

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE
MEMOIRE DE MASTER
SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**Molécules hybrides dérivées du coumarin-
dihydropyrimidinones/thiones : Synthèse
et activités biologiques.**

Présenté par : M^{elle} BOUZIDI Sylia et M^{elle} SLIMANE ALI Nawel

Soutenu publiquement, le 03/07/2018, *devant le Jury composé de :*

Mme KICHOU Nora	MCB	UMMTO	PRESIDENTE
Mme KHELLAFI Nassima	MAA	UMMTO	ENCADREUR
Mr ABDOUN Amar	Pharmacien	CHU-TO	EXAMINATEUR
	Microbiologiste		
Mme BENZAOUZ Amina	MAB	UMMTO	EXAMINATRICE

Remerciements

On tient à remercier, Dieu le tout puissant pour nous avoir donné la force et la patience afin de munir ce travail à sa fin.

Ce travail a été réalisé au laboratoire pédagogique de thermodynamique et au laboratoire de physique et chimie des matériaux LPCM de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, sous la direction de Madame **KHELLAFI** épouse **KHALDI Nassima** Maître Assistante Classe A à la Faculté des Sciences de l'UMMTO, que nous remercions chaleureusement et jamais assez de nous avoir encadré, avec beaucoup de compétence, d'enthousiasme et de disponibilité, de gentillesse, de sérieux, son aide précieuse et surtout pour tous ses conseils et ses remarques, pour la confiance qu'elle nous a accordé pour réaliser ce travail de recherche.

Nos remerciements vont :

A Madame **KICHOU Nora**, Maître de Conférences Classe B à l'Université de Tizi-Ouzou, qui nous fait le grand honneur de présider ce jury de soutenance.

A Monsieur **ABDOUN Amar** Pharmacien Microbiologiste à CHU de Tizi-Ouzou et Madame **BENAZZOZ Amina** Maître Assistante Classe B à l'Université de Tizi-Ouzou, qui ont accepté de juger ce travail.

A **Dr A. BESSAOUD** du laboratoire de microbiologie de l'EPH d'Ain El Hammam qui nous a accueillis dans son laboratoire. Nos remerciements vont aussi à Mademoiselle **AMIRAT ATIKA** biologiste pour sa précieuse aide qui nous a permis de réaliser les tests antibactériennes.

A Tous les membres de l'équipe de chimie organique du laboratoire de physique et chimie des matériaux LPCM de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou et en particulier à Madame **MAKHLOUFI** et Madame **OUKACHA**.

A Monsieur **HELOUANE**, de l'Université de Bouira et Madame **BELALLAM** de l'USTHB pour leurs aides dans la réalisation des analyses IR, sans vous ce travail ne sera jamais achevé.

Aux techniciennes du laboratoire pédagogie de thermodynamique et du laboratoire de physique et chimie des matériaux LPCM, pour leurs gentillesse et leurs disponibilités au laboratoire. Ainsi que la technicienne du laboratoire pédagogique de chimie pharmaceutique, pour la réalisation des points de fusion.

Pour finir, nous tenons aussi à remercier toutes les personnes qui ont participé à notre encadrement et tous ceux qui de près ou de loin nous ont soutenue dans la réalisation de ce mémoire dans les meilleures conditions.

Dédicace

Je dédie avant tous se travail à la mémoire de mon père en témoignage de mon profond amour que dieu l'accueille dans son vaste paradis, à ma mère que dieu la préserver pour nous et lui accorde la santé.

A mon grand père bouaziz qui y'a était un vrais père, qui n'a jamais cessé d'être avec moi dans les moments les plus délicats. Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement et tout amour que je porte pour toi.

A mes sœurs, oncles, tantes, cousins et à toute la famille bouzidi et toute mes copines

Ainsi que ma chère binôme nawel et a toute sa famille, mes enseignants et à vous tous que je n'ai pas eu à citer.

Sylian

Dédicace

*Je Dédie ce modeste travail à :
À mes chers parents pour m'avoir
donné la vie et la joie de vivre Que
Dieu vous garde pour moi.*

*À mes proches notamment mes
frères, mes sœurs, et mes amis pour
votre soutien et votre présence à
mes côtés.*

*À mon binôme Syla et à toute sa
famille.*

*À tous mes enseignants et amis (es)
chimistes.*

Nawel

Liste des abréviations

AA : Acide Ascorbique

ATCC: American Type Culture Collection

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DHPMs : dihydropyrimidinones

DHPMTs : dihydropyrimidine-thiones

DMF : N, N-diméthylformamide

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

E. coli : Escherichia coli

EC50 : La concentration efficace médiane

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

IC50 : Concentration Inhibitrice minimale

IR : Infra-Rouge

P. aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa

Pf : Point de fusion

Pf Litt. : Point de fusion porté de la littérature

PPM : PhosphoMolybdate

Rd : Rendement

Rf : Rapport frontale

RMC: Réaction multicomposants

S. aureus : Staphylococcus aureus

UV-Vis : Ultra Violet-Visible

VIH : Virus de l'immunodéficience humain

Figure 1: Spectre UV-Vis du composé 3a	16
Figure 2: Spectre UV-Vis du composé 3b	16
Figure 3: Spectre UV-Vis du composé 3f	16
Figure 4: Spectre UV-Vis du composé 3g	16
Figure 5: Spectre IR du composé 3a	18
Figure 6: Spectre IR du composé 3c	18
Figure 7: Spectre IR du composé 3e	19
Figure 8: Spectre UV-Vis du composé 6b	23
Figure 9: Spectre UV-Vis du composé 6c	23
Figure 10: Spectre UV-Vis du composé 6d	23
Figure 11: Spectre UV-Vis du composé 6f	23
Figure 12: Spectre IR du composé 6a	24
Figure 13: Spectre IR du composé 6b	25
Figure 14: Spectre IR du composé 6d	25
Figure 15: Densité optique des composés (3a-e) et l'acide ascorbique en fonction de la concentration	34
Figure 16: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH \cdot des produits (3a-e) et de l'AA en fonction de la concentration	36
Figure 17: Valeur d'IC50% des composés 3a-e et de l'acide ascorbique	37
Figure 18: Effet des composés 3b-e sur la souche bactérienne <i>S .aureus</i>	40
Figure 19: Effet des produits 6a, 6b, 6c et 6f sur la souche bactérienne <i>P .aeruginosa</i>	42
Figure 20: Spectre UV-Vis du composé 3c	(annexe)
Figure 21: Spectre UV-Vis du composé 3d	(annexe)
Figure 22: Spectre UV-Vis du composé 3 e	(annexe)
Figure 23: Spectre UV-Vis du composé 6a	(annexe)

- Figure 24:** Spectre UV-Vis du composé **6 e** (annexe)
- Figure 25:** Spectre IR du composé **3f** (annexe)
- Figure 26:** Spectre IR du composé **3g** (annexe)
- Figure 27:** Spectre IR du composé **6c** (annexe)
-

Schéma 1: Structure générale de la coumarine	3
Schéma 2: Structure de génine (Fraxétol)	4
Schéma 3: Structure d'hétéroside (Fraxoside)	4
Schéma 4: Structure de furocoumarine linéaire	5
Schéma 5: Structure de furocoumarine angulaire	5
Schéma 6: Xanthylétin	5
Schéma 7: Séseline	5
Schéma 8: Structure d'une dicoumarine (Edgeworthine)	5
Schéma 9: Structure d'une tricoumarine (Triumbéllatine).....	6
Schéma 10: Différentes voies de synthèse des coumarines	7
Schéma 11: Synthèse de la coumarine à partir de la réaction de Knoevenagel	8
Schéma 12: Synthèse de 3-acétylcoumarine	8
Schéma 13: Synthèse originale des 3,4-dihydropyrimidinone de Biginelli	10
Schéma 14: Réaction d'obtention de DHPM par la réaction de Biginelli.....	11
Schéma 15: Mécanisme de formation du dihydropyrimidinones/thiones	12
Schéma 16: Synthèse de l'acétylcoumarine et ses dérivées (3a-g).....	14
Schéma 17: Mécanisme de la réaction de Knoevenagel pour la 3-acétylcoumarine et ses dérivés (3a-g)	20
Schéma 18: Synthèse des molécules hybrides coumarin-3,4-dihydropyrimidinones/thiones (6a-f).....	21
Schéma 19: Mécanisme de la réaction de Biginelli pour les composés coumarin-3,4-dihydropyrimidinones/thiones (6a-f)	26
Schéma 20: Structure du radical DPPH [•] et son produit de réduction DPPH ₂	32

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques de la 3-acétylcoumarine et ses dérivés (3a-g)	14
Tableau 2: Rapports frontaux de la 3-acétylcoumarine et ses dérivés (3a-g).....	15
Tableau 3: Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible des composés (3a-g).....	16
Tableau 4 : Résultats des spectres IR enregistrés des composés (3a-g)	17
Tableau 5: Propriétés physico-chimiques des coumarin-3,4- dihydropyrimidin-2(<i>H</i>) ones/thiones (6a-f).....	21
Tableau 6: Rapports frontaux des composés (6a-f)	22
Tableau 7: Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible des composés (6a-f)	22
Tableau 8: Résultats des spectres IR enregistrés des composés (6a-f).....	24
Tableau 9: Les méthodes les plus utilisées pour mesurer l'activité antioxydante	32
Tableau 10: Pourcentage d'inhibition de différentes dilutions des composés (3a-e et AA) .	35
Tableau 11: Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des produits (3a-g) ainsi que l'antibiotique utilisé (cefotaxime)	39
Tableau 12: CMI des composés 3b , 3c , 3d et 3e dans <i>S.aureus</i>	41
Tableau 13: Diamètres des zones d'inhibition(en mm) des molécules hybrides (6a-f)	42
Tableau 14: CMI des composés 6a , 6b , 6c et 6f dans <i>P. aeruginosa</i>	43
Tableau 15: Récapitulatif des molécules synthétisées par l'utilisation de Chem Draw Ultra8.0	(annexe)

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des schémas

Listes des tableaux

Introduction générale 1

CHAPITRE I : Partie bibliographique

I. Les coumarines

1. Généralités sur les composés hétérocycliques 3

2. Les coumarines 3

3. Classification 4

 3.1. Coumarines Simples 4

 3.2. Coumarines complexes 4

 3.2.1. Furanocoumarines 4

 3.2.2. Pyranocoumarines 5

 3.2.3. Dicoumarines (coumarines dimériques) 5

 3.2.4. Tricoumarines (coumarines trimériques) 6

4. Propriétés pharmacologiques 6

5. Applications des coumarines 6

6. Les différentes méthodes de synthèse des coumarines 7

 6.1. Mécanisme de la réaction de Knoevenagel 8

 6.2. Synthèse de la 3-acetyl-2H-chromen-2-one 8

II. Molécules hybrides

1. Molécules hybrides 9

2. Réactions multicomposants 9

 2.1. Définition de la réaction multicomposants 9

 2.2. Avantages des réactions multicomposants 9

3. La réaction de Biginelli des dihydropyrimidinones 10

4. Mécanisme de la réaction de Biginelli	11
5. Intérêts biologiques des dihydropyrimidinones	12

CHAPITRE II : Synthèse des dérivés de la 3-acétylcoumarine et des molécules hybrides coumarin-3,4-dihydropyrimidin- 2(H)-ones/thiones

Introduction	13
--------------------	----

Partie I : Synthèse de la 3-acétylcoumarine et ses dérivés

I. Synthèse de la 3-acétylcoumarine et ses dérivés (3a-g).....	14
1. Etude par chromatographie sur couche mince des composés (3a-g)	15
2. Analyse par spectroscopie UV-Visible des composés (3a-g)	15
3. Analyses par spectroscopie IR des composés (3a-g)	17
4. Mécanisme réactionnel de formation de la 3-acétylcoumarine et ses dérivés (3a-g) ..	19

Partie II : Synthèse des molécules hybrides

II. Synthèse des molécules hybrides coumarin-3,4- dihydropyrimidin-2(H)-ones/thiones	21
1. Etude par Chromatographie sur couche mince des composés (6a-f)	22
2. Analyse par spectroscopie UV-Visible des composés (6a-f)	22
3. Analyse par spectroscopie IR des composés (6a-f)	23
4. Mécanisme réactionnel de formation des coumarin-3,4-dihydropyrimidinones/thiones (6a-f)	26

