hz, 1H, CH_2), 3.41 (d, $J=18.9$ Hz, 1H, CH_2), 5.41 (s, br, OH), 7.26 (d, $J=8.7$ Hz, 1H, H_{coum}), 7.88–7.94 (m, 3H, H_{pyr} , H_{coum}), 8.31–8.34 (m, 2H, H_{coum}), 8.92 (m, 2H, H_{pyr}); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 15.76, 50.96, 88.55, 89.00, 118.22, 121.14, 124.75, 128.65, 136.88, 138.26, 140.00, 144.24, 149.02, 152.53, 157.93, 158.14, 161.38; MS (ESI+): m/z (%) = 476 (100) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

2.2.7. 2-(5-Hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-3H-benzo[f]chromen-3-one (3g)

Beige powder; Yield: 76 %; mp 217–225°C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.06 (s, 3H, CH_3), 3.11 (d, $J=19.2$ Hz, 1H, CH_2), 3.51 (d, $J=19.2$ Hz, 1H, CH_2), 5.07 (s, br, OH), 7.62 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, H_{coum}), 7.67 (t, $J=7.6$ Hz, 1H, H_{benz}), 7.81 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, H_{benz}), 8.01 (m, 2H, H_{pyr}), 8.10 (d, $J=8$ Hz, 1H, H_{benz}), 8.23 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, H_{coum}), 8.51 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H_{benz}), 8.99 (m, 2H, H_{pyr}), 9.11 (s, 1H, H_{coum}); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 16.23, 51.42, 89.98, 113.11, 116.80, 122.37, 125.54, 126.71, 127.34, 129.08, 129.20, 129.50, 130.43, 133.81, 135.65, 144.13, 150.04, 153.12, 158.70, 159.02, 161.73; MS (ESI+): m/z (%) = 400 (100) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

2.3. In vitro antioxidant evaluation

The antioxidant activity (free radical scavenging activity) of the synthesized compounds **3a–g** was evaluated by using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH $^{\cdot}$) scavenging assay [34]. DPPH $^{\cdot}$ solution was prepared by dissolving DPPH $^{\cdot}$ in ethanol to give a concentration of 4 mg/100 mL. Compounds **3a–g** were dissolved in DMSO to obtain a 10^{-1} M solution. The solutions of test compounds were diluted with DMSO to get final concentrations of 0.05, 0.025, 0.0125 and 0.00625 mol/L for all the compounds. The standards were further diluted to give additional concentration solutions of 0.00625, 0.003125, 0.0015625 and 0.000781 mol/L. Each tested concentration of each compound (40 μL) was added to each well separately in duplicate and then DPPH $^{\cdot}$ solution (2 mL) was added. Each negative control wells were loaded with DMSO (40 μL) and DPPH $^{\cdot}$ solution (2 mL). After vortexing, the mixtures were incubated at room temperature for 1 h in darkness at 25°C, and then the absorbance of these compounds at different concentrations was recorded at 517 nm. Ascorbic acid (AA) was used as standard for the antioxidant activity screening. A blank containing only ethanol with DMSO was used as the control. Each measurement was performed in triplicate. The reduction of the DPPH radical was measured by monitoring continuously the decrease of absorption at 517 nm. DPPH scavenging effect was calculated as percentage of DPPH discoloration using Eq. (1):

$$\text{RSA}(\%) = [(\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac}] \times 100 \quad (1)$$

Where Ac is the absorbance of the control (absorbance of DPPH $^{\cdot}$ ethanol solution without sample), and As is the absorbance of the sample compounds tested after 60 min incubation.

2.4. In vitro antifungal evaluation

Antifungal properties and minimum inhibitory concentrations (MIC) of compounds **3a–g** were evaluated by the disk diffusion method [35,36], against the yeasts *Candida Albicans* and *Aspergillus Niger*. The test compounds **3a–g**, previously dissolved in DMSO at a concentration of 5 mg/mL, were impregnated on sterile paper disks (6 mm diameter). The disks were then sterilely placed on Sabouraud agar, previously inoculated with the microbial suspension, and then incubated for 48 h (*Candida albicans*) and 7 days (*Aspergillus niger*) at 37°C. Antifungal activity was evaluated by measuring the diameter of the inhibition zone. The MIC is defined as the lowest concentration of the product for which no growth is visible to the naked eye. To determine it, a series of dilutions in DMSO of different solutions of the active compounds at concentrations ranging from 500 to 3.91 $\mu\text{g/mL}$ was prepared, 1 mL of each concentration was mixed with 9 mL of SAB medium distributed in Petri dishes, and then the fungal suspension was seeded on the surface of the agar medium. The plates were then incubated for 48 hours for *Candida Albicans* and 7 days for *Aspergillus Niger* at 37°C.

2.5. Computational studies

2.5.1. DFT studies

All theoretical calculations were performed with ORCA V.04 program [37]. All molecular structures were geometrically optimized at the Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr (B3LYP) level of theory by using the 6-311G** basis set and LANL2DZ for iodine [38]. Frequency calculation was performed at the same level of theory. To explain the reactivity and the biological activities of synthesized compounds, several descriptors, such as ionization energies (E_i) [39], electron affinity (A_e) [40], chemical potential (μ) [41], electrophilicity (ω) [42], softness (S) [43] and chemical hardness (η) [44], were calculated using formulas below:

$$E_i = E_{N-1} - E_N \quad (2)$$

$$A_e = E_{N+1} - E_N \quad (3)$$

$$\chi = -\mu = \frac{1}{2}(E_i + A_e) \quad (4)$$

$$\eta = \frac{1}{2}(E_i - A_e) \quad (5)$$

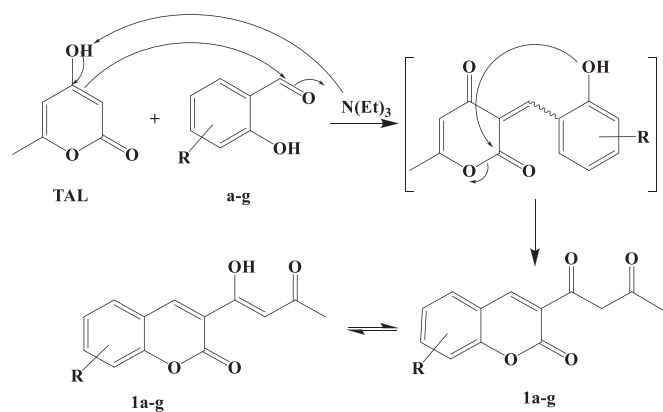
$$S = \frac{1}{2\eta} \quad (6)$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (7)$$

Where E_N , E_{N-1} and E_{N+1} are the total ground-state energies in the neutral N and singly charged (N-1) and (N+1) configurations, respectively.

2.5.2. Molecular docking

With the aim of rationalizing the significant antifungal activity demonstrated by **3e** in the *in vitro* assay and to gauge its plausible mechanism of action, a molecular docking study was performed against the fungal receptors from *Aspergillus niger*. As compound **3e** is chiral, the (R) and (S)-enantiomers were used in the docking calculations. Thus, the molecular model (*Aspergillus niger*) PDB ID : 3K4Q, corresponding to a *Aspergillus niger* fungal protein (Phytase A) complexed with the reference ligand, myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis phosphate (HIS), was retrieved from the Protein Data Bank server (<http://www.pdb.org>) and was used as receptors in molecular docking simulations with AutoDock 4.1 software [45]. One monomer was considered and the substrate cofactors, the crystallographic water molecules, and the co-crystallized ligand were



Scheme 1. Synthesis of 3-acetoacetylcoumarins **1a-g**.

deleted [46]. The active site was defined by selecting all residues that are located no farther than 6 Å from center of reference ligand [47]. The optimized geometries of the two enantiomers of compound, **3e**, and the standard drug ketoconazole, were used as flexible ligands during the molecular docking simulation. Thus, a grid map with $54 \times 56 \times 54$ points around each of the modeled domains was used with a grid point spacing of 0.375 Å. The Lamarckian genetic algorithm (LGA) was used in the docking procedure and 50 independent runs with 2500000 energy evaluations and a maximum number of generations of 30000. The resulting dock pose of each ligand docked into protein was analyzed for their hydrogen bond interactions with the receptor and were visualized using AutoDoTools software [48].

3. Results and discussion

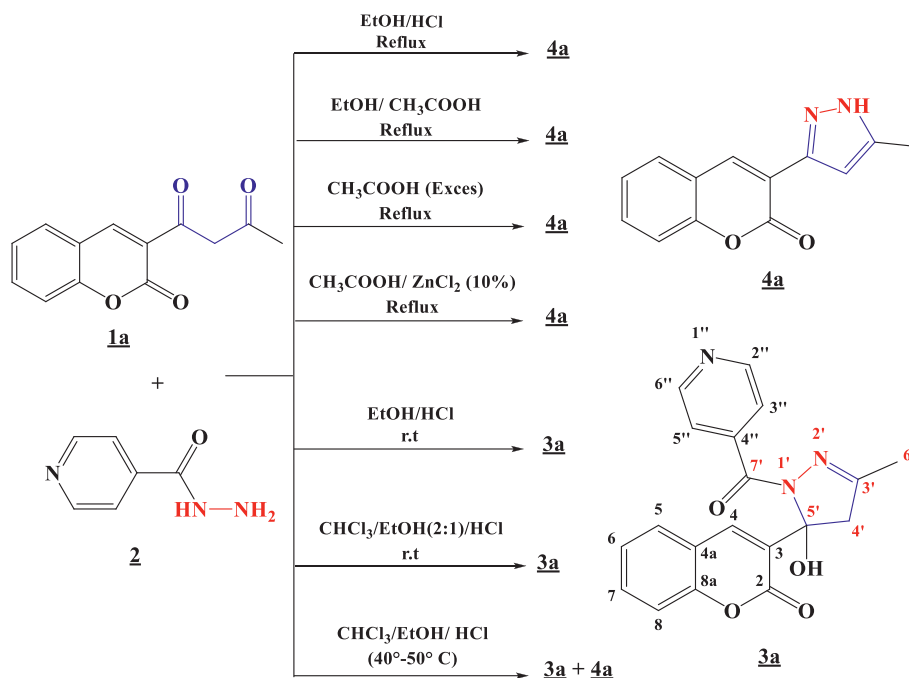
3.1. Chemistry

The synthesis of 3-(5-Hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromen-2-one derivatives **3a-g** was

performed by the synthetic route described in Schemes 1 and Schemes 2. From this scheme, it is apparent that the new target molecules possess both coumarin and pyrazoline units. The reaction of 1-(2-Oxo-2H-chromen-3-yl) butane-1,3-dione **1a** with isoniazid **2** appears to be a convenient route for the synthesis of the desired molecules. Starting material 3-acetoacetylcoumarin derivatives **1a-g** were recently synthesized in our laboratory from substituted salicylaldehydes and 4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-one (triacetic lactone acid = TAL) by a microwave-assisted Knoevenagel condensation and intramolecular transactonization process in an organobasic medium (Scheme 1); they are essential components, as they contain a coumarin core and an active methylene group of the acetoacetyl moiety, which is susceptible to further interesting chemical transformations [49].