Conclusion	27
------------------	----

Partie expérimentale	28
----------------------------	----

CHAPITRE III: Evaluation de l'activité biologique

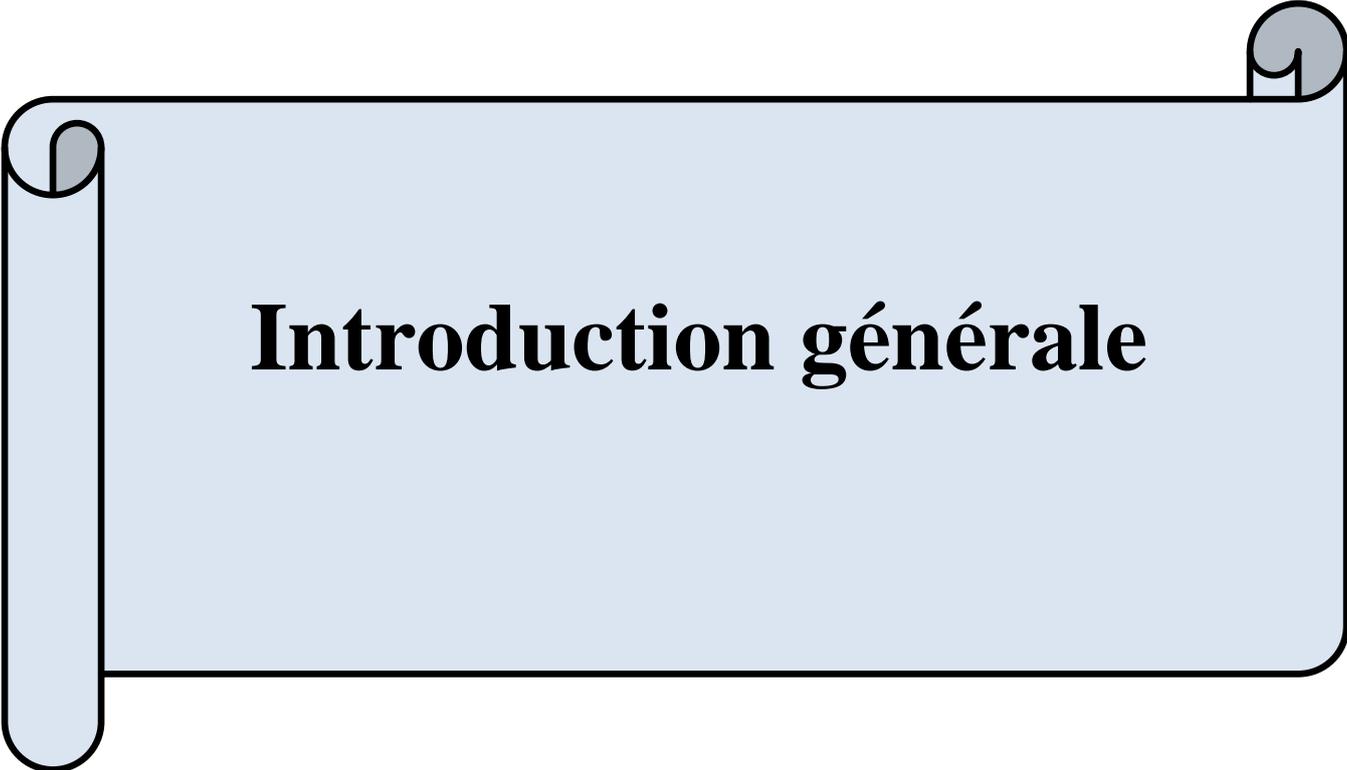
Introduction	30
--------------------	----

I. Activité antioxydante	30
1. Stress oxydatif	30
2. Les radicaux libres	30
3. Les antioxydants	31
4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	31

5. Evaluation du pouvoir anti-radicalaire par la méthode de DPPH	32
6. Evaluation de l'activité antioxydante de l'acétylcoumarine et ses dérivés (3a-g).....	33
7. Résultats et discussion	34
8. Détermination d'IC50 des composés (3a-e)	35
II. Activité antibactérienne	38
1. Les souches bactériennes	38
2. Les antibiotiques	38
3. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion des disques en milieu solide	38
4. Lecture des antibiogrammes	39
5. Résultats et discussion	39
5.1. Des diamètres d'inhibition de l'acétylcoumarine et ses dérivés (3a-g)	39
5.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des composés 3b , 3c , 3d et 3e	41
5.3. Des diamètres d'inhibition des molécules hybrides synthétisés (6a-f)	41
5.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des composés 6a , 6b , 6c ,et 6f	43
Conclusion	44
Partie expérimentale	45
Conclusion générale	48

Références bibliographiques

Annexes



Introduction générale

Les molécules biologiquement actives occupent aujourd'hui une place prépondérante dans notre société puisqu'elles sont à la base de nombreux principes actifs utilisés en pharmacie, cosmétique et parfumerie. L'origine de ces molécules peut être naturelle, semi synthétique ou totalement synthétique [1].

La coumarine et ses dérivés représentent l'une des classes des composés les plus actifs possédants larges spectres d'activité biologique. Beaucoup de ces composés se sont révélés actifs antimicrobiens, anti-inflammatoires et antitumoraux et dans l'inhibition du virus de l'hépatite C. Cependant, leur abondance naturelle dans les plantes est très faible et les processus de purification, sont complexes. Par conséquent, diverses méthodes ont été développées pour la synthèse totale des coumarines, y compris les réactions de Perkin, Pechmann et Knoevenagel [2].

Au cours des dernières années, les RMC sont devenus des protocoles de synthèse modernes pour la synthèse one pot d'une grande variété de molécules organiques. Parmi ces réactions nous avons les synthèses des dihydropyrimidinones/thiones [3].

La méthode la plus commune pour la synthèse des dihydropyrimidinones (DHPMs) et des dihydropyrimidine-thiones (DHPMTs) implique la réaction à plusieurs composants de Biginelli [4].

Dans ce contexte, nous portons dans notre travail un intérêt particulier à la préparation des dérivés coumariniques ; à partir de la réaction de KNOENENAGEL. Ainsi on présentera un potentiel réactionnel qu'on essaiera d'exploiter par la suite par la réaction de Biginelli afin d'aboutir à de nouvelles molécules hybrides dérivés coumarin-dihydropyrimidinones/thiones.

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

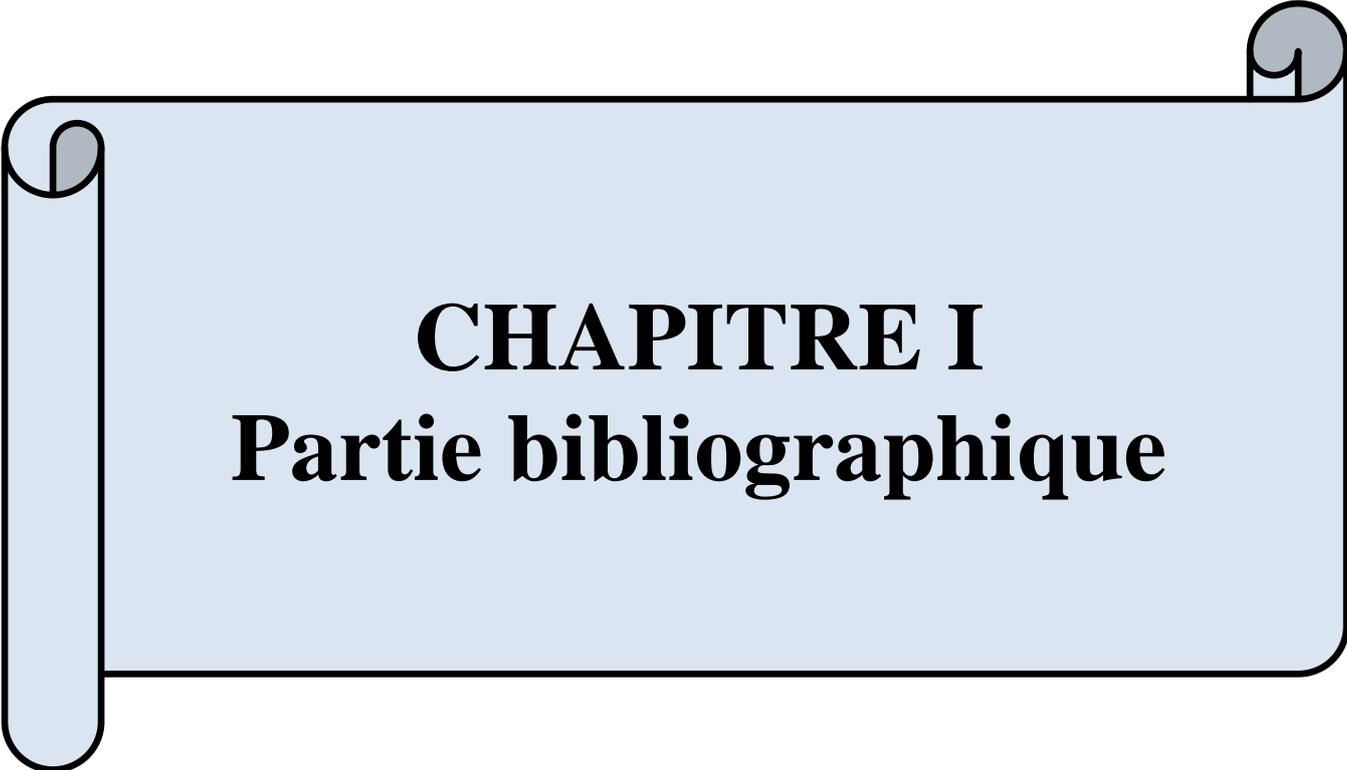
Le premier chapitre sera consacré à une étude bibliographique subdivisée en deux parties, la première traitant une étude généralisée sur les coumarines : leurs classifications, les différentes méthodes de synthèse et leurs activités biologiques. La seconde partie concerne les molécules hybrides et des rappels bibliographiques sur les réactions à composants multiples ou nous nous attarderons plus sur la réaction de Biginelli.

Dans le deuxième chapitre, une stratégie efficace et économique sera donnée pour la préparation des dérivés 3- acétylcoumarines selon la réaction de condensation type Knoenenagel suivie par la réaction de Biginelli qui nous permettra d'aboutir à des molécules hybrides coumarine 3,4 -dihydropyrimidinone/thione. Les structures de tous les composés synthétisés, ont été vérifiées par les différentes méthodes d'analyses spectroscopiques IR et UV-Visible.

Introduction générale

Dans le troisième chapitre, nous évaluerons l'activité biologique de tous les produits synthétisés par l'étude de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé et l'activité antioxydante par la méthode de DPPH.

Enfin nous terminons ce travail par une conclusion générale récapitulative.



CHAPITRE I
Partie bibliographique

I. Les coumarines

1. Généralités sur les composés hétérocycliques:

Les hétérocycles sont des composés chimiques très intéressants dans les recherches scientifiques en raison de leurs potentialités d'application comme agents herbicides, fongicides, insecticide, colorants et comme produits à effets pharmacologiques, pour cela leurs synthèses ont fait l'objet de plusieurs études [1].

Ils constituent une classe de composés chimiques dans lesquels un atome ou plus d'un carbocycle est remplacé par un hétéroatome comme l'oxygène, l'azote, le phosphore et le soufre. D'un point de vue chimique, la plupart des composés hétérocycliques comportent un système conjugué ou aromatique, qui a été l'origine de leurs stabilité [2].

2. Les coumarines:

Les coumarines existent sous plusieurs structures différentes. Ils constituent une classe importante d'agents pharmacologiques possédant une gamme de différentes activités physiologiques, elles font objet de la recherche intense dont la possibilité que cette classe de molécules pourrait être une source de médicaments pour le traitement de plusieurs maladies [3], telle que la tuberculose, Alzheimer et pour les traitements contre les bactéries ou contre les parasites responsables du paludisme [4].

Les Coumarines sont des lactones d'acide hydroxycinnamique (2*H*-1-benzopyran-2-one) (**Schéma 1**) qui existent dans les plantes et également dans les champignons et les bactéries.

La coumarine est une substance naturelle organique isolée de la fève tonka par Vogel en 1820. Elle fut synthétisée en 1868 par W.H. Perkin à partir de l'aldéhyde salicylique et d'un anhydride d'acide, à haute température en présence d'une base faible (CH_3COONa). Les coumarines appartiennent à la classe des composés phénoliques, elles constituent, avec les flavonoïdes, les chromones et les isocoumarines, un très vaste ensemble de substances [4].

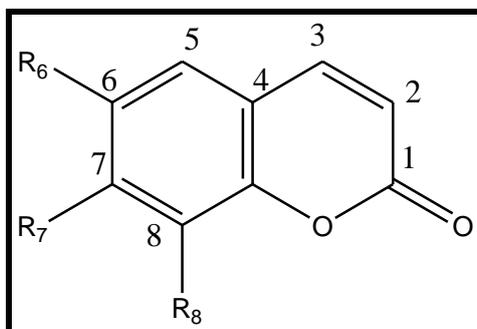


Schéma 1: Structure générale de la coumarine

3. Classification :

Les coumarines sont substituées par un hydroxyle ou plus sur les six positions disponibles. La majorité des coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle [5].

Les auteurs ont classé les coumarines selon la nature des substituants sur leurs structures en cinq catégories :

3.1. Coumarines Simples :

Les coumarines les plus répandues dans le règne végétal sont les génines et les hétérosides qui possèdent des substituants (OH ou OCH₃) en position 6 et 7 [5].

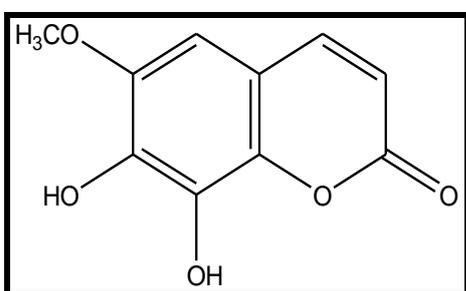


Schéma 2: Structure de génine (Fraxétol)

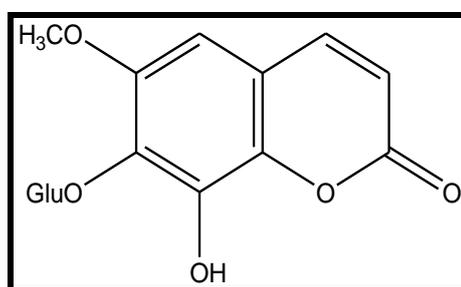


Schéma 3: Structure d'hétéroside (Fraxoside)

3.2. Coumarines complexes :

Elles se constituent d'un noyau furane ou pyrane associé au noyau benzo- α pyrone. Il existe plusieurs catégories des coumarines complexes, on cite : les furanocoumarine, les pyranocoumarines, les dicoumarines et les tricoumarines [6].

3.2.1. Furocoumarines :

Les furocoumarines (appelées encore furanocoumarine) sont des molécules tricycliques, produites par la combinaison de deux hétérocycles (coumarine et furane). Ils constituent une classe abondante où chaque membre se distingue par la présence de divers groupements (hydroxy, alkoxy...) sur les carbones 2, 5,6 et 8 [7].

On distingue deux types de furocoumarines en fonction de la position du noyau furane sur l'hétérocycle coumarinique :

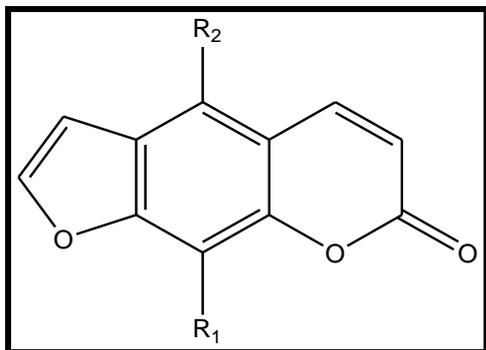


Schéma 4: Structure furocoumarine linéaire

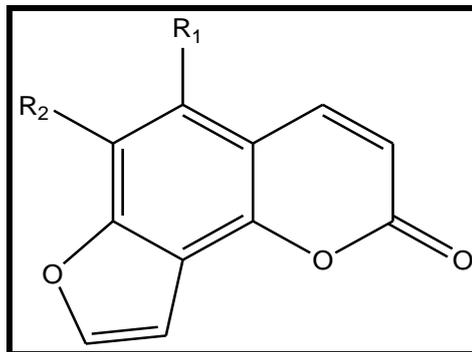


Schéma 5: Structure furocoumarine angulaire

3.2.2. Pyranocoumarines :

Ils sont formés par la fusion d'un hétérocycle pyrane avec la coumarine [3]. On retrouve des pyranocoumarine sous forme :

a- forme linéaire : Xanthylétin (Schéma 6)

b- forme angulaire : Séseline (Schéma 7)

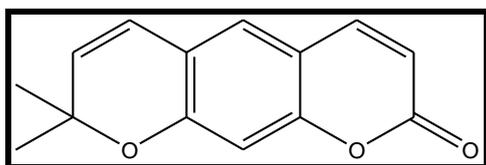


Schéma 6: Xanthylétin

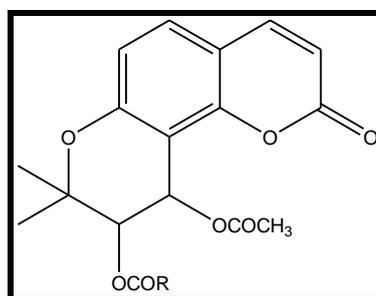


Schéma 7: Séseline

3.2.3. Dicoumarines (coumarines dimériques) :

Ce sont des composés formés par la liaison de deux unités coumariniques simples [5].

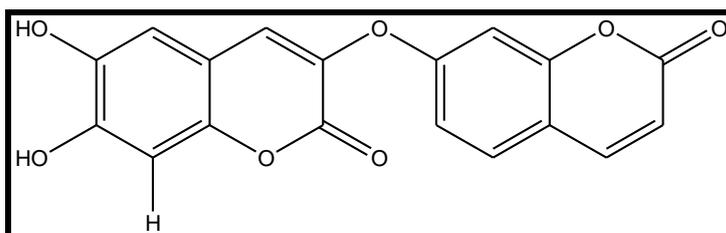


Schéma 8 : Structures d'une dicoumarine (Edgeworthine)

3.2.4. Tricoumarines (coumarines trimériques) :

Les tricoumarines sont des composés issus de l'union de trois unités coumariniques

(Schéma 9) [5].

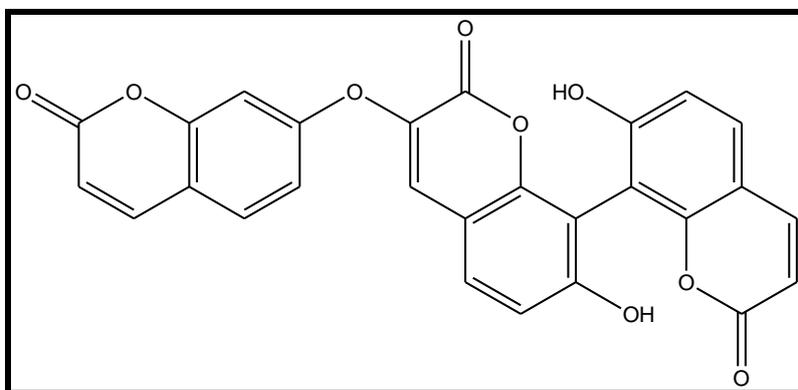


Schéma 9 : Structures d'une tricoumarine (Triumbéllatine)

4. Propriétés pharmacologiques:

Les coumarines ont de nombreuses propriétés biochimiques et pharmacologiques. La majorité des coumarines et leurs dérivées ont été soumises à de profondes investigations afin d'évaluer leurs effets sur la santé humaine. Les recherches ont montré qu'elles possèdent un large spectre d'activités biologiques, y compris antibactérien [8], antifongique [9], anticoagulant [10], anti inflammatoire [11], anti tumorale [12], anti-VIH [13] et antioxydant [14].

Les coumarines ont une action vitaminique P : augmentation de la résistance des capillaires et diminution de leur perméabilité. On les emploie ainsi pour traiter les troubles veineux [6].

5. Applications des coumarines :

Les coumarines sont l'une des classes les plus importantes de molécules fluorescentes et elles possèdent des applications dans le domaine industriel, biologique et cosmétique comme des produits chimiques de parfumerie, additifs alimentaires et laser dispersés fluorescentes et colorantes. Par exemple, la 7-hydroxy-4-méthyl coumarine (méthyl-umbelliférone) est utilisée comme agent de blanchiment optique, colorant laser efficace, norme pour la détermination fluorométrique de l'activité enzymatique et en tant que matériau de départ pour la préparation des insecticides et furanocoumarines. De la même façon, le 7-

amino-4-méthylcoumarine est principalement utilisé comme colorant laser et intermédiaire pour la synthèse de composés bioactifs [15].

Aujourd'hui, la coumarine entre dans environ 90% des compositions et a une concentration supérieure à 1% dans 60% des compositions. Ce succès est dû à la capacité de la coumarine à s'associer avec d'autres produits [3, 15].

6. Les différentes méthodes de synthèse des coumarines :

Il existe plusieurs réactions qui permettent d'accéder à de nombreux composés à structure de coumarine (**Schéma 10**) [9], nous pouvons citer :

- La réaction de Pechmann,
- La réaction de Perkin,
- La réaction de Wittig
- La réaction de Knoevenagel,
- La réaction de Reformatsky

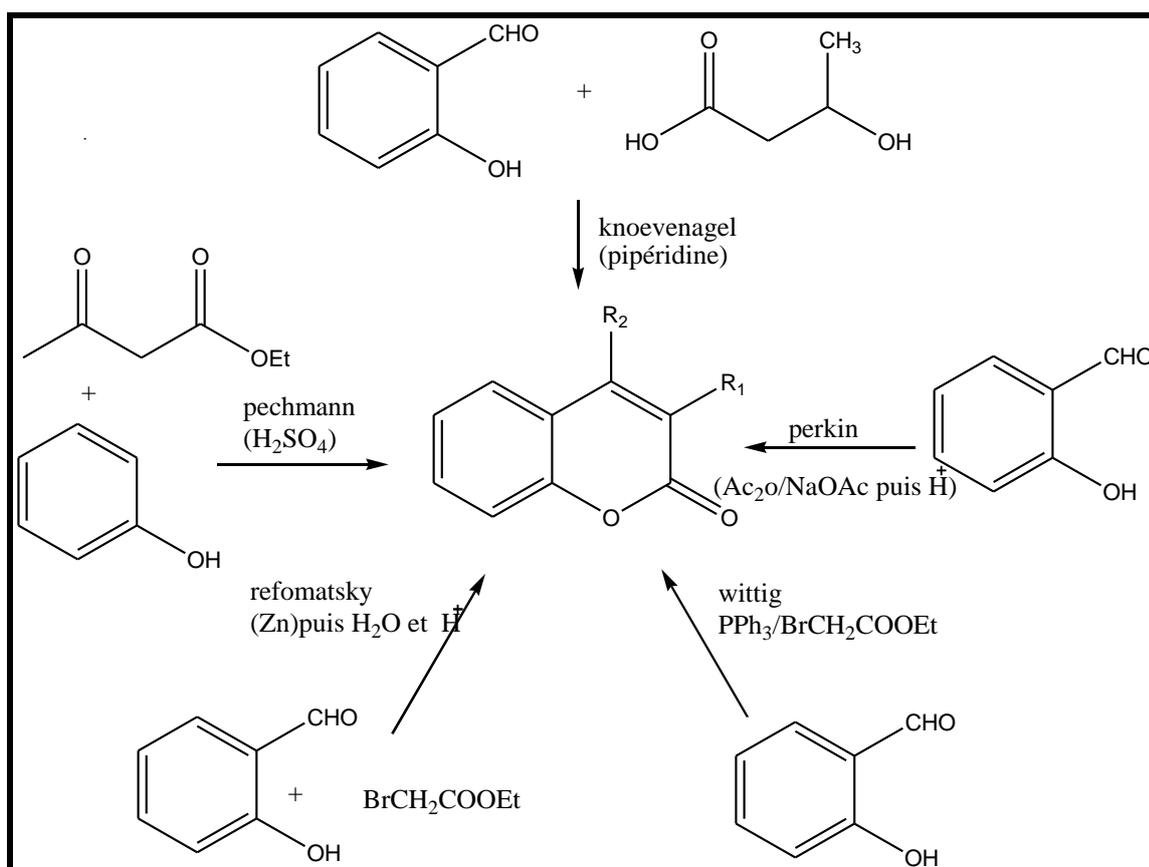


Schéma 10 : Différentes voies de synthèse des coumarines [9]

6.1. Mécanisme de la réaction de Knoevenagel :

Knoevenagel a développé une méthode pour la synthèse des dérivés de la coumarine (**Schéma 11**) à partir de l'*o*-hydroxyaldéhyde en le condensant avec les malonate d'éthyle, acétoacétate d'éthyle, cyanoacétate d'éthyle, en présence de la pipéridine, pyridine ou autre base organique [16].

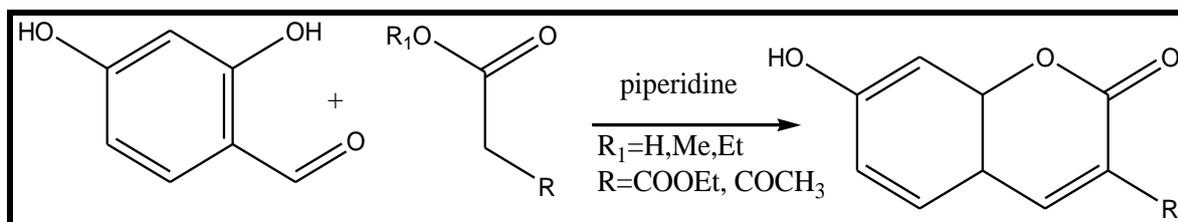


Schéma 11 : Synthèse de la coumarine à partir de la réaction de Knoevenagel [16]

La réaction de Knoevenagel présente l'avantage d'être moins contraignante que les couplages organométalliques et ne produit que de l'eau comme produit secondaire. La pipéridine, la diéthylamine et la triéthylamine sont parmi les catalyseurs les plus utilisés. D'après la littérature, la condensation de Knoevenagel est plus couramment conduite en catalyse basique [4]. Plusieurs auteurs ont pu utiliser cette réaction avec succès en changeant les réactifs et les conditions expérimentaux afin d'améliorer les rendements et réduire la complexité des réactions [16].

6.2. Synthèse de la 3-acétyl-2H-chromen-2-one :

La préparation de la coumarine se fait par la réaction de l'aldéhyde salicylique avec l'acétoacétate d'éthyle dans l'éthanol comme solvant et en présence de quelques gouttes de pipéridine à température ambiante (**Schéma 12**) [17], ou bien sans utilisation de solvant [18,19].

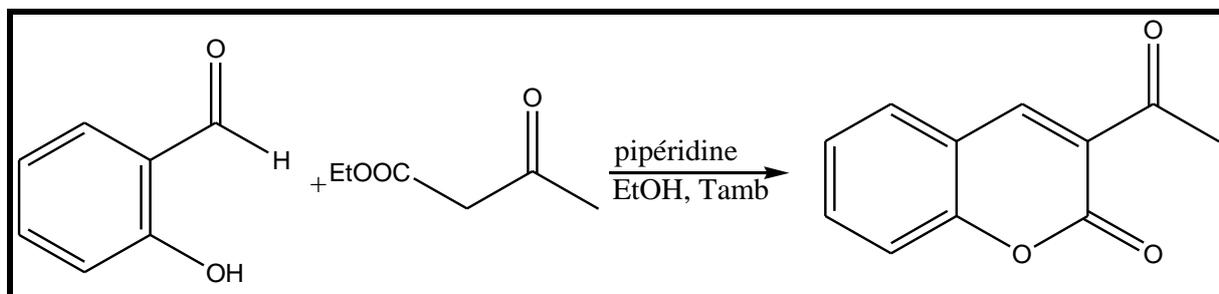


Schéma 12: Synthèse de 3-acétylcoumarine [17]

II. Molécules hybrides

1. Molécules hybrides :

La synthèse des molécules hybrides est une voie vers de nouveaux médicaments [4]. Au cours de ces dernières années, la stratégie d'hybridation moléculaire a adopté une nouvelle approche qui implique la conglomération de deux ou plusieurs pharmacophores dans un échafaudage moléculaire pour développer des molécules multifonctionnelles hybrides. Ces dernières ont des activités biologiques multiples, un profil de sélectivité modifié, une diversité ou dualité des modes d'action et / ou des effets secondaires indésirables réduits en raison du mélange des pharmacophores dans une molécule [20].

En utilisant cette approche, plusieurs groupes de recherche ont conçu et synthétisé de nombreuses molécules hybrides [20,21].