To optimize the reaction conditions, we studied the condensation of 3-acetoacetylcoumarin **1a** with isoniazid **2** under different reaction conditions and the results are summarized in Table 1 and Scheme 2. Efforts to convert compound **1a** to the target molecule **3a** under various conditions by heating were not successful. Indeed, several reaction conditions such as concentrated hydrochloric acid or acetic acid as catalysts and ethanol as solvent, acetic acid as solvent and zinc chloride as catalyst (10% and 20% ZnCl_2) under reflux or with heating at 40–50°C were tested (Table 1, entries 1–6) and gave the unsubstituted pyrazole **4a**. As indicated in Scheme 3, heating probably caused dehydration at the OH in the 5-position, which led to the removal of the isoniazid moiety. Therefore, the reaction was repeated in absolute ethanol and conc. HCl as a catalyst at room temperature, and after stirring for 24 hours the desired product **3a** was isolated.

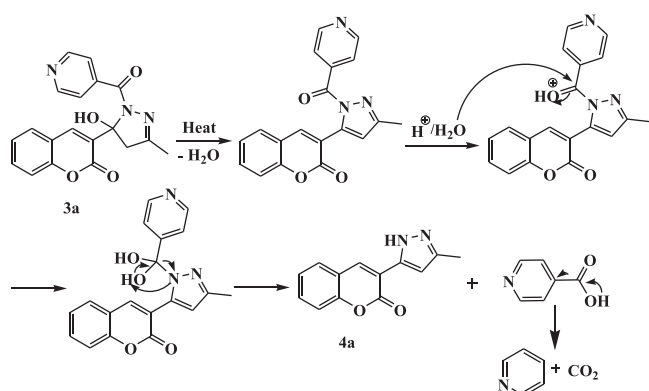
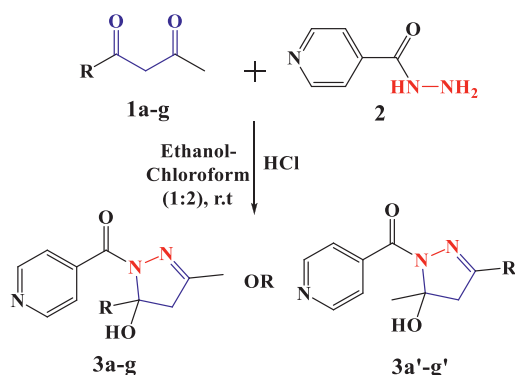
A catalytic amount of HCl in chloroform/ethanol (2:1) and at room temperature was found to be the most efficient process in terms of yield and reaction rate to obtain compound **3a**. After setting the operating conditions, reactions with the different 3-acetoacetylcoumarin derivatives **1b-g** and isoniazid **2** were performed (Scheme 4). Catalyst and temperature were shown to play an important role in this reaction. It was found that the yield of compounds **3a-g** was significantly affected by the substituent on the coumarin ring (Table 2).



Scheme 2. Condensation of 3-acetoacetylcoumarin **1a** with isoniazid **2** under different reaction conditions.

Table 1The condensation of 3-acetoacetylcoumarin **1a** with isoniazid **2** under different reaction conditions.

Entry	Solvent	Catalyst	Temperature (°C)	Obtained Compound
1	Ethanol	HCl (20 drops)	Reflux	4a
2	Ethanol	CH ₃ COOH	Reflux	4a
3	CH ₃ COOH	CH ₃ COOH	Reflux	4a
4	CH ₃ COOH	ZnCl ₂ 10%	Reflux	4a
5	Chloroform-Ethanol	HCl (16 drops)	40-50	3a + 4a
6	(2:1)	HCl (16 drops)	Room	3a
7	Ethanol	HCl (16 drops)	Room	3a
	Chloroform-Ethanol			
	(2:1)			

**Scheme 3.** A plausible mechanism for the formation of compound **4a**.

3a: R = 2*H*-chromen-2-one (75%)
3b: R = 6-Hydroxy-2*H*-chromen-2-one (77%)
3c: R = 7-hydroxy-2*H*-chromen-2-one (74%)
3d: R = 8-hydroxy-2*H*-chromen-2-one (88%)
3e: R = 6-Nitro-2*H*-chromen-2-one (45%)
3f: R = 6-Iodo-2*H*-chromen-2-one (85%)
3g: R = 3*H*-benzo[*f*]chromen-3-one (76%)

Scheme 4. Possible products following the reaction between molecules **1a-g** and **2**.

The best yields (**88%**) were obtained using 3-acetoacetyl-8-hydroxycoumarin (**1d**), followed by (**1f**), (**1c**) and (**1g**). The lowest yield (**45%**) was obtained using (**1e**). These results indicate that the withdrawing substituents of 3-acetoacetyl coumarin facilitate the reaction and afford the product in better yields. The structures and purities of the resulting products were deduced from their elemental analysis, NMR data (extensive 2D NMR analyses: COSY, HSQC, HMBC) and mass spectrometry. As a representative example, the ¹H NMR spectrum of **3b** shows two singlets at δ_H 1.99 and 8.25 ppm which are attributed to the proton resonances of the methyl group and the H-4 proton of the coumarin ring respec-

Table 2Synthesis of 3-(Isonicotinoyl-5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-2*H*-chromen-2-ones derivatives **3a-g** catalyzed by conc. HCl in mixture of chloroform-ethanol (2:1) at r.t.

Entry	Compound	R	Yield (%)
1	3a		75
2	3b		77
3	3c		74
4	3d		88
5	3e		45
6	3f		85
7	3g		76

tively. It shows two multiplets at δ_H 8.94 ppm (H-2'',6'') and δ_H 7.94 ppm (H-3'',5'') which are attributed to the protons of the pyridine ring, and two other doublets at δ_H 2.97 and δ_H 3.39 ppm corresponding to the two protons Ha-4' and Hb-4' of the pyrazoline ring. The other aromatic protons of the benzopyranone appeared as doublets or as doublets of doublets at δ_H 7.09, 7.20 and at 7.27 ppm. With the help of HSQC spectroscopy, all protonated carbons could be assigned, especially the peak at δ_H 51.09 ppm assigned to the methylene carbon C-4', and at δ_H 139.56 ppm, assigned to the carbon C-4, and the two peaks at δ_H 124.96 and δ_H 143.79 ppm assigned to the pyridinic carbons (C-3'',C5'') and (C-2'',C6''), respectively. The connectivities found in the HMBC spectra allowed us to assign the resonances of the quaternary carbons and to confirm the assignments of some of the proton-bearing carbons. In the HMBC connectivities, H-4 correlates with C-2, C-3, C-8a, and C-4a, H-5 correlates with C-4a, C-6, C-8a and we also have a correlation between H_b-4 and C-3.

In order to confirm which regioisomer is obtained (**3b** or **3b'**), a ¹H-¹⁵N HMBC NMR analysis was performed (Fig. 1). The ¹H-¹⁵N HMBC NMR sequence showed that there is a correlation between ¹⁵N at 234 ppm (N_{pyr}) and H-2'', H-3'', H-5'' and H-6''. Another correlation was observed between ¹⁵N at 310 ppm (=N-) with H-4' and CH₃ at the C3' position and there is also a correlation between ¹⁵N at 212 ppm (-NR₁R₂) with H-4' and H-4. The three ¹⁵N signals observed in Fig. 1 at 310 ppm, 234 ppm and 212 ppm therefore al-

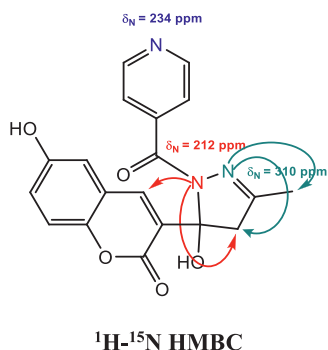


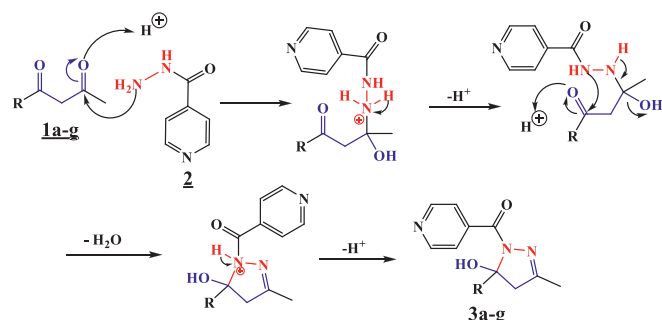
Fig. 1. Main ¹H-¹⁵N correlations of 6-Hydroxy-3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromen-2-one (**3b**).

lowed us to confirm the proposed structure for molecule **3b**. Since the NMR pattern of compound **3b** is very similar to those of the other derivatives **3a,c-g**, their structures was assumed to be of the same regiochemistry.

3.2. Mechanism proposal for the synthesis of 3a-g

Usually, the classical synthesis of pyrazoles involves a cyclocondensation reaction between an appropriate hydrazine and a 1,3-dicarbonyl derivative or a α,β -unsaturated ketone. The mechanism of the reaction involves first the formation of an imine followed by dehydrating cyclization to form a pyrazole [24,26]. However, our results showed that by using 3-acetoacetyl coumarin derivatives **1a-g** as a 1,3-diketone reagent and isoniazid **2** as a binucleophilic reagent, removal of the water molecule at the C-5' position did not occur (Scheme 5) and the dehydration occurred only at the C-3' position. This result can be explained by the formation of a hydrogen bond between the hydrogen atom of the hydroxyl group at C-5' and the oxygen of the carbonyl at position 2 of coumarin, which stabilizes the latter and prevents elimination of the water molecule and aromatization of the pyrazoline ring. Numerous studies have shown that the presence of electron withdrawing groups on the C-5', C-3', or N-1' dihydropyrazole inhibits the dehydration process at the C-5 position [24,50,51].

In order to verify this hypothesis, theoretical calculations were carried out to study the stability of the compounds obtained. All molecular structures were geometrically optimized at the Becke-theoretical, three-parameter, Lee-Yang-Parr (B3LYP) level using the 6-311G** basis set [37,38]. The calculation of the enthalpy values of the two supposed structures **3a₁** and **3a₂** (Fig. 2) shows that **3a₁** has the lowest enthalpy value, which confirms its stability and its formation at the end of the reaction.



Scheme 5. Plausible mechanism for the synthesis of substituted 3-(5-methyl-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromen-2-one **3a-g**.

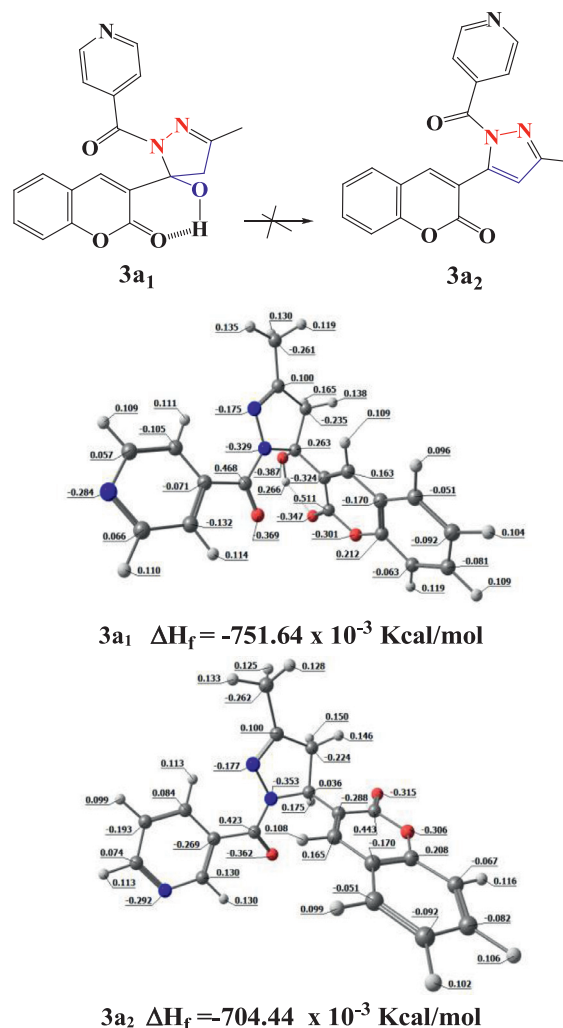


Fig. 2. Enthalpies calculations of structures **3a₁**, **3a₂** and hydrogen bending in structure **3a₁**.

Table 3

UV-visible spectroscopic characteristics of compounds **3a-g** in DMSO.

Compound	λ abs (nm)	Compound	λ abs (nm)
3a	279 π-π*	3e	273 π-π*
	319 π-π*		330 π-π*
3b	280 π-π*	3f	278 π-π*
	348 π-π*		327 π-π*
	268 π-π*	3g	269 π-π*
3c	330 π-π*		315 π-π*
			354 π-π*
3d	271 π-π*		
	295 π-π*		

3.3. Spectroscopic study, Effect of the substituent on the UV-visible spectrum

The UV-vis absorption spectra of compounds **3a-g** at 10⁻⁵ M concentration were recorded immediately after products dissolution in DMSO. All the compounds show two absorption bands which are attributed to the π-π* transition of the conjugated backbones (Fig. 3).

The absorption maximum wavelengths (λ_{max}^{abs}) were observed in the ranges 268-280 nm, 290-330 nm and 350-400 nm (Table 3). The absorption spectra of the products obtained showed that the spectral shapes are very similar, as all these compounds possess

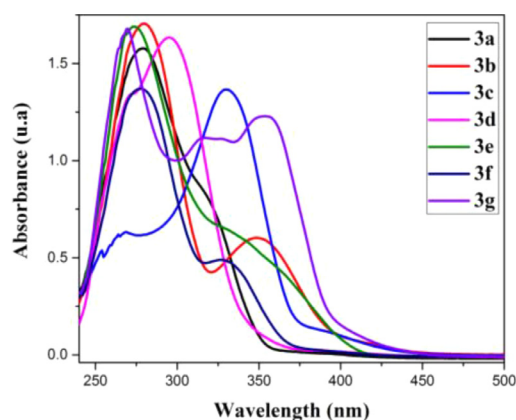


Fig. 3. Absorption spectra of compounds **3a-g** in DMSO.

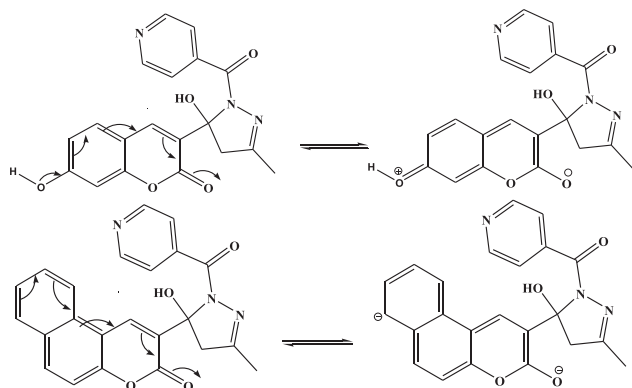


Fig. 4. Possible resonance structures of compounds **3c** and **3g**.

the same central core. The difference in wavelength and absorption intensity values is due to the effect of the presence or absence and position of the substituent group on the coumarin ring. The results indicate that the position of the hydroxyl group on the coumarin ring influences the maximum absorption. Compound **3c** with hydroxyl substituent in position 7 of the benzo ring show the highest wavelength due to an extended electron cloud (Fig. 4). In case of compound **3g** the wavelengths λ_{abs2} and λ_{abs3} appear as shoulders.

3.4. Biological studies and structure-activity relationships (SAR)

3.4.1. Antioxidant activity

Excessive free radicals in the human body can interact with numerous substances such as fatty acids, proteins, DNA to capture their hydrogen atoms, causing damage to the relevant cell structure and function, thereby leading to a variety of diseases. Hydroxyl substituents on the basic skeleton of coumarins are active radicals scavenging free radicals. Substitution positions and forms of hydroxyl groups have a significant effect on the antioxidant activity. It is found that the hydroxyl on the benzene ring is the main active sites of scavenging free radicals of antioxidant activity [52].

Antioxidant activity of the synthesized compounds **3a-g** are evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH $\cdot$) free radical scavenging assays. Antioxidant activity is related to the ability to donate electrons or a hydrogen proton to the DPPH radical. Fig. 5 shows the variation of absorbance as a function of the concentration of the different compounds in comparison with ascorbic acid (AA) as a control treatment. The IC_{50} values were determined for all compounds and presented in Fig. 6.

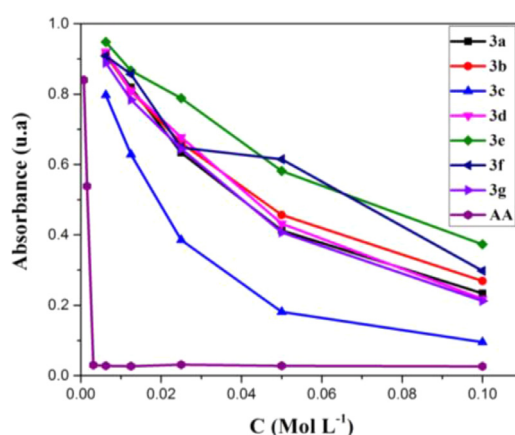


Fig. 5. The variation of absorbance versus concentration of the different compounds **3a-g** and AA.

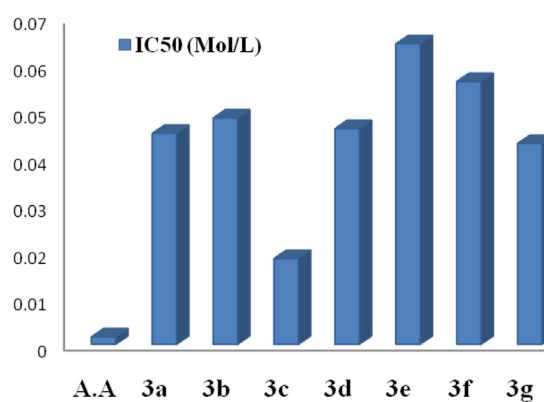


Fig. 6. IC_{50} (mol/L) values of the antioxidant activity for compounds **3a-g** and the standard AA.