2. Réactions multicomposants :

Les premières réactions multicomposants ont vu le jour au milieu du 19^{ème} siècle lors de la synthèse d'acides aminés par Strecker (1850) [22] ou encore lors de l'élaboration de dihydropyridines selon Hantzsch (1882) [23] ou Biginelli (1891) [24].

2.1. Définition de la réaction multicomposants :

Les réactions multicomposants sont des réactions qui impliquent au moins trois produits de départ pour aboutir à la formation d'un seul produit complexe. Les produits de départ sont en général commerciaux ou aisément préparés [25]. Ces réactions sont des procédés très efficaces qui réunissent rapidité, diversité et complexité moléculaire [8].

Les réactions à composants multiples en une seule étape "*One Pot*" sont devenues un centre d'intérêt pour les chimistes organiciens, du fait qu'elles permettent un accès rapide aux bibliothèques combinatoires des molécules organiques [26].

2.2. Avantages des réactions multicomposants :

La mise au point des nouvelles réactions efficaces implique qu'elles soient chimio-, régio- et stéréosélectives. Aujourd'hui, à ces critères, viennent s'ajouter des nouvelles contraintes telles que la disponibilité et le coût des réactifs, la simplicité de la mise en œuvre expérimentale, la possibilité de la transposer à un appareil de synthèse automatisé, et enfin une économie en terme d'atomes et de respect de l'environnement.

Les réactions multicomposants apportent donc une réponse valable à toutes ces exigences qui tendent vers la synthèse idéale [27].

3. La réaction de Biginelli des dihydropyrimidinones:

En 1893, le chimiste italien Pietro Biginelli a rapporté, pour la première fois, la préparation d'une nouvelle molécule, la 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one, notée DHPM, par condensation de trois réactifs en une seule étape: le benzaldéhyde, l'acétoacétate d'éthyle et l'urée [28]. La réaction a été simplement achevée en chauffant un mélange de ces trois composants dissous dans l'éthanol avec une quantité catalytique de HCl à reflux. Le produit de cette nouvelle synthèse à trois composants et en une seule étape qui se précipite en refroidissant le mélange, il a été identifié comme la 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**Schéma 13**). Cette réaction est connue sous le nom de la "réaction de Biginelli", "condensation de Biginelli" ou "la synthèse des dihydropyrimidines de Biginelli" [29].

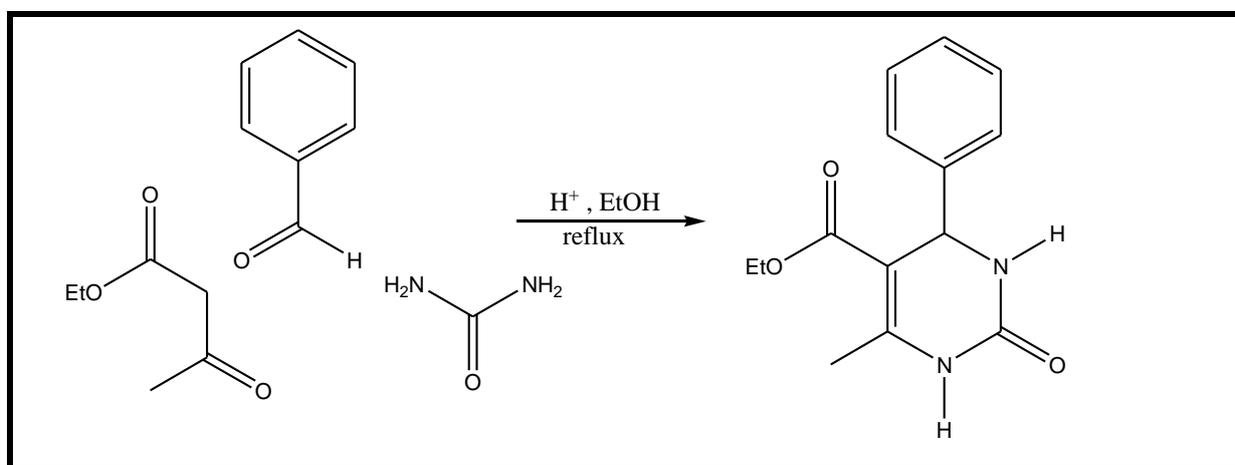


Schéma 13: Synthèse originale des 3,4-dihydropyrimidinone de Biginelli [29]

Dans une première étude P. Biginelli a présenté le produit original comme étant une structure acyclique du benzuramido-crotonate d'éthyle, alors qu'il s'attendait à une structure semblable à celle obtenue par A. Hantzsch. Une étude plus approfondie lui a permis de déterminer les conditions exactes; il a utilisé 20 gouttes d'HCl afin d'aboutir à la structure des DHPMs (**schéma 14**) [28].

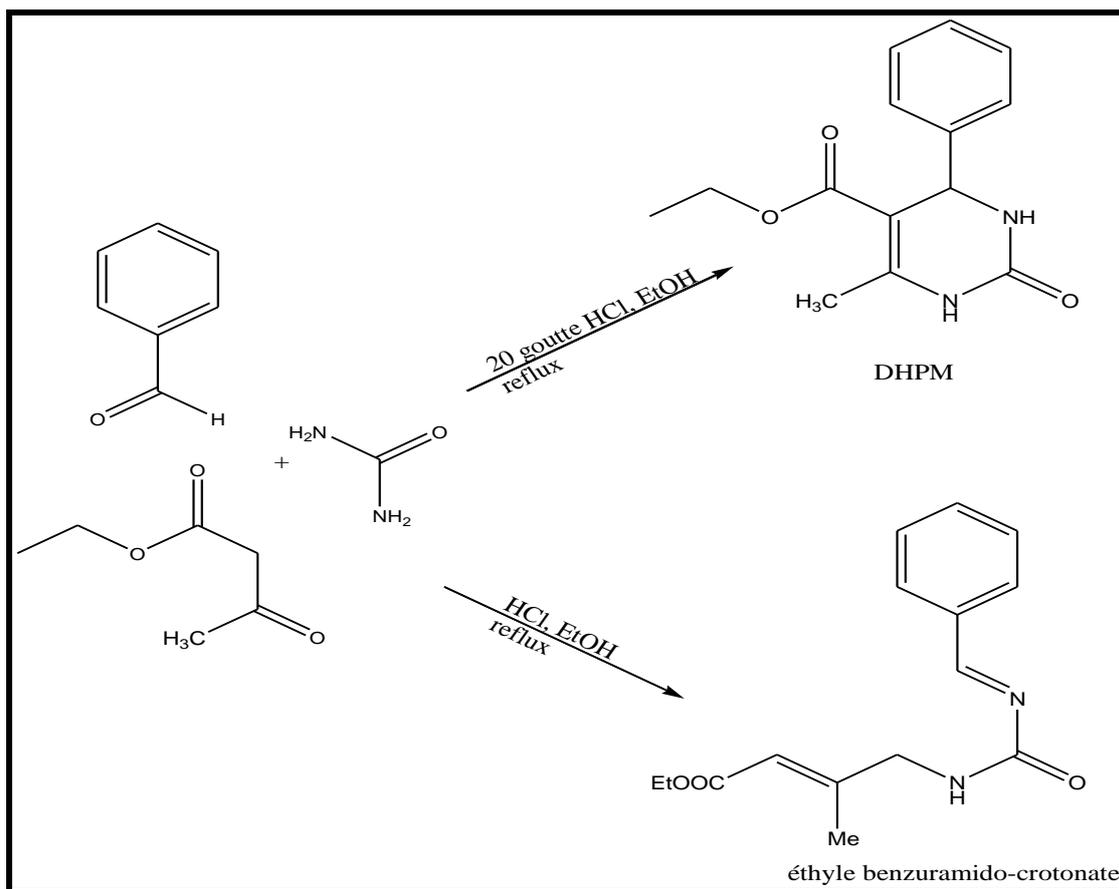


Schéma 14: Réaction d'obtention de DHPM par la réaction de Biginelli [28]

Bien que les exemples préliminaires de processus de cette cyclocondensation typiquement implique un β -cétoester, un aldéhyde aromatique et l'urée, l'ampleur de cette synthèse hétérocyclique est maintenant étendue considérablement par la variation de tous les trois blocs de cette synthèse, ceci a permis l'accès à une large gamme des dérivés de la pyrimidine multifonctionnalisés [29].

4. Mécanisme de la réaction de Biginelli :

Le mécanisme de la réaction de Biginelli ainsi que la structure des réactifs utilisés suggèrent la formation de deux dihydropyrimidinones/thiones possible. Ce processus commence par la formation d'une imine, par condensation du benzaldéhyde avec l'urée / thio-urée, qui réagit ensuite avec le 1,3-dicarbonylé après protonation de l'azote de l'imine. Dans la dernière étape du mécanisme il y a deux sites de cyclisation possibles, qui peuvent mener après déshydratation à la DHPMs (**Schéma 15**) [4].

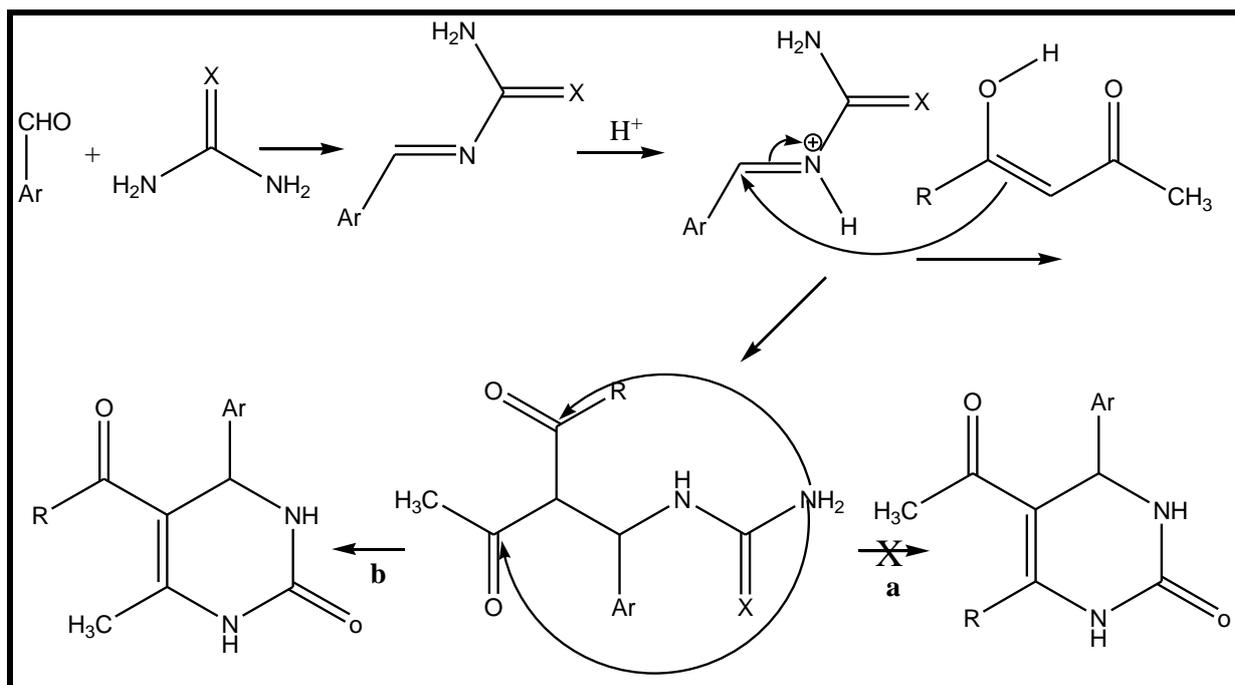
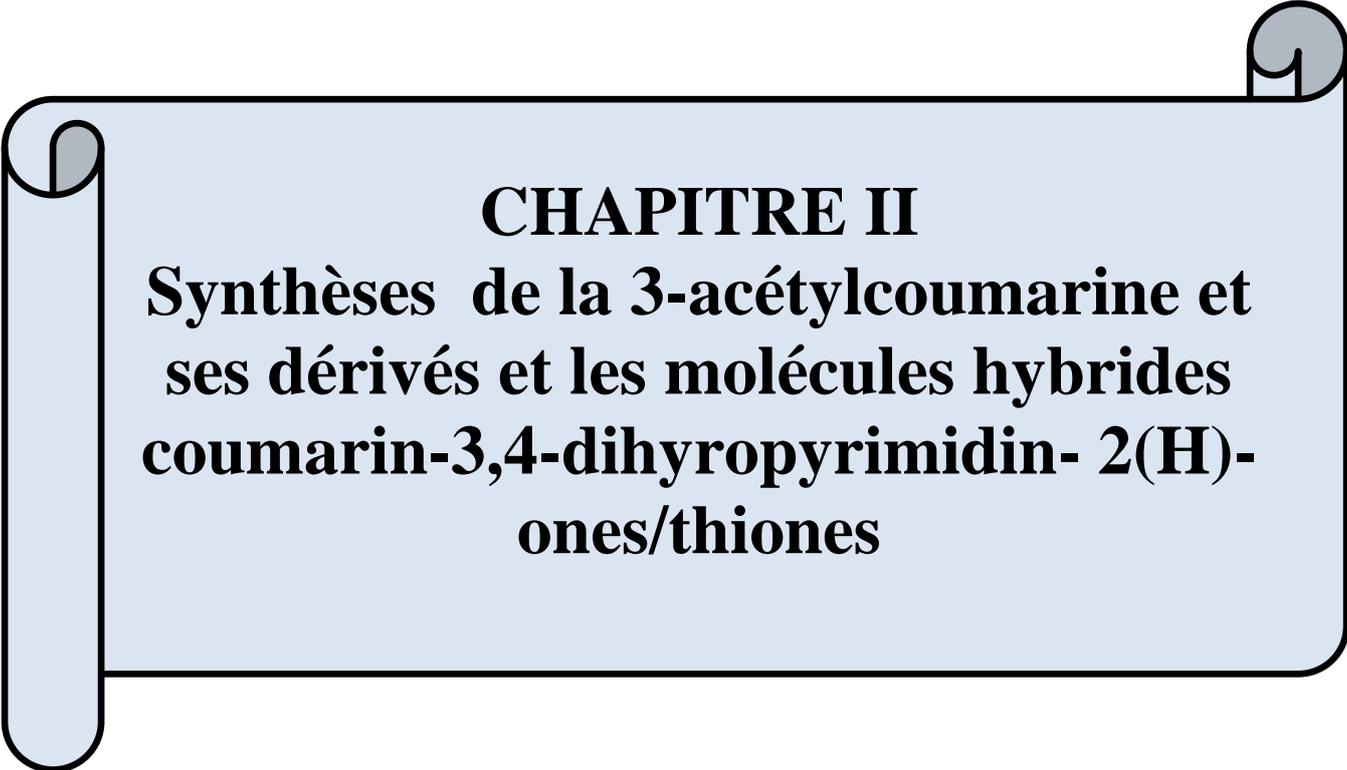


Schéma 15: Mécanisme de formation des dihydropyrimidinones/thiones [4]

5. Intérêts biologiques des dihydropyrimidinones :

Les DHPMs présentent un système hétérocyclique d'une efficacité pharmacologique remarquable. Un large domaine d'activités biologiques y compris l'activité antivirale [30], antitumorale [31], antibactérienne [32] et anti-inflammatoire [33, 34] a été attribué à ces dérivés de la pyrimidinone. Plus récemment, les DHPMs fonctionnalisées sont apparus comme des puissants inhibiteurs calciques, agents anti-hypertensifs, effectivement des DHPMs intéressantes sont considérées comme une classe importante des molécules dans le traitement des diverses maladies [26].



CHAPITRE II
Synthèses de la 3-acétylcoumarine et
ses dérivés et les molécules hybrides
coumarin-3,4-dihydropyrimidin- 2(H)-
ones/thiones

Les coumarines et leurs dérivés représentent la structure de base de plusieurs molécules des produits pharmaceutiques. La plupart d'entre elles sont douées d'activités biologiques dues à la présence d'hétérocycle dans leurs structures [6].

Les dihydropyrimidinones et leurs analogues soufrés sont des composés hétérocycliques importants qui sont documentés dans la littérature [3], en raison de leur valeur biologique. Plusieurs méthodes pour préparer ces composés ont été développées et la réaction de Biginelli a reçu progressivement une importance considérable et particulière dans les programmes de recherche.

Les propriétés pharmacologiques des coumarines et des dihydropyrimidinones/thiones ont suscité notre intérêt dont le principal but est de tester leurs activités biologiques.

Notre premier objectif de cette étude est la condensation des dérivés de salicyaldéhyde avec l'acétoacétate d'éthyle, afin de préparer une série des dérivés de la 3-acétylcoumarines **3a-g** par la réaction de Knoevenagel dont leurs activités biologiques seront étudiées dans le chapitre qui suit. Le second objectif, est l'utilisation de la 3-acétylcoumarine **3a** synthétisée comme réactif du départ, afin de préparer une série des molécules hybrides **6a-f**, dont leurs activités biologiques seront étudiées par la suite.

1. Etude par chromatographie sur couche mince des composés (3a-g):

La pureté de chaque produit obtenu a été confirmée par la chromatographie sur couche mince (CCM). C'est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse.

Dans notre cas, nous avons utilisé des plaques de gel de silice 60 F254 (phase stationnaire) à support en aluminium prêtent à l'emploi, la phase mobile ou éluant (généralement un mélange binaire ou ternaire de solvant) migre à la surface de la plaque par capillarité.

L'étude en chromatographie sur couche mince a été réalisée dans un éluant constitué d'un mélange de solvants chloroforme - méthanol (2ml / 6 goutte). La révélation des produits a été effectuée en utilisant l'iode. Nous avons constaté la présence d'une seule tâche différente de celle du produit de départ dont les rapports frontaux **R_f** obtenus (**tableau 2**) sont donnés par la relation suivante :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le composé}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

Tableau 2: Rapports frontaux de la 3-acétylcoumarine et ses dérivés (3a-g)

Composé	R _f
3a	0.80
3b	0.71
3c	0.56
3d	0.66
3e	0.68
3f	0.53
3g	0.88

2. Analyse par spectroscopie UV-Visible des composés (3a-g):

La spectrophotométrie UV-Visible est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution. Les spectres d'absorption UV-Visible des composés 3a-g réalisés dans du DMSO à une concentration de 10⁻⁵M montrent une longueur d'onde d'absorption correspondant au groupement C=O de la coumarine qui apparait habituellement entre 200 et 290 nm [37] et d'autre bande assez intense allant de 315-396 nm qui peuvent être attribuées aux transitions π→π*. Les résultats UV-Visible (en nm) sont reportés dans le tableau 3.

Tableau 3: Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible des composés (**3a-g**):

Composé	$\lambda_1 (\pi \rightarrow \pi^*)$	$\lambda_2 (\pi \rightarrow \pi^*)$	$\lambda_3 (\pi \rightarrow \pi^*)$
3a	284	347	-
3b	266	324	-
3c	262	327	375
3d	263	322	396
3e	269	315	335
3f	275	-	369
3g	263	329	383

Les spectres UV-Visible des composés **3a**, **3b**, **3f** et **3g** obtenues sont schématisés dans les figures (1, 2, 3,4).

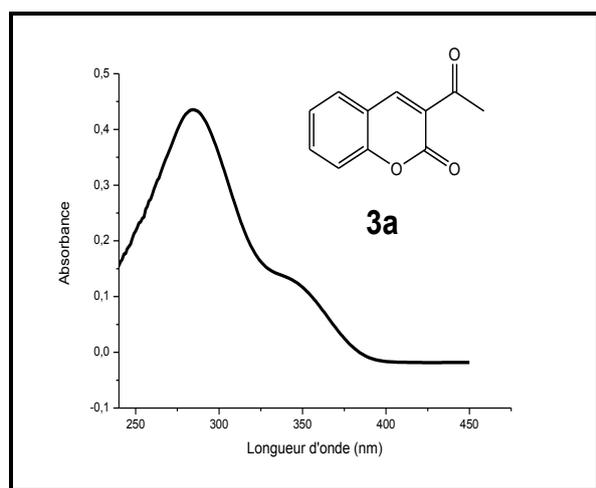


Figure 1: Spectre UV-Vis du composé **3a**

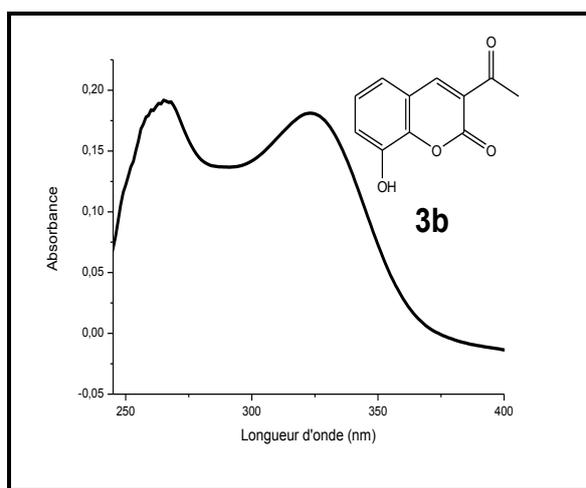


Figure 2: Spectre UV-Vis du composé **3b**

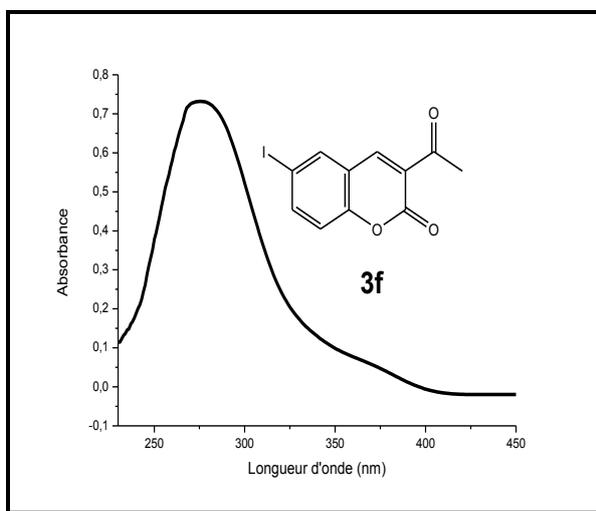


Figure 3: Spectre UV-Vis du composé **3f**

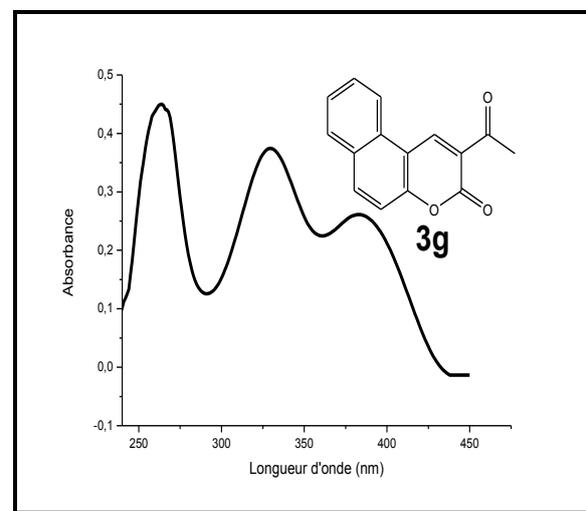


Figure 4: Spectre UV-Vis du composé **3g**

3. Analyse par spectroscopie IR des composés (3a-g):

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

Cette étude a confirmé l'obtention des composés **3a-g** par la formation du groupement (O-C=O) par la présence d'une bande intense dans le domaine qui le caractérise entre 1710 et 1740 cm^{-1} [35]. Les spectres ont montré la présence d'une bande large à 3470 cm^{-1} qui est attribuée à la fonction (=C-OH) (énol) et une bande à 1660 cm^{-1} , relatif à les fonctions (-C=O). Les principales bandes enregistrées sont données dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Résultats des spectres IR enregistrés des composés (**3a-g**) :

Composé	Bandes caractéristiques enregistrées (cm^{-1})
3a	1728 (O-C=O), 1661 (C=O), 1089 (C-O), 1606 (C=C aromatique) Litt [35] : 1710 (O-C=O) ,1095(C-O).
3b, 3c, 3d	3470 (OH, éno), 1710 (O-C=O), 1661(C=O), 1606 (C=C aromatique), 1214 (C-O).
3 e	1756 (O-C=O), 1674(C=O), 1531 (C=C), 1211(C-N), 1116 (C-O).
3f	1728 (O-C=O), 1674 (C=O), 1549 (C=C), 1116 (C-O), 558 (C-I). Litt [37] : 1728 (O-C=O), 1604 (C=C), 557 (C-I).
3g	1733(O-C=O), 1674(C=O), 1551 (C=C), 1098 (C-O).

Les spectres IR des composés **3a**, **3c** et **3e** sont représentés par les figures (5-7).