All compounds have a moderate to good activity. Product **3c** is the most active product of this series ($IC_{50} = 0.0184$ M), followed by compounds **3g** and **3a** ($IC_{50} = 0.0430$ M and 0.0452 M respectively). The results show that the position and the number of hydroxyl groups have a significant effect on the antioxidant activity. The best inhibition was observed when the OH group is in meta-position **3c** ($IC_{50} = 0.0184$ M) followed by compound **3d** ($IC_{50} = 0.0462$ M) (ortho-position) then **3b** ($IC_{50} = 0.0485$ M) (para-position). The substitution of the coumarin moiety by the nitro (NO_2) and halogen (I) groups decreases the activity. The order of activity regarding substitution on the coumarin ring for compounds **3a-g** is 7-OH > 8-OH > 6-OH > 6- NO_2 > 6-I. The reason for this is that the phenol hydroxyl group possesses electron donor groups to form a stable free radical after the hydrogen supply.

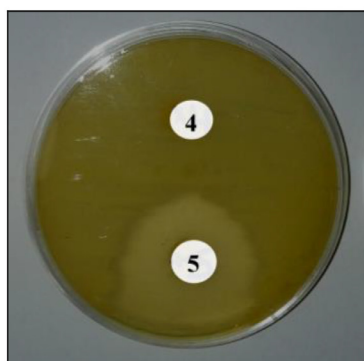
3.4.2. Antifungal activity

The antifungal activities of coumarins, confirmed that many synthesized coumarins were found to inhibit the growth of several strains of microbial. The free 8-OH was found to be important for antifungal activity, i.e.-the antifungal ability was significantly decreased when C-6 hydroxyl had a protective group. However, the free hydroxyl group at C-8 position in the coumarin parent nucleus is important for antibacterial activity. [53].

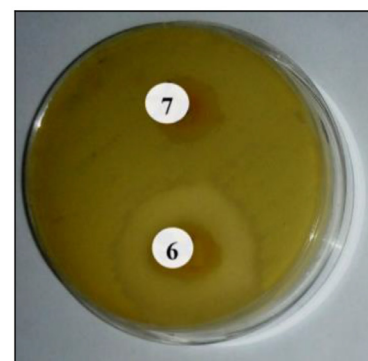
All the newly synthesized **3a-g** compounds were evaluated for their in-vitro antifungal activity against two strains, namely *Candida Albican* and *Aspergillus niger*, using the disk diffusion technique and ketoconazol was used as the standard antifungal agent. The results of the in-vitro antifungal activity of the tested compounds are summarized in Table 4 and representative photographs

Candida albicans

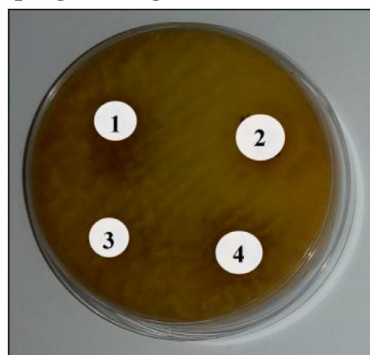
AF1



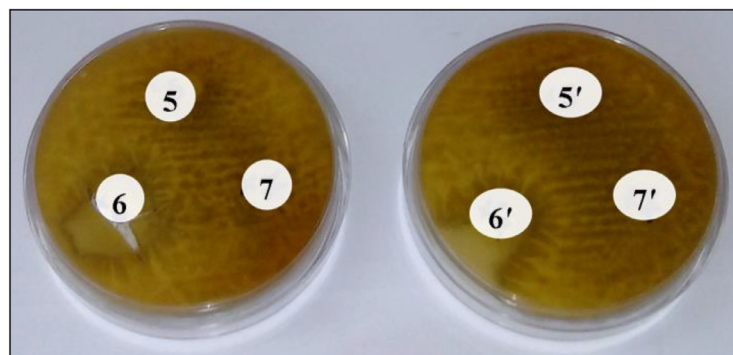
AF2



AF3

Aspergillus niger

AF4



AF5

Fig. 7. Antifungal activities by zone of inhibition in Petri dishes of **3a-g** derivatives (AF1 to AF5).

Table 4

In-vitro antifungal activity and diameter (mm) of the inhibition zone of 3-(5-hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromen-2-on derivatives against selected strains.

Tested compound	Diameter of the inhibition zone of the synthesis products (mm)	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
3a	-	-
3b	-	-
3c	-	-
3d	27	-
3e	26	18
3f	-	-
3g	-	-
Ketoconazole	22	22

of disc diffusion methods are depicted in Fig. 7. The results reveal that *Candida albicans* exhibits resistance to all compounds except compound **3d** (–OH-C8) (27 mm) and **3e** (NO₂-C6) (26 mm) Fig. 7 (AF2 and AF3 respectively) which are more active than ketoconazole (22 mm). All compounds were inactive against *Aspergillus niger* except compound **3e** (18 mm) which showed good activity compared to the standard Fig. 7 (AF5). This study shows that C-8 free hydroxyl group is necessary for anti-fungal activity. The free hydroxyl group at the C-8 position or NO₂ at C-6 position endows the coumarin a broad-spectrum antimicrobial activity. Based on these results, the minimum inhibitory concentration (MIC) required to inhibit fungal growth was determined and represented in Table 5. Comparing their MIC values, *Aspergillus niger* strain showed low resistance to compound **3e** compared to *Candida albicans* strain (MIC = 15.625 µg/mL and 31.25 µg/mL respectively). Against *Candida albicans*, the antifungal activity of compound **3e** (MIC = 31.25 µg/mL) was better than compound **3d** (MIC =

Table 5

Minimum Inhibitory Concentration (MIC in µg/mL).

Tested compounds	Minimum inhibitory concentration (MIC's) in µg ml ⁻¹	
	Antifungal activity	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
3d	250	-
3e	31.25	15.625
Ketoconazole	6.25	6.25

250 µg/mL) and close to that of the standard drug ketoconazole (MIC = 6.25 µg/mL)

3.5. Computational studies

3.5.1. DFT study

In the present study, DFT calculations were performed to get insight into the electronic properties of synthesized compounds. Fig. 8 shows the distribution of frontier molecular orbitals (HOMO and LUMO). Energy levels of the frontier molecular orbitals give information on the possible electronic transition. Analysis of results reported in this figure shows that the HOMO orbitals are localized, in the case of compounds **3a** and **3e**, on the 4,5-Dihydro-1H-pyrazole moiety and carbonyl group whereas in the other compounds (**3b**, **3c**, **3d**, **3f**, **3g**) it is localized on the 2H-chromen-3-yl moiety. On the other hand, the LUMO orbitals are mainly situated on 2H-chromen-3-yl moiety for all compounds except compound **3g** where this orbital was localized on the pyridine ring and carbonyl group. Besides, the comparison between the calculated HOMO energies values indicates that **3d**, **3b** and **3g** are the most reactive compounds and **3f** the lowest one. It is worth mentioning that higher HOMO energy is an indicator of good electron donor and higher antioxidant activity [54,55].

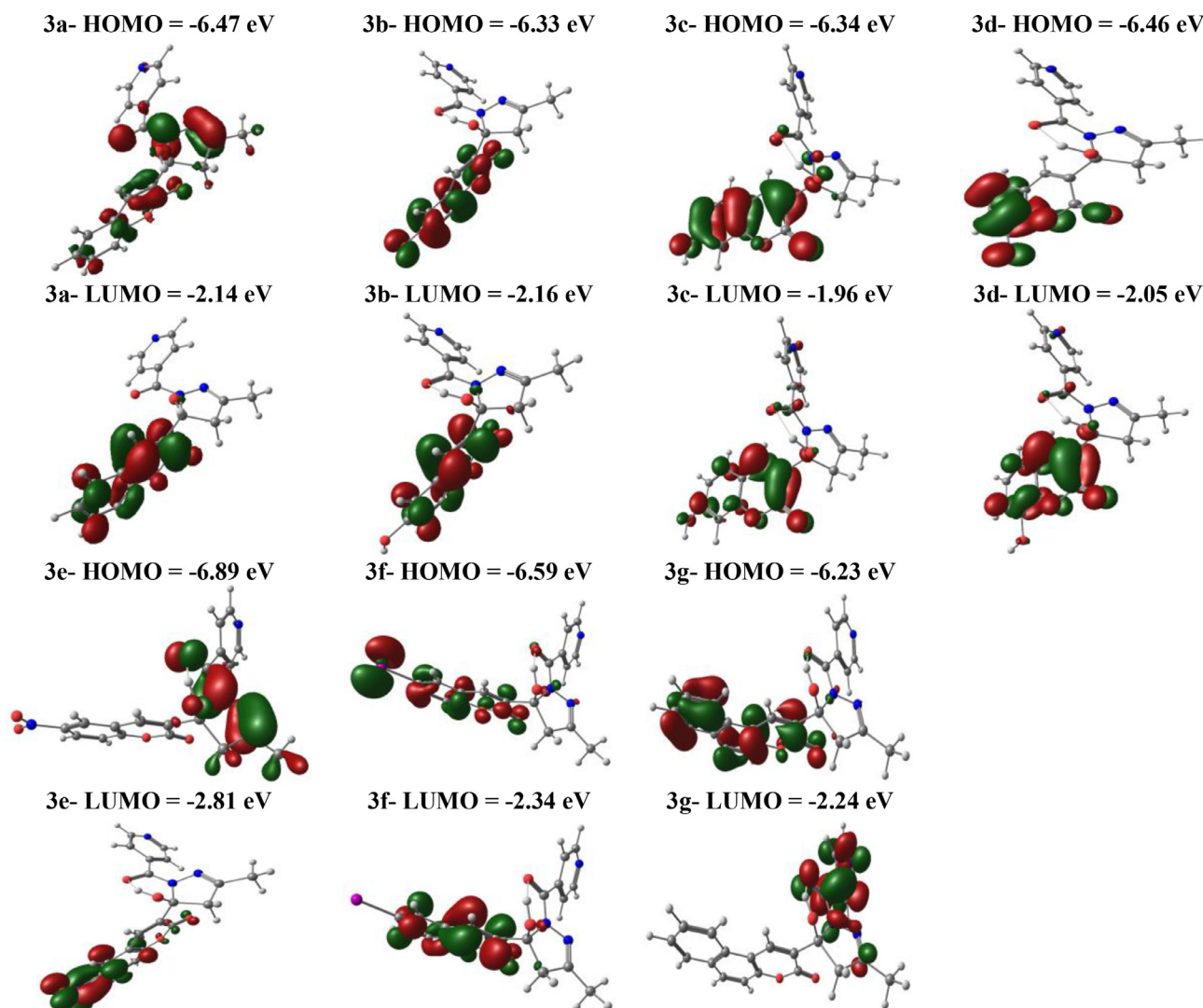


Fig. 8. The values and the representations of HOMO and LUMO orbitals for isonicotinoyl-pyrazolyl-coumarin.