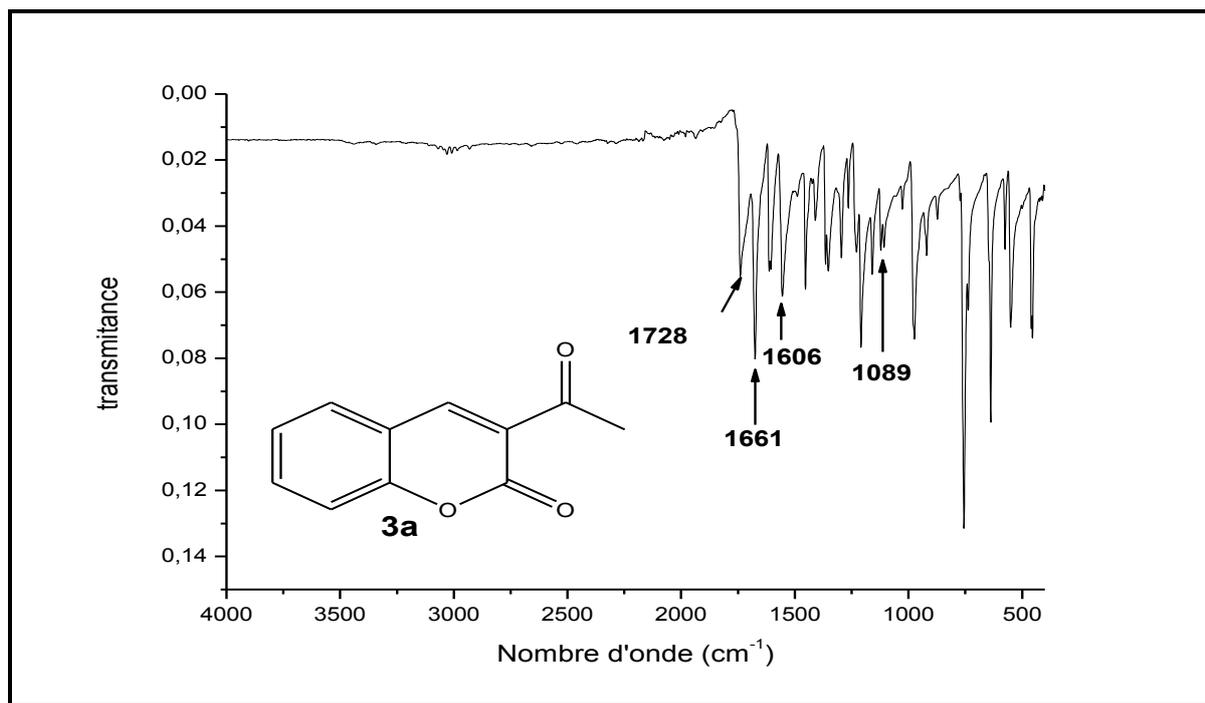


Figure 5: Spectre IR du composé **3a**

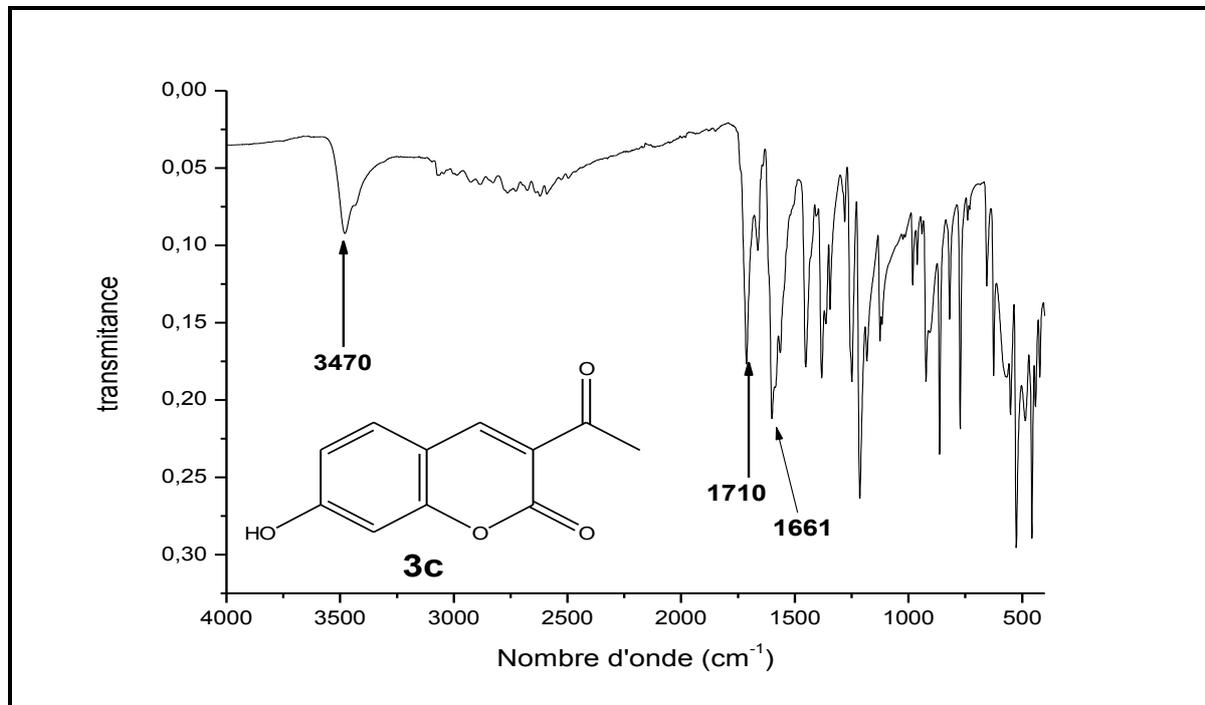


Figure 6: Spectre IR du composé **3c**

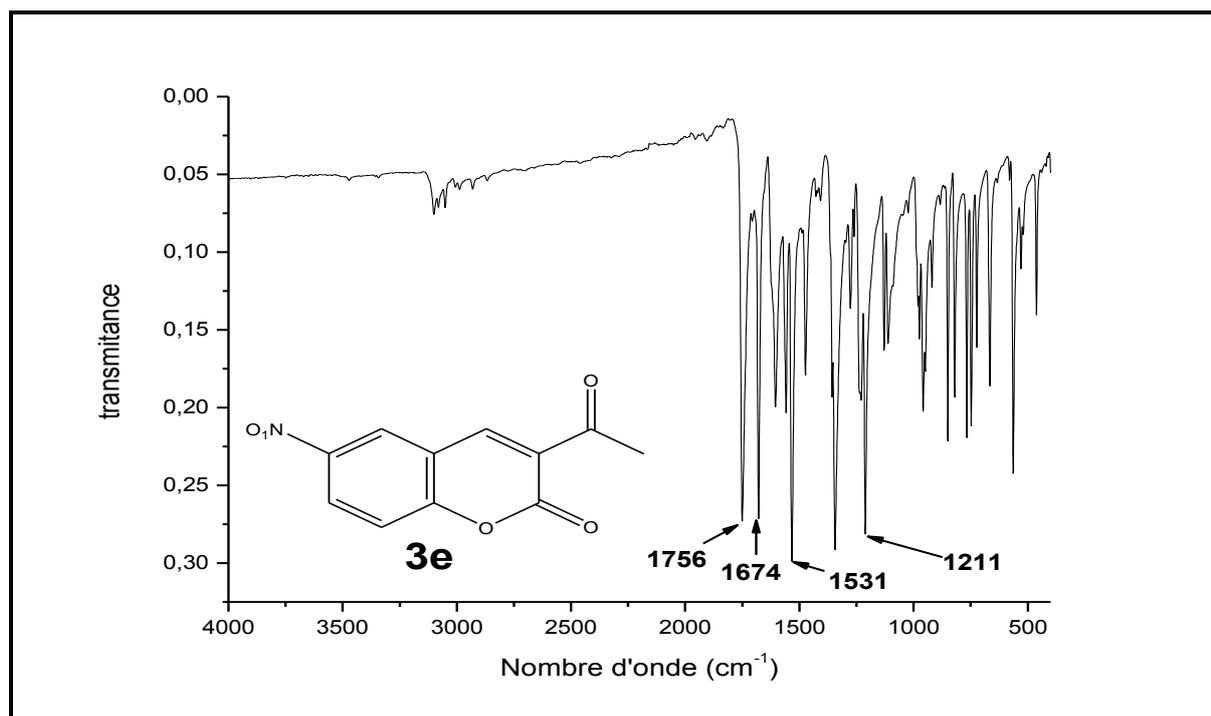


Figure 7: Spectre IR du composé **3e**

4. Mécanisme réactionnel de formation de la 3-acétylcoumarine et ses dérivés (3a-g):

Deux mécanismes pouvant se produire lors de cette réaction. Afin de déterminer le mécanisme le plus probable de se produire, une étude théorique a été évaluée par des théoriciens qui ont déterminé l'énergie la plus basse de la réaction. Les résultats ont démontré que le mécanisme le plus susceptible de se produire est le mécanisme suivant (**Schéma 17**) : Le mécanisme de Knoevenagel nécessite la présence d'une base faible pour arracher le proton en α -carbonyle. Le mécanisme est suivi par une addition électrophile sur le salicylaldéhyde qui mène à la 3-acétylcoumarine après une cyclisation et une déshydratation intramoléculaire.

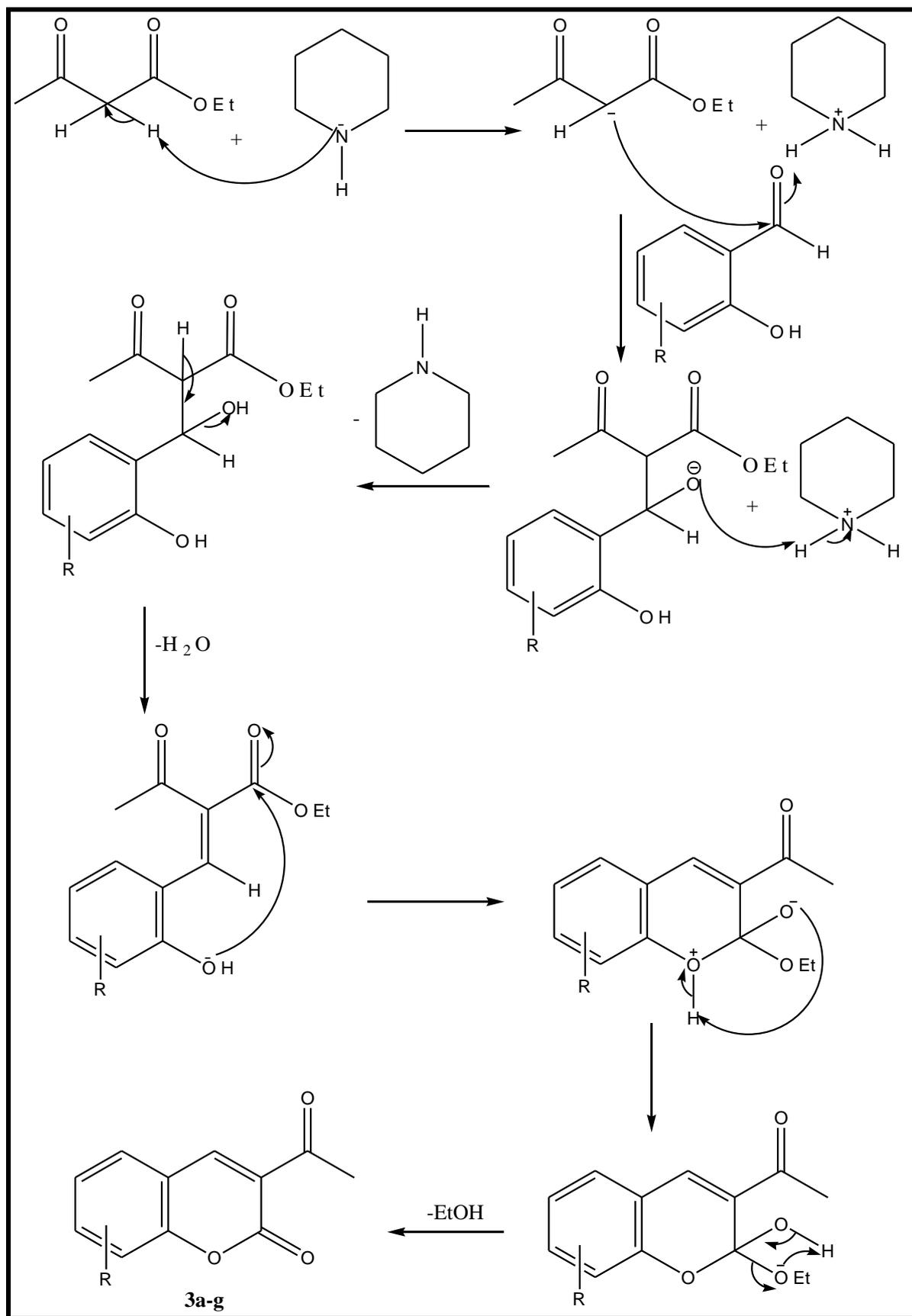


Schéma 17: Mécanisme de la réaction de Knoevenagel pour la 3-acétylcoumarine et ses dérivés (3a-g)

II. Synthèse des molécules hybrides coumarin-3,4- dihydropyrimidin-2(H)-ones/thiones (6a-f):

Suite au recherche de nouvelles voies de synthèse des composés hétérocycliques biologiquement actifs, nous avons adopté la synthèse de Biginelli en une seule étape des 4-aryl-6-(2-oxo-2H-chromène)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones / thiones qui a été décrite dans la littérature [19]. Une réaction à plusieurs composants a été établie, en utilisant la 3-acétyl-2-oxo-2H-chromène **3a**, et l'urée / thio-urée **4**, et les dérivés de benzaldéhyde substitués en para **5** en présence d'acide acétique comme solvant et d'acétate d'ammonium (catalyseur) à reflux (Schéma 18).

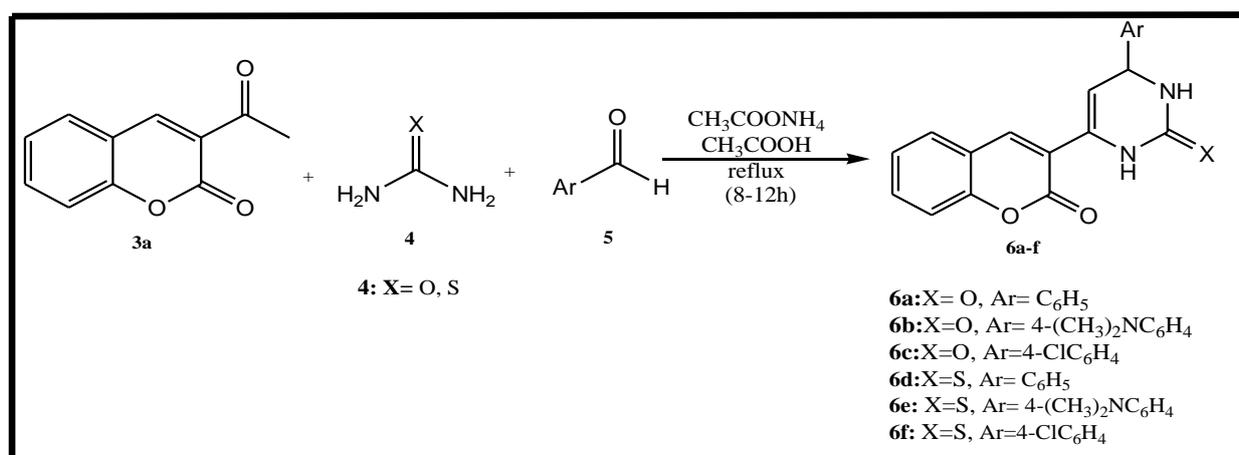


Schéma 18: Synthèse des molécules hybrides coumarin-3,4-dihydropyrimidinones/thiones (6a-f)

L'évaluation de cette réaction a été suivie par CCM, un solide a été récupéré (différemment colorés). Les résultats physico-chimiques : point de fusion et rendement et aspect sont rapportés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Propriétés physico-chimiques des coumarin-3,4- dihydropyrimidin-2(H)-ones/thiones (6a-f) :

Composé	Pf (°C)	Pf (°C) litt	Rd (%)	Aspect
6a	186-188	-	32	Solide marron clair
6b	230-232	241-243[20]	42	Solide rouge brique
6c	214-216	209-211[20]	41	Solide Jaune pâle
6d	167-169	-	21	Solide orange
6e	199-201	-	13	Solide rouge brique
6f	203-205	-	28	Solide crevette

1. Etude par Chromatographie sur couche mince des composés (6a-f):

L'analyse par CCM des composés **6a-f** a confirmé leurs puretés par la présence d'une seule tâche distincte dont les rapports frontaux sont donnés dans le tableau 6.