Table 6

Global reactivity descriptors of synthesized isonicotinoyl-pyrazolyl-coumarin, ionization energies (E_i), electron affinity (A_e), chemical potential (μ), electrophilicity (ω), softness (S) and chemical hardness (η).

N°	E_i (eV)	$ A_e $ (eV)	μ (eV)	η (eV)	S (eV)	ϕ (eV)
3a	7,89	0,82	-3,54	4,35	2,18	1,44
3b	7,76	0,68	-3,54	4,22	2,11	1,48
3c	7,40	0,49	-3,46	3,95	1,97	1,51
3d	8,00	0,71	-3,65	4,35	2,18	1,53
3e	8,16	1,36	-3,40	4,76	2,38	1,21
3f	7,89	0,82	-3,54	4,35	2,18	1,44
3g	7,62	0,82	-3,40	4,22	2,11	1,37

Table 6 reports the calculated global reactivity descriptors calculated for our new synthesized compounds. The analysis of results shows that compound **3c** has the lowest ionization energies (E_i) followed by **3b** and **3g**. This can be explained by the electron donating ability and the highest antioxidant activities of these compounds. These results are in perfect agreement with our in vitro evaluation. The calculated values of chemical hardness (η) and softness (S) for compound **3c** is lower than those calculated for other compounds followed by that calculated for compound **3g** and **3b**. This mean that charge transfer process is more important in these compounds where biological activities are high. On the other hand, the electron affinity (A_e) and ionization energies cal-

culated for compound **3e** were higher compared to that of other compounds revealing that this compound is the best electron acceptor. Analysis of calculated values of electrophilicity (ω), shows that compounds **3d** and **3c** are more electrophilic with respect to other molecules studied, showing that these two compounds would be more susceptible to nucleophilic attack. Note that, electrophilicity index measures the stabilization in energy when the system acquires an additional electronic charge from the environment. On the other hand, compound **3e** have the lower electrophilicity index which mean that this compound is less toxic than other compounds [56]. This result probably is responsible for the good antifungal activity obtained in vitro evaluation for this compound.

3.5.2. Molecular docking

Molecular docking study was performed to evaluate the binding interaction of synthesized compounds at the active site of fungal protein in order to correlate our in vitro experimental results. The details of interaction sites, residues involved and bonding types and ligand-interacting moieties between the *Aspergillus niger* fungal protein (Phytase A) and compound **3e** (R and S enantiomer) and ketoconazole are given in Fig. 9. Comparison of the binding mode of synthesized compounds with the Xray structure of NDP shows that binding mode of studied compounds is in-

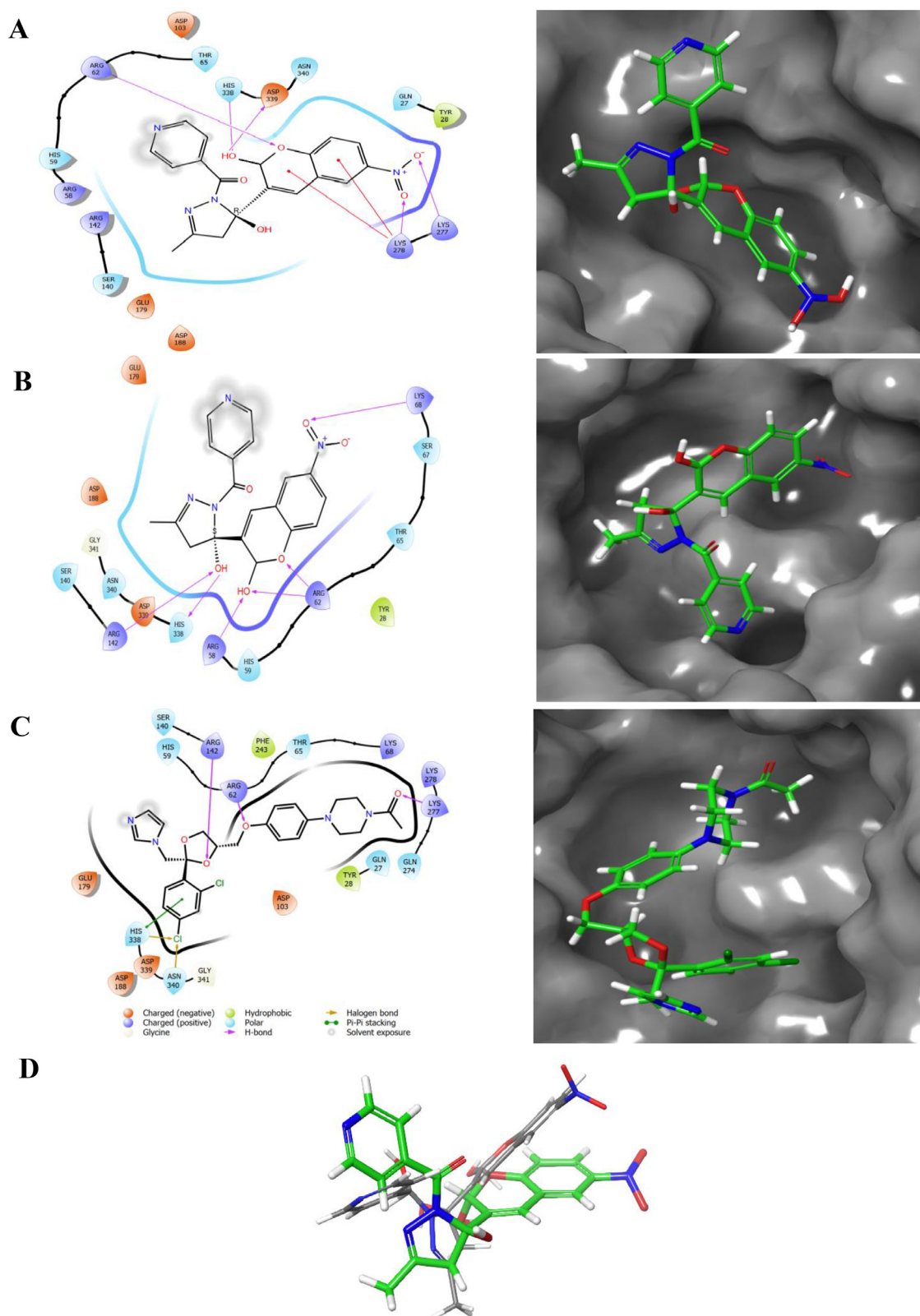


Fig. 9. 2D and 3D views of the docked conformation of A- **3e** (**S**), B- **3e** (**R**) and C- ketoconazole with fungal protein, (D) superposition of the docked conformations of the (**R**) (green stick) and (**S**)-enantiomers (gray stick).

Table 7Hydrogen bonds interactions, interacting residues, and binding energies ($\Delta E_{\text{Binding}}$), calculated for synthesized compound **3e** and standard with Phytase A protein.

Compound	H-Bond/Halogen-Bond	Interacting residues (< 4 Å)	$\Delta E_{\text{Binding}}$ (kcal/mol)
3e (R)	Lys277 (d = 2.71 Å) Lys278 (d = 3.10 Å) Arg62 (d = 1.99 Å) Asp339 (d = 2.01 Å) His338 (d = 1.96 Å) Tyr28 (d = 2.11 Å)	π-cation : Lys278 Charged (positive and negative) : Asp188, Glu179, Asp339, Asp103, Arg62, Arg58, Arg142, Lys278, Lys277 Polar : His59, Thr65, His339, Asn340, Gln27, Ser140, Hydrophobic : Tyr28	-10.81
3e (S)	Lys68 (d = 1.90 Å) Arg62 (d = 3.1 Å and d = 2.1 Å) Arg58 (d = 2.2 Å) Arg142 (d = 2.3 Å)	Charged (positive and negative) : Glu179, Asp188, Asp339, Arg142, Arg58, Arg62, Lys68 Polar : Ser140, Asn340, His338, His59, Thr65, Ser67 Hydrophobic : Tyr28	-10.11
Ketoconazole	H-Bond : Arg142 (d = 2.9 Å) Arg62 (d = 3.1 Å) Lys277 (d = 2.7 Å) Halogen-Bond : His338 (d = 2.3 Å) Asn340 (d = 2.5 Å)	π-πstacked : His338 Charged (positive and negative) : Arg142, Arg62, Lys68, Lys278, Lys277, Asp103, Asp339, Asp188, Glu179, Polar : Ser140, His59, Thr65, Gln274, Gln27, His338, Asn340 Hydrophobic : Tyr28, Phe243	-4.71

deed most closely related to that observed in the crystallographic complex [57].