Tableau 6: Rapports frontaux des composés (**6a-f**):

Composé	Rf
6a	0.51
6b	0.60
6c	0.84
6d	0.86
6e	0.89
6f	0.86

2. Analyse par spectroscopie UV-Visible des composés (6a-f) :

Les spectres d'absorption UV-Visible des composés **6a-f** sont réalisés dans du DMF. Ces derniers montrent des bandes distinctes dont les valeurs et les transitions électroniques (en nm) sont reportées dans le tableau 7. Ils montrent une bande d'absorption correspondante à la fonction (-C=O) de la coumarine qui apparaît habituellement entre 200-300 nm et d'autres bandes d'absorption correspondantes aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ [19].

Tableau 7: Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible des composés (**6a-f**) :

composé	$\lambda_1 (\pi \rightarrow \pi^*)$	$\lambda_2 (\pi \rightarrow \pi^*)$	$\lambda_3 (\pi \rightarrow \pi^*)$
6a	288	345	-
6b	-	341	419
6c	300	341	-
6d	300	344	-
6e	300	341	422
6f	300	340	-

Les spectres UV-Visible enregistrés des composés **6b**, **6c**, **6d** et **6f** sont schématisés dans les **Figure 8-11** :

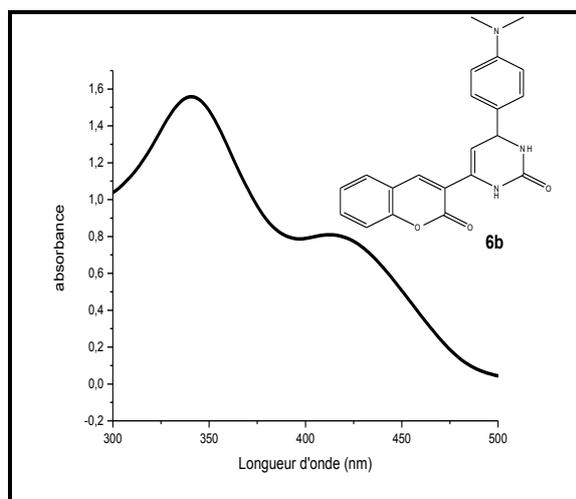


Figure 8: Spectre UV-Vis du composé **6b**

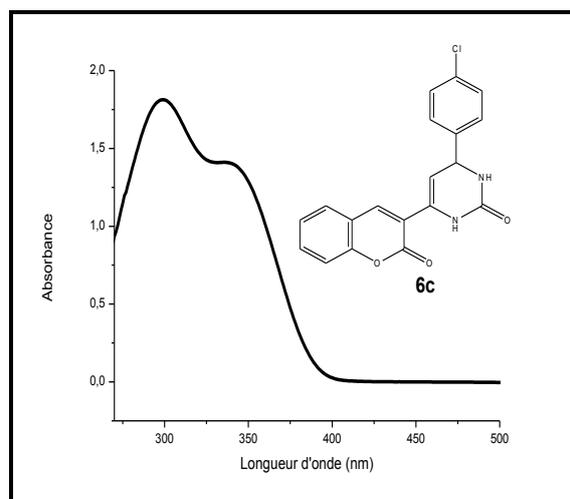


Figure 9: Spectre UV-Vis du composé **6c**

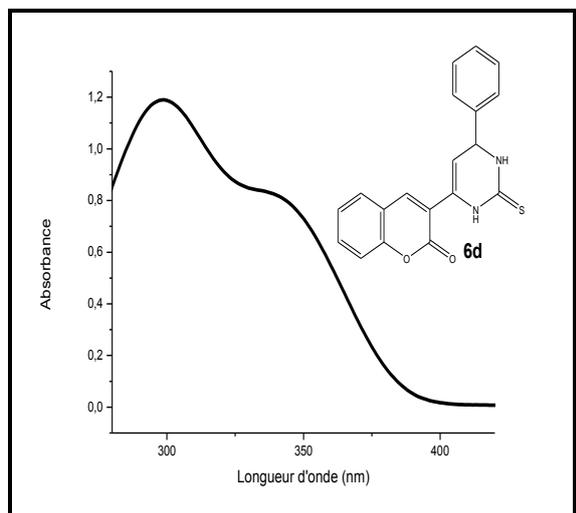


Figure 10: Spectre UV-Vis du composé **6d**

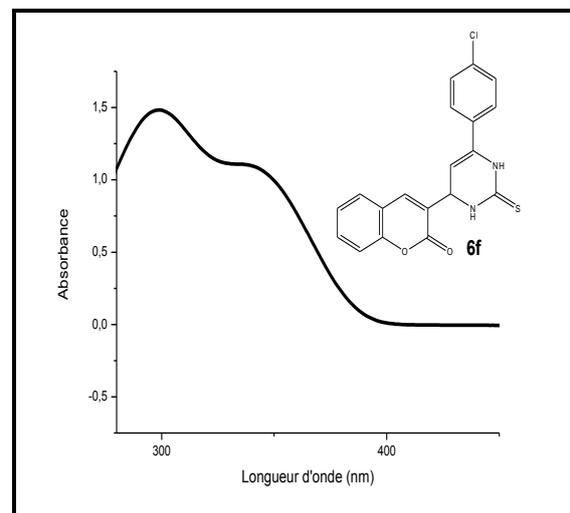


Figure 11: Spectre UV-Vis du composé **6f**

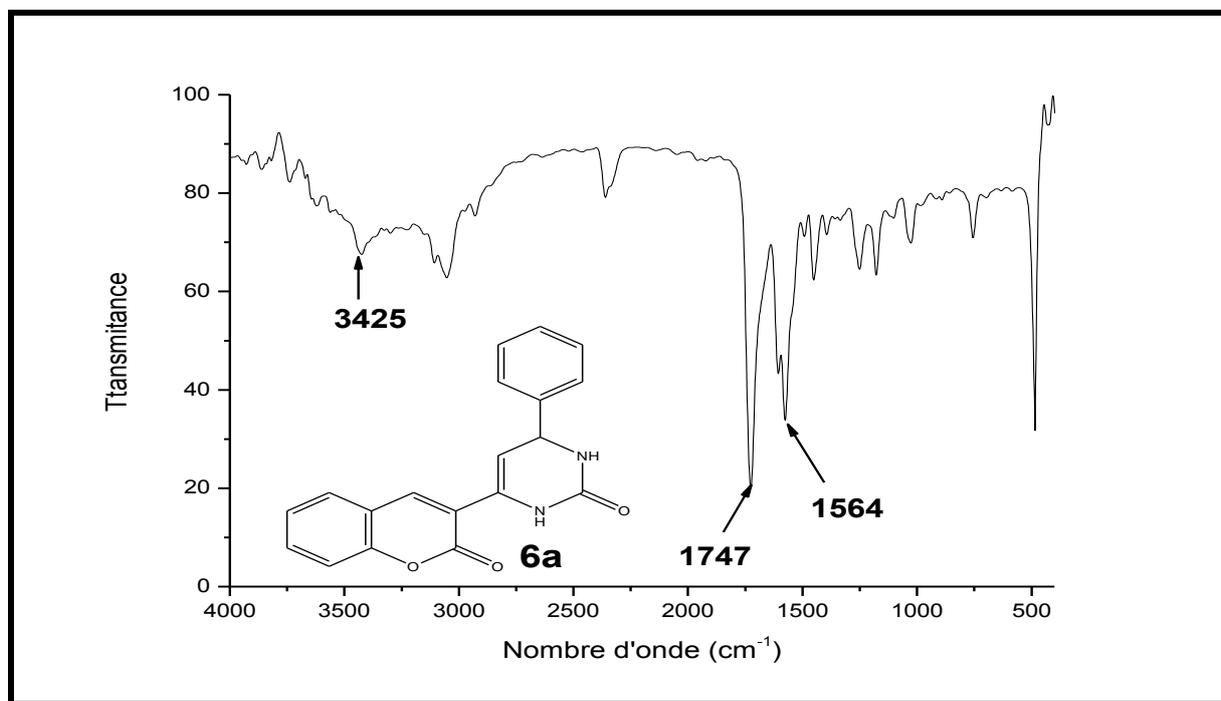
3. Analyse par spectroscopie IR des composés (6a-f) :

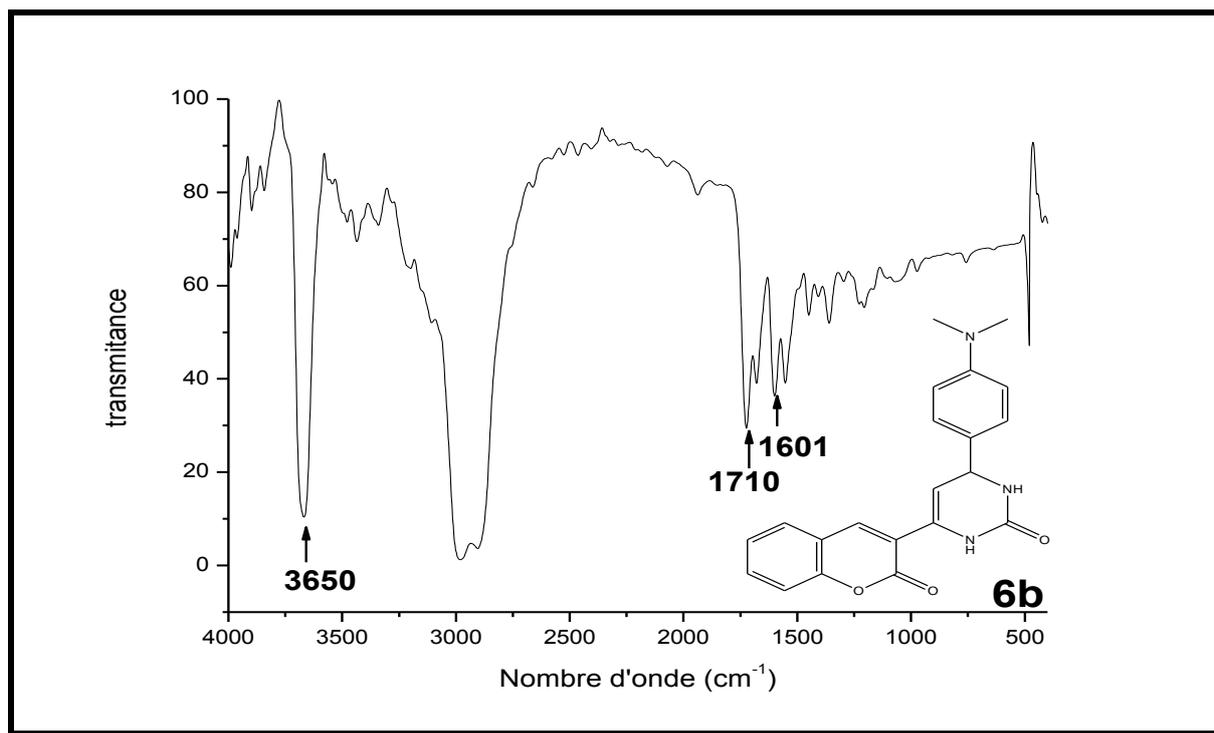
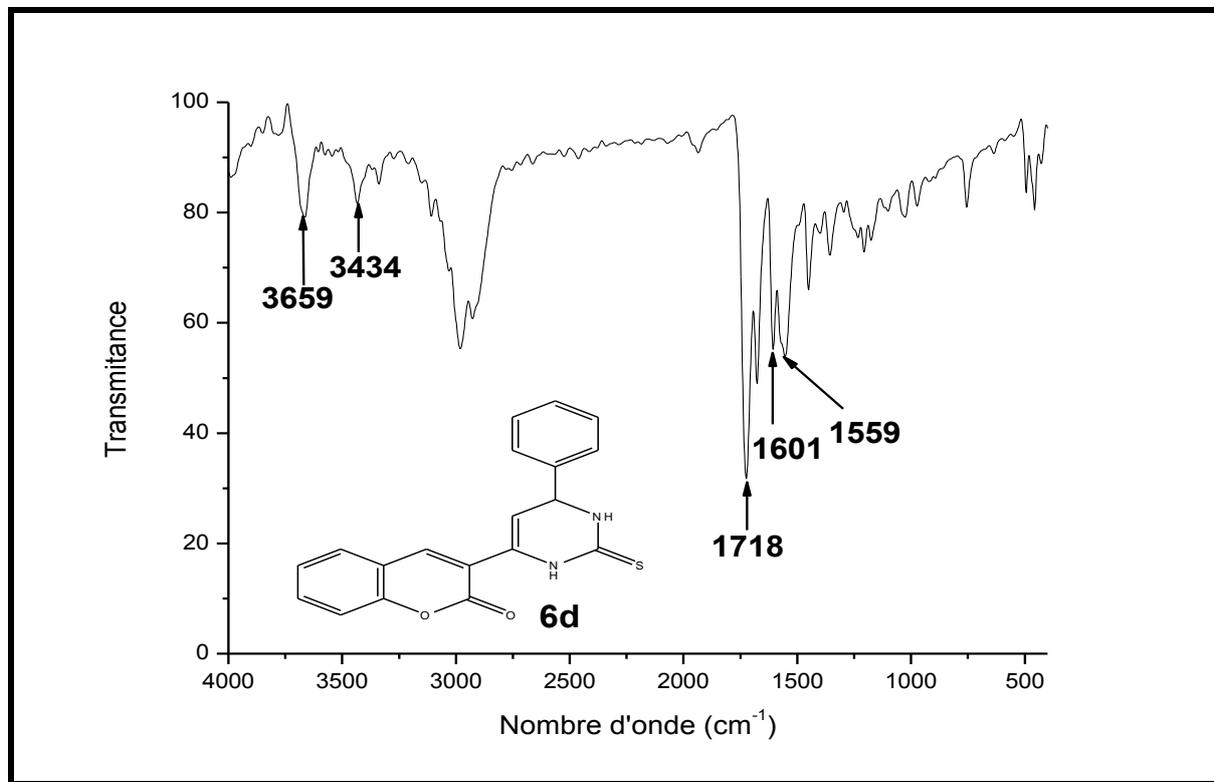
L'analyse par spectroscopie infrarouge a confirmé l'obtention des composés **6a-f** par la formation de deux liaisons (N-H) du noyau dihydropyrimidinone par la présence d'une bande intense dans le domaine qui le caractérise entre 3425 et 3659 cm^{-1} . Les spectres ont montré la présence d'une bande entre 1710-1750 cm^{-1} , relatif à la fonction (O-C=O) [19]. Les principales bandes obtenues sont données dans le tableau suivant :