As stated in antifungal activity section, compound **3e** was found to be the most active compound against *Aspergillus niger* fungal protein. Thus, molecular docking studies were conducted to investigate the possible interaction of this compound with *Aspergillus niger* fungal protein. As the compound **3e** is chiral, its two enantiomers (R and S) were used. The results are compared with docked conformation of standard drug used as in this study as reference. Analysis of results showed that both R and S enantiomers of compound **3e** are able to fit in the binding pocket of fungal protein with high binding energies -10.88 kcal/mol and -10.11 kcal/mol, respectively (Table 7). It was reported that key residues are Tyr28, Arg62, Lys277, His338, Asp339 [58]. Our synthesized compounds show a good fitting within the active site. Thus, the R enantiomer was bound to the catalytic active site though five hydrogen bonds, π -cation and van der Waals interactions with the amino acids of active site of studied protein. The hydroxyl of the chromen moiety establishes two hydrogen bond interaction with residues Asp339 and His338. The oxygen atom of chromen moiety is involved in hydrogen bond with Arg62.

Also, nitro group of chromen ring makes hydrogen bond interaction with Lys278 and Lys277. Additionally, amino group of Lys278 is located at distance of 3.66 Å and 4.45 Å from the phenyl ring and dihydro-pyran of chromen moiety leading to attractive and non-covalent π -cation interaction which may stabilize the ligand in the active site of studied protein.

Instead of these, the pyridine N was located at distance of 3.25 Å from carboxylate group of Asp103 leading to possible salt bridges interaction. Furthermore, other interactions were observed between docked compound and phytase A such as polar His59, Thr65, His339, Asn340, Gln27, Ser140), charged positive and negative (Asp188, Glu179, Asp339, Asp103, Arg62, Arg58, Arg142, Lys278, Lys277) and hydrophobic (Tyr28). The binding energy of the (S)-enantiomer of compound **3e** was calculated as -10.11 kcal/mol. The replacement of R by S-enantiomer undergoes a small rotation of pyrazole plan (40°) upon binding with active site residues of studied protein (Fig. 9). Furthermore, the docking results explain the reason of the good biological activity of compound **3e** by the formation of additional H-Bond interactions with Phytase A protein. Thus, the main interactions between (S)-enantiomer of **3e** and the amino acids of active site of studied protein are hydrogen bonds (five H-bonds). Thus, oxygen atoms of nitro group of (S)-enantiomer of compound **3e** dis-

played hydrogen bonding with backbone carbonyl group of residue Lys68.

Two other hydrogen bonds are observed between hydroxyl group of 3-methyl-dihydro-pyrazole and the protein active site, one with imidazole of His338 and the second with guanidinium of Arg142. The hydroxyl group of 2H-chromen-3-yl moiety has the ability to form two hydrogen bonds with carbonyl backbone of Arg62 and guanidinium of Arg58. In addition, the oxygen atom of 2-hydroxy-2H-chromen-3-yl moiety was hydrogen bonded with guanidinium moiety of residue Arg62. In contrast, no attractive and non-covalent π - π stacking were observed between this compound and phytase A protein.

Instead of these, the pyridine nitrogen was located at distance of 4.18 Å from carboxylate group of Glu179 leading to possible salt bridges interaction. Moreover, other interactions are seen such as polar (Ser140, His59, Thr65, Gln274, Gln27, His338, Asn340), charged positive and negative (Glu179, Asp188, Asp339, Arg142, Arg58, Arg62, Lys68) and hydrophobic (Tyr28). All these differences in the binding mode between (S) and (R)-enantiomers suggest that the (R)-isonicotinoyl-pyrazolyl-coumarin bound state of the isonicotinoyl-pyrazolyl-coumarin- Phytase A complex is more stable than the (R)-isonicotinoyl-pyrazolyl-coumarin bound state. On the other hand, the comparison between docked conformations of (R) and (S)-enantiomers of compound **3e** with that of standard drug, ketoconazole, shows that the attractive and non-covalent π - π Stacking observed between standard drug and residue His338 was converted to hydrogen bond in docked conformation of (R)-enantiomer of compound **3e**. In addition, the H-bond interactions observed in the docked conformation of standard with residues and Arg62 was conserved in the docked conformation of both enantiomers of compound **3e**. Hydrogen bond interactions with residues Lys277, Arg142 were conserved in either enantiomer. Thus, the docking analyses suggested that our isonicotinoyl-pyrazolyl-coumarin can act as promising antifungal agents.

4. Conclusion

Herein, we have described an efficient and convenient synthesis of a novel series of 3-(5-Hydroxy-1-isonicotinoyl-3-methyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl)-2H-chromen-2-one derivatives **3a-g**. These novel heterocyclic compounds, which combine both coumarin and pyrazolin ring systems are prepared by reaction of 3-acetoacetyl coumarin derivatives **1a-g** with isonicotinic

acid hydrazide in the presence of conc. HCl in absolute ethanol. The in-vitro antifungal activity assays are encouraging since out of seven compounds tested, compounds **3d** and **3e** exhibited an antifungal activity comparable or even more potent than that of the reference drug. The MIC and IC₅₀ values of these novel compounds evidenced that the presence of nitro and hydroxyl groups in the aromatic ring of the coumarin and pyrazoline nucleus gave rise to an increased antioxidant and antifungal potency.

CRediT authorship contribution statement

Sabrina Halit: Conceptualization, Methodology, Investigation. **Amina Benazzouz-Touami:** Methodology, Reviewing. **Malika Makhloufi-Chebli:** Reviewing and Editing. **Souhila Terrachet Bouaziz:** Theoretical calculations, Formal analysis and editing. **Karima Ighilahriz:** Resources, synthesis. **Anthony Robert:** Analysis and reviewing. **Carine Machado-Rodrigues:** Analysis.

Declaration of Competing interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors would like to thank Agathe Martinez for her help in performing the ¹H-¹⁵N HMBC NMR experiments.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.molstruc.2022.133487](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133487).

References

- [1] F. Salehian, H. Nadri, L. Jalili-baleh, L. Youseftabar-miri, S. Nasir, A. Bukhari, A. Foroumadi, T.T. Küçükiling, M. Sharifzadeh, M. Khoobi, A Review, Biologically active 3,4-heterocycle-fused coumarins, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2020) 113034, doi:[10.1016/j.ejmech.2020.113034](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113034).
- [2] Adel M.Kamal El-Dean, Remon M. Zaki, Ahmed A. Geies, Shaban M. Radwan, Mahmoud S. Tolba, Synthesis and Antimicrobial Activity of New Heterocyclic compounds containing Thieno[2,3-c]coumarin and pyrazolo[4,3-c]Coumarin Frameworks, *Russian journal of bioorganic chemistry* 39 (4) (2013) 1–13.
- [3] Mahmoud S. Tolba, M.A. Abd ul-Malik, A.M. Kamal El-Dean, A.A. Geies, Sh.M. Radwan, R.M. Zaki, M. Sayed, S.K. Mohamed, Sh.A.A. Abdel-Raheem, An overview on synthesis and reactions of coumarin-based compounds, *Curr. Chem. Lett.* 11 (2022) 29–42.
- [4] F. Annunziata, C. Pinna, S. Dallavalle, L. Tamborini, A. Pinto, An overview of coumarin as a versatile and readily accessible scaffold with broad-ranging biological activities, *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2020) 1–83, doi:[10.3390/ijms21134618](https://doi.org/10.3390/ijms21134618).
- [5] S. Mishra, A. Pandey, S. Manvati, Coumarin: An emerging antiviral agent, *Helvion* 6 (2020) 1–7, doi:[10.1016/j.helivion.2020.e03217](https://doi.org/10.1016/j.helivion.2020.e03217).
- [6] A.S.O. Lemos, J.R. Florêncio, N.C.C. Pinto, L.M. Campos, T.P. Silva, R.M. Grazul, P.F. Pinto, G.D. Tavares, E. Scio, A.C.M. Apolônio, R.C.N. Melo, R.L. Fabri, Antifungal Activity of the Natural Coumarin Scopoletin Against Planktonic Cells and Biofilms From a Multidrug-Resistant *Candida tropicalis* Strain, *Frontiers in Microbiology* 11 (2020) 1–11, doi:[10.3389/fmicb.2020.01525](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01525).
- [7] M. Mladenović, M. Mihailović, D. Bogojević, S. Matić, N. Nićiforović, V. Mihailović, N. Vuković, S. Sukdolac, S. Solujić, In vitro antioxidant activity of selected 4-hydroxy-chromene-2-one derivatives-SAR, QSAR and DFT studies, *International Journal of Molecular Sciences* 12 (2011) 2822–2841, doi:[10.3390/ijms12052822](https://doi.org/10.3390/ijms12052822).
- [8] T. Al-Warhi, A. Sabt, E.B. Elkaeed, W.M. Eldehna, Recent advancements of coumarin-based anticancer agents: An up-to-date review, *Bioorganic Chemistry* 103 (2020) 1–15, doi:[10.1016/j.bioorg.2020.104163](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104163).
- [9] A. Rawat, A. Vijaya Bhaskar Reddy, Recent advances on anticancer activity of coumarin derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry Reports* 5 (2022) 100038, doi:[10.1016/j.ejmcr.2022.100038](https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100038).
- [10] L.R. Singh, S.R. Avula, S. Raj, A. Srivastava, G.R. Palnati, C.K.M. Tripathi, M. Paspuleti, K.V. Sashidhara, Coumarin-benzimidazole hybrids as a potent antimicrobial agent: Synthesis and biological elevation, *Journal of Antibiotics* 70 (2017) 1–8, doi:[10.1038/ja.2017.70](https://doi.org/10.1038/ja.2017.70).
- [11] D. Feng, A. Zhang, Y. Yang, P. Yang, Coumarin-containing hybrids and their antibacterial activities, *Archiv Der Pharmazie* 353 (2020) 1–12, doi:[10.1002/ardp.201900380](https://doi.org/10.1002/ardp.201900380).
- [12] D.S. Reddy, M. Kongot, A. Kumar, Coumarin hybrid derivatives as promising leads to treat tuberculosis: Recent developments and critical aspects of structural design to exhibit anti-tubercular activity, *Tuberculosis* 127 (2021) 1–12, doi:[10.1016/j.tube.2020.102050](https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102050).
- [13] Mahmoud S. Tolba, Mostafa Sayed, Adel M Kamal El-Dean, Reda Hassanien, Shaban AA Abdel-Raheem, Mostafa Ahmed, Design, synthesis, and antimicrobial screening of some new thienopyrimidines, *Org. Commun* 14 (4) (2021) 334–345.
- [14] Mahmoud S. Tolba, AM Sayed, M Sayed, M Ahmed, Design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking of some new Thieno [2,3-d] pyrimidine derivatives, *Journal of Molecular Structure* 1246 (2021) 131179.
- [15] D. Pal, V. Sharma, S. Kumar, Designing novel inhibitors against falcipain-2 of *Plasmodium falciparum*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 28 (2018) 1566–1569, doi:[10.1016/j.bmcl.2018.03.058](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.03.058).
- [16] F.A. Ragab, A.A.M. Eissa, S.H. Fahim, M.A. Salem, M.A. Gamal, Yassin M. Nissan, Synthesis and biological evaluation of new coumarin derivatives as cytotoxic agents, *Archiv Der Pharmazie* 354 (2021) 1–11, doi:[10.1002/ardp.202100029](https://doi.org/10.1002/ardp.202100029).
- [17] F.M. Aqlan, Synthesis Characterization and In Vitro Antibacterial Activity of the N-Substituted Bis-Pyrazoline Derivative as Polycyclic Aromatic Compounds, *Polycyclic Aromatic Compounds* (2020) 1–10, doi:[10.1080/10406638.2020.1866040](https://doi.org/10.1080/10406638.2020.1866040).
- [18] D.K. Karim, G.A. Salman, S. Al-Mansury, N.A. Jinzeel, Synthesis and antimicrobial evaluation of arylated 1,3,5-triphenyl pyrazoline derivatives using suzuki-miyaura reactions, *Egyptian Journal of Chemistry* 64 (2021) 2469–2481, doi:[10.21608/EJCHEM.2021.57726.3238](https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2021.57726.3238).
- [19] M. Mantzanidou, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, Pyrazoles and pyrazolines as anti-inflammatory agents, *Molecules* 26 (2021), doi:[10.3390/molecules26113439](https://doi.org/10.3390/molecules26113439).
- [20] B. Revanasiddappa, M.V. Kumar, H. Kumar, Synthesis and Antidepressant Activity of Pyrazoline Derivatives, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 19 (2020) 179–184, doi:[10.3329/dujps.v19i2.50634](https://doi.org/10.3329/dujps.v19i2.50634).
- [21] A. Kumar, P. Kumar, C.R. Shetty, J.P. James, H.C. Shetty, Synthesis, antidiabetic evaluation and bioisosteric modification of quinoline incorporated 2-pyrazoline derivatives, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 55 (2021) 574–580, doi:[10.5530/ijper.55.2.96](https://doi.org/10.5530/ijper.55.2.96).
- [22] S. Pola, K.K. Banoth, M. Sankaranarayanan, R. Ummani, A. Garlapati, Design, synthesis, in silico studies, and evaluation of novel chalcones and their pyrazoline derivatives for antibacterial and antitubercular activities, *Medicinal Chemistry Research* 29 (2020) 1819–1835, doi:[10.1007/s00044-020-02602-8](https://doi.org/10.1007/s00044-020-02602-8).
- [23] D. Matiadis, M. Sagnou, Pyrazoline hybrids as promising anticancer agents: An up-to-date overview, *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2020) 1–41, doi:[10.3390/ijms21155507](https://doi.org/10.3390/ijms21155507).
- [24] S.P. Singh, D. Kumar, H. Batra, R. Naithani, I. Rozas, J. Elguero, The reaction between hydrazines and β -dicarbonyl compounds: Proposal for a mechanism, *Canadian Journal of Chemistry* 78 (2000) 1109–1120, doi:[10.1139/v00-104](https://doi.org/10.1139/v00-104).
- [25] E.A. Shokova, J.K. Kim, V.V. evich Kovalev, 1,3-Diketones. Synthesis and properties, *Russian Journal of Organic Chemistry* 51 (2015) 755–830, doi:[10.1134/S1070428015060019](https://doi.org/10.1134/S1070428015060019).
- [26] T. Vahedpour, M. Hamzeh-Mivehroud, S. Hemmati, S. Dastmalchi, Synthesis of 2-Pyrazolines from Hydrazines: Mechanisms Explained, *Chemistry Select* 6 (2021) 6483–6506, doi:[10.1002/slct.202101467](https://doi.org/10.1002/slct.202101467).
- [27] Y.Q. Hu, S. Zhang, F. Zhao, C. Gao, L.S. Feng, Z.S. Lv, Z. Xu, X. Wu, Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity, *European Journal of Medicinal Chemistry* 133 (2017) 255–267, doi:[10.1016/j.ejmech.2017.04.002](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.002).
- [28] P. Aragade, M. Palkar, P. Ronad, D. Satyanarayana, Coumarinyl pyrazole derivatives of INH: Promising antimycobacterial agents, *Medicinal Chemistry Research* 22 (2013) 2279–2283, doi:[10.1007/s00044-012-0222-8](https://doi.org/10.1007/s00044-012-0222-8).
- [29] T.K. Kuruvilla, J.C. Prasana, S. Muthu, J. George, *J. Mol. Struct.* 1157 (2018) 519–529, doi:[10.1016/j.MOLSTRUC.2018.01.001](https://doi.org/10.1016/j.MOLSTRUC.2018.01.001).
- [30] S. Sakthivel, T. Alagesan, S. Muthu, C.S. Abraham, E. Geetha, *J. Mol. Struct.* 1156 (2018) 645–656, doi:[10.1016/j.MOLSTRUC.2017.12.024](https://doi.org/10.1016/j.MOLSTRUC.2017.12.024).
- [31] A. Benazzouz, M. Makhloufi-Chebli, S.M. Hamdi, B. Boutemur-Kheddis, A.M.S. Silva, M. Hamdi, Study of novel fluorescent coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones dyads. Estimation of ground- and excited-state dipole moments from a solvatochromic shift, *Journal of Molecular Liquids* 219 (2016) 173–179, doi:[10.1016/j.molliq.2016.02.095](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.02.095).
- [32] L. Saher, M. Makhloufi-Chebli, L. Dermeche, S. Dermeche, 10- (4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2 H -pyran-3-yl) -3-methyl-1 H, 10 H - pyrano [4, 3-b] chromen-1-ones from a pseudo-multicomponent reaction and evaluation of their antioxidant activity 10- (4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2 H -pyran-3-yl) -3-methyl-1 H, *Tetrahedron* 74 (2018) 872–879, doi:[10.1016/j.tet.2018.01.009](https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.01.009).
- [33] A. Benazzouz-Touami, A. Chouh, S. Halit, S. Terrachet-Bouaziz, M. Makhloufi-Chebli, K. Ighil-Ahriz, A.M.S. Silva, New Coumarin-Pyrazole hybrids: Synthesis, Docking studies and Biological evaluation as potential cholinesterase inhibitors, *Journal of Molecular Structure* 1249 (2022) 131591, doi:[10.1016/j.molstruc.2021.131591](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131591).
- [34] L.L. Mensor, F.S. Menezes, G.G. Leitao, A.S. Reis, T.C. dos Santos, C.S. Coube, S.G. Leitao, Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method, *Phytotherapy Research* 15 (2001) 127–130, doi:[10.1002/ptr.687](https://doi.org/10.1002/ptr.687).
- [35] G. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R. Bruni, Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods, *Food Chemistry* 91 (2005) 621–632, doi:[10.1016/j.foodchem.2004.06.031](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031).