Tableau 8: Résultats des spectres IR enregistrés des composées (**6a-f**) :

Composé	Bandes caractéristiques enregistrées (cm ⁻¹)
6a	3425 (N-H), 1747 (O-C=O), 1564 (N-H)
6b	3650 (N-H), 1710(C=O lactone), 1601(C=O amide) Litt [37]: 3201(N-H), 3070 (C-H aromatique), 1712 (C=O lactone), 1643(C=O amide)
6c	3443 (N-H), 1728 (C=O lactone), 1670 (C=O amide), 1565 (C=C) Litt [37]: 3354(N-H), 1743 (C=O lactone), 1687(C=O amide), 1567(C=C), 758 (C-Cl)
6d	3659 (N-H), 1718(C=O lactone), 1601(N-H), 1559(C=S)
6f	3429 (N-H), 1727 (C=O lactone), 1610 (C=C), 1554(C=S)

Les spectres IR des composés **6a**, **6b** et **6d** sont représentés par les figures (12-14).

**Figure 12:** Spectre IR du composé **6a**

Figure 13: Spectre IR du composé **6b**Figure 14: Spectre IR du composé **6d**

4. Mécanisme réactionnel de formation des coumarin-3,4-dihydropyrimidinones/thiones (6a-f):

Le mécanisme proposé se fait selon deux étapes principales :

- Première étape : formation d'une imine à partir de la condensation de l'aldéhyde ou l'un de ses dérivés avec l'urée/thio-urée.
- Deuxième étape : action de la 3-acétylcoumarine sur l'imine qui conduit après déshydratation à la formation du produit final.

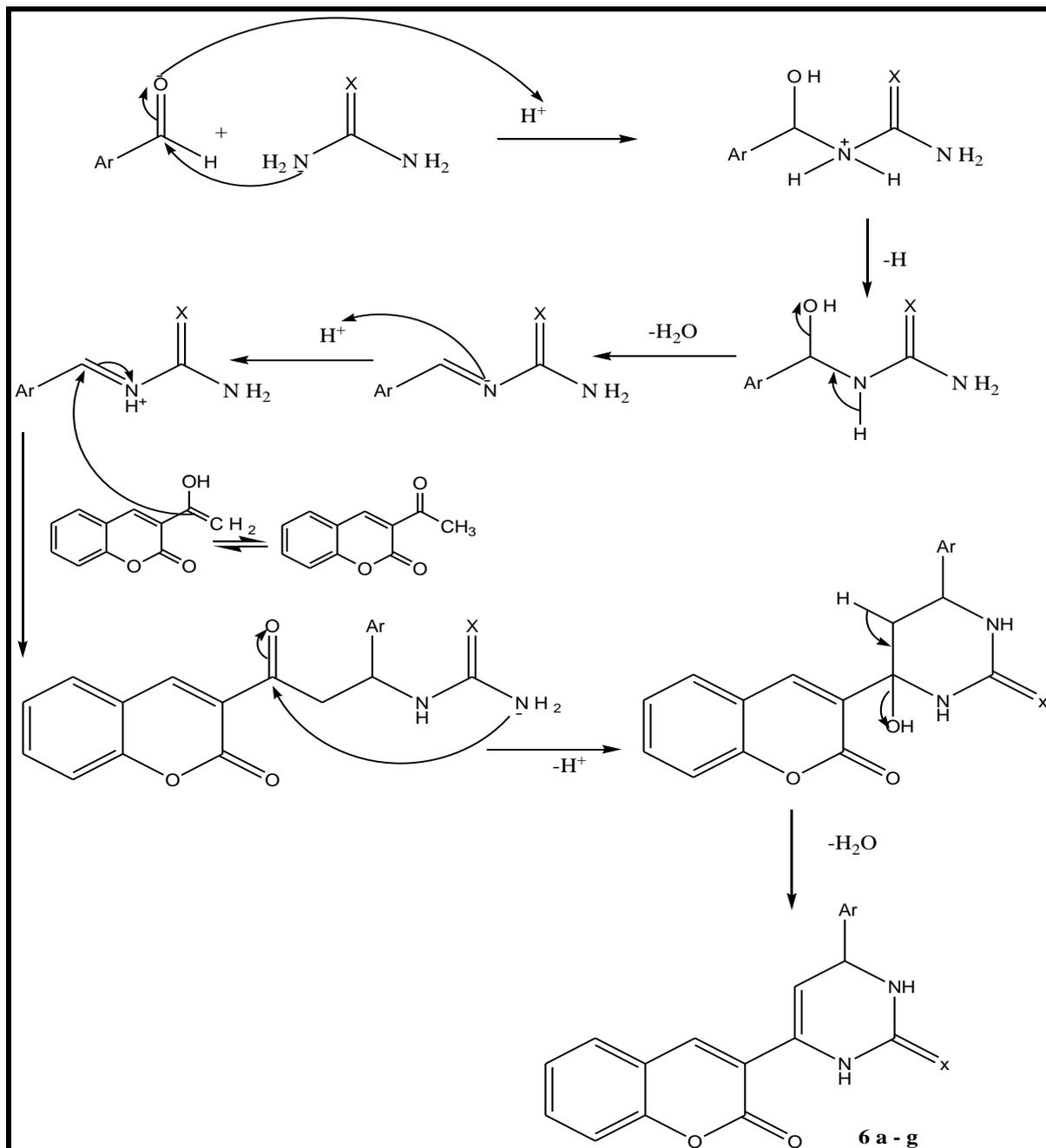


Schéma 19: Mécanisme de la réaction de Biginelli pour les composés coumarin-3,4-dihydropyrimidinones/thiones (6a-f)

Dans la première partie, nous avons pu synthétiser la 3-acétylcoumarine et ses dérivés **3a-g** par condensation de Knoevenagel de l'acétoacétate d'éthyle avec des dérivés de salicyaldéhyde en présence d'une base faible (pipéridine). Le meilleur rendement a été observé pour la 3-acétylcoumarine **3a** avec une valeur de **91** %.

Dans la deuxième partie, nous avons essayé de synthétiser des nouvelles molécules hybrides coumarin-dihydropirimidinones/thiones à partir de l'acétylcoumarine **3a** synthétisée dans la première partie, des aldéhydes et l'urée/thio-urée par la réaction multicomposants de Bigenilli dans des conditions bien déterminées. Des rendements de faible à modéré ont été obtenus.

Les produits obtenus ont été bien identifiés en utilisant les différentes techniques d'analyses usuelles (CCM, UV-Vis et I.R). Certains résultats ont été comparés à celles cités dans la littérature.

Nous avons procédé par la suite à la valorisation de nos produits en étudiant leurs activités biologiques qui seront détaillées dans le chapitre suivant.

1. Appareillages :

Au cours de ce travail l'appareillage suivant a été utilisé :

- **Point de fusion :**

Les points de fusion exprimés en °C ont été déterminés à l'aide d'un appareil SPM30 équipé d'un microscope, réalisés au laboratoire de chimie pharmaceutique de pédagogie du département de chimie de l'UMMTO.

- **Chromatographie sur couche mince :**

La chromatographie analytique sur couche mince (CCM) a été effectuée sur des plaques en aluminium recouvertes de gel de silice 60 F254 de MERCK.

Les plaques ont été révélées avec l'iode et la présence d'une seule tâche confirme la pureté de nos produits.

- **Spectrométrie Infrarouge :**

Les spectres IR des composés synthétisés ont été enregistrés sur un spectrophotomètre de type PERKIN ELMER Spectrometer two au niveau du laboratoire de synthèse macromoléculaire et thioorganique macromoléculaire à l'USTHB, et à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge à transformée du fourrier (IRTF) de modèle JASCO FT/IR-4200-ATR PRO450-S, à l'université de Bouira. Les nombres d'ondes (ν) sont donnés en cm^{-1} .

- **Spectrophotométrie UV/visible :**

Les mesures en spectrophotométrie UV-Visible sont réalisées dans le laboratoire de LPCM de l'UMMTO. Les bandes d'absorption ont été enregistrées sur un appareil scientifique de marque Thermo Scientific EVOLUTION 220, UV-Visible spectrophotomètre. Le produit de la 3-acétylcoumarine et ses dérivés synthétisés ont été dissoutes dans du DMSO et celles des dihydropirimidinones/thiones dans le DMF.

2. Matériels :

Les solvants utilisés : éthanol, acide acétique, méthanol, chloroforme, DMSO et DMF sont apportés par SIGMA-ALDRICH, SCHARLAU, ARCOS organics, carlo ERBA.

Les réactifs sont : salicylique aldéhyde, acétoacétate d'éthyle, benzaldéhyde et ses dérivés substitués en para, urée / thio-urée sont commerciaux.

Les catalyseurs: pipéridine, acétate d'ammonium sont commerciaux.

3. Manipulations

Le mode opératoire utilisé pour la synthèse des coumarines a été décrit dans la littérature [20].

3.1. Synthèse de la 3-acétylcoumarines

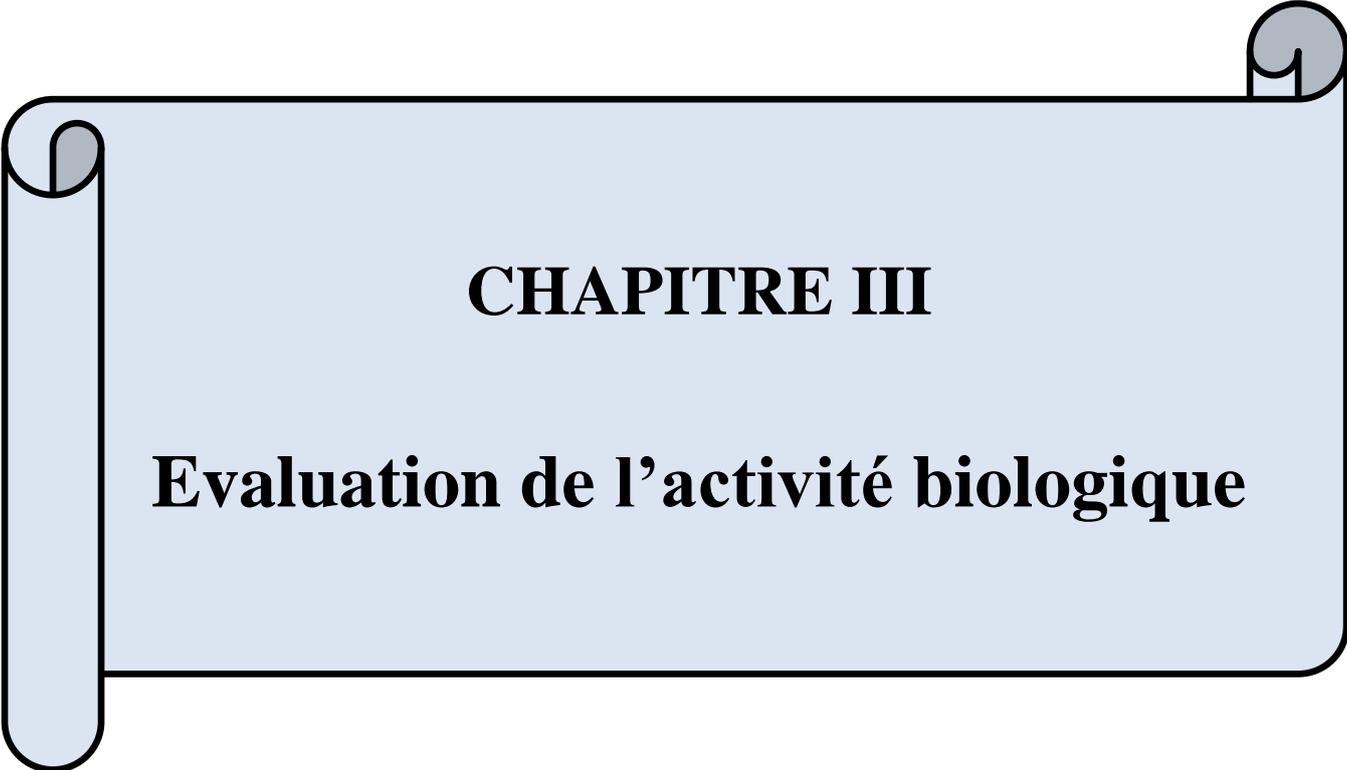
Un mélange de quantités équimolaires, de l'aldéhyde salicylique (20 mmole), et de l'acétoacétate d'éthyle (20 mmole