- [36] I. Rasooli, M.H. Fakoor, D. Yadegarinia, L. Gachkar, A. Allameh, M.B. Rezaei, Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils, *International Journal of Food Microbiology* 122 (2008) 135–139, doi:[10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.048](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.048).
- [37] F. Neese, The ORCA program system, *WIREs Computational Molecular Science* 2 (2012) 73–78, doi:[10.1002/wcms.81](https://doi.org/10.1002/wcms.81).
- [38] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Physical Review B* 37 (1988) 785–789, doi:[10.1103/PhysRevB.37.785](https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785).
- [39] G. Schüürmann, Quantum Chemical Descriptors in Structure-Activity Relationships-Calculation, Interpretation, and Comparison of Methods, in *Predicting Chemical Toxicity and Fate* (2004), doi:[10.1201/9780203642627.ch6](https://doi.org/10.1201/9780203642627.ch6).
- [40] J.P. Perdew, R.G. Parr, M. Levy, J.L. Balduz, Density-functional theory for fractional particle number: Derivative discontinuities of the energy, *Physical Review Letters* 49 (1982) 1691–1694, doi:[10.1103/PhysRevLett.49.1691](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.49.1691).
- [41] T. Koopmans, Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms, *Physica* 1 (1934) 104–113, doi:[10.1016/S0031-8914\(34\)90011-2](https://doi.org/10.1016/S0031-8914(34)90011-2).
- [42] P. Geerlings, F. De Proft, W. Langenaeker, Conceptual density functional theory, *Chemical Reviews* 103 (2003) 1793–1873, doi:[10.1021/cr990029p](https://doi.org/10.1021/cr990029p).
- [43] P. Senet, Chemical hardnesses of atoms and molecules from frontier orbitals, *Chemical Physics Letters* 275 (1997) 527–532, doi:[10.1016/S0009-2614\(97\)00799-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(97)00799-9).
- [44] R.G. Parr, R.G. Pearson, Absolute Hardness: Companion Parameter to Absolute Electronegativity, *Journal of the American Chemical Society* 105 (1983) 7512–7516, doi:[10.1021/ja00364a005](https://doi.org/10.1021/ja00364a005).
- [45] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *Journal of Computational Chemistry* 19 (1998) 1639–1662, doi:[10.1002/\(sici\)1096-987x\(19981115\)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-987x(19981115)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b).
- [46] S. Hammad, S. Bouaziz-Terrachet, R. Meghnm, D. Meziane, Pharmacophore development, drug-likeness analysis, molecular docking, and molecular dynamics simulations for identification of new CK2 inhibitors, *Journal of Molecular Modeling* 26 (2020), doi:[10.1007/s00894-020-04408-2](https://doi.org/10.1007/s00894-020-04408-2).
- [47] K.O. Lamara, M. Makhloufi-Chebli, A. Benazzouz-Touami, S. Terrachet-Bouaziz, N. Hamdi, A.M.S. Silva, J.B. Behr, Selectivity control in the reaction between 2-hydroxyarylaldehydes and 4-hydroxycoumarin. Antioxidant activities and computational studies of the formed products, *Journal of Molecular Structure* (2021) 1231, doi:[10.1016/j.molstruc.2021.129936](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.129936).
- [48] M.F. Sanner, L. Jolla, Python: a programming language for software integration and development, *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 17 (1999) 55–84, doi:[10.1016/s1093-3263\(99\)99999-0](https://doi.org/10.1016/s1093-3263(99)99999-0).
- [49] A. Benazzouz-Touami, D. Hikem-Oukacha, K.O. Lamara, S. Halit, S. Terrachet-Bouaziz, M. Makhloufi-Chebli, Synthesis, Biological activities and Molecular Docking study of 3-(3-oxobutanoyl)-2H-chromen-2-one derivatives, *Chemical Data Collections* 36 (2021) 100792, doi:[10.1016/j.cdc.2021.100792](https://doi.org/10.1016/j.cdc.2021.100792).
- [50] S.P. Singh, D. Kumar, B.G. Jones, M.D. Threadgill, Formation and dehydration of a series of 5-hydroxy-5-trifluoromethyl- 4,5-dihydropyrazoles, *Journal of Fluorine Chemistry* 94 (1999) 199–203, doi:[10.1016/S0022-1139\(99\)00011-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1139(99)00011-1).
- [51] L. Buriol, C.P. Frizzo, M.R.B. Marzari, D.N. Moreira, L.D.T. Prola, N. Zanatta, H.G. Bonacorso, M.A.P. Martins, Pyrazole synthesis under microwave irradiation and solvent-free condition, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21 (2010) 1037–1044, doi:[10.1590/S0103-50532010000600012](https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000600012).
- [52] P.T. Thuong, T.M. Hung, T.M. Ngoc, D.T. Ha, B.S. Min, S.J. Kwack, T.S. Kang, J.S. Choi, Bae, Antioxidant Activities of Coumarins from Korean Medicinal Plants and their Structure-Activity Relationships, *Phytother. Res.* 24 (2010) 101–106.
- [53] J.-J. Zhu, J.-G. Jiang, Pharmacological and Nutritional Effects of Natural Coumarins and Their Structure-Activity Relationships, *Molecular Nutrition & Food Research* 62 (14) (2018) 1701073, doi:[10.1002/mnfr.201701073](https://doi.org/10.1002/mnfr.201701073).
- [54] A. Fassihi, F. Hasanazadeh, A. Attar, L. Saghaie, M. Mohammadpour, Synthesis and evaluation of antioxidant activity of some novel hydroxypyridinone derivatives: A DFT approach for explanation of their radical scavenging activity, *Research in Pharmaceutical Sciences* 15 (2020) 515–528, doi:[10.4103/1735-5362.301336](https://doi.org/10.4103/1735-5362.301336).
- [55] U. Vanitha, R. Elancheran, V. Manikandan, S. Kabilan, K. Krishnasamy, Design, synthesis, characterization, molecular docking and computational studies of 3-phenyl-2-thioxoimidazolidin-4-one derivatives, *Journal of Molecular Structure* 1246 (2021) 1–11, doi:[10.1016/j.molstruc.2021.131212](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131212).
- [56] R.G. Parr, L.V. Szentpály, S. Liu, Electrophilicity index, *Journal of the American Chemical Society* 121 (1999) 1922–1924, doi:[10.1021/ja983494x](https://doi.org/10.1021/ja983494x).
- [57] S. Bouaziz-Terrachet, A. Toumi-Maouche, B. Maouche, S. Taïri-Kellou, Modeling the binding modes of stilbene analogs to cyclooxygenase-2: A molecular docking study, *Journal of Molecular Modeling* 16 (2010) 1919–1929, doi:[10.1007/s00894-010-0679-7](https://doi.org/10.1007/s00894-010-0679-7).
- [58] D.C. Niño-Gómez, C.M. Rivera-Hoyos, E.D. Morales-Álvarez, E.A. Reyes-Montaña, N.E. Vargas-Alejo, I.N. Ramírez-Casallas, K. Erkan Türkmen, H. Sáenz-Suárez, J.A. Sáenz-Moreno, R.A. Poutou-Piñales, J. González-Santos, A. Arévalo-Galvis, In silico" characterization of 3-phytase a and 3-phytase B from *Aspergillus Niger*, *Enzyme Research* (2017) 1–23 2017, doi:[10.1155/2017/9746191](https://doi.org/10.1155/2017/9746191).

Abstract

This thesis focuses in its first part, on the synthesis of a series of benzylpyrazolylcoumarin derivatives, involving the multicomponent reaction of 4-hydroxycoumarin, ethyl acetoacetate, hydrazine hydrate and benzaldehyde derivatives, using sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS) as catalyst. The antifungal and antioxidant properties of the synthesized compounds were also evaluated and the results were promising. Docking studies showed that one product of the synthesized series has a high affinity for the protein N-myristoyltransferase (NMT) and binds to the active site of the protein in the same way as inhibitors used in medicine and could be part of new classes of clinically effective antifungal agents. Aiming to synthesize highly functional products, the synthesis of a new series of isonicotinoylpyrazolylcoumarin-derived molecules by the molecular hybridization strategy from 3-acetoacetylcoumarin derivatives with isoniazid was performed in a second step. The obtained compounds were evaluated for their antifungal activities and two products showed potentially high inhibitory activities. The results of the antioxidant activity were also satisfactory. Structure-activity relationship studies demonstrated that the presence of nitro and hydroxyl groups in the aromatic ring of the coumarin and pyrazoline rings conferred enhanced antioxidant and antifungal activity. In addition, molecular docking studies were performed for the compound with good antifungal activity to evaluate its potential as an inhibitor of the fungal protein (Phytase A) from *Aspergillus niger* and the results suggest that our isonicotinoylpyrazolylcoumarin may act as a promising antifungal agent.

Keywords: Heterocycle, Coumarin, Sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS), Benzylpyrazolylcoumarin, Multicomponent reaction, Isonicotinic acid hydrazide, Pyrazoline, Antioxidant activity, Antifungal activity, Molecular docking, Protein N-myristoyltransferase (NMT), Fungal protein (Phytase A) from *Aspergillus*.

Résumé

Cette thèse se concentre dans sa première partie, sur la synthèse d'une série de dérivés de la benzylpyrazolylcoumarine, impliquant la réaction multicomposants de la 4-hydroxycoumarine, d'acétoacétate d'éthyle, d'hydrazine hydrate et d'aldéhydes, en utilisant le dodécylbenzènesulfonate de sodium (DBSS) comme catalyseur. Les propriétés antifongiques et antioxydantes des composés synthétisés ont également été évaluées et les résultats étaient prometteurs. Les études de docking ont montré qu'un produit de la série synthétisée a une forte affinité pour la protéine N-myristoyltransférase (NMT) et se lie au site actif de la protéine de la même manière que les inhibiteurs utilisés en médecine et pourrait faire partie de nouvelles classes d'agents antifongiques cliniquement efficaces. Visant à synthétiser des produits hautement fonctionnels, la synthèse d'une nouvelle série de molécules dérivées d'isonicotinoylpyrazolylcoumarine par la stratégie d'hybridation moléculaire à partir des dérivés de la 3-acétoacétylcoumarine avec l'isoniazide a été réalisée dans un second temps. Les composés obtenus ont été évalués pour leurs activités antifongiques et deux produits ont montré des activités inhibitrices potentiellement élevées. Les résultats de l'activité antioxydante étaient également satisfaisants. Les études relations structure-activité ont démontré que la présence de groupes nitro et hydroxyle dans le cycle aromatique des cycles coumarine et pyrazoline conférait une activité antioxydante et antifongique accrue. En outre, des études de docking moléculaire ont été réalisées pour le composé présentant une bonne activité antifongique afin d'évaluer son potentiel en tant qu'inhibiteur de la protéine fongique (Phytase A) d'*Aspergillus niger* et les résultats suggèrent que notre isonicotinoylpyrazolylcoumarine peut agir comme un agent antifongique prometteur.

Mots clés : Hétérocycle, Coumarine, Dodécylbenzènesulfonate de sodium (DBSS), Benzylpyrazolylcoumarine, Réaction multicomposants, Hydrazide d'acide isonicotinique, Pyrazoline, Activité antioxydante, Activité antifongique, Docking moléculaire, protéine N-myristoyltransférase (NMT), protéine fongique (Phytase A) d'*Aspergillus*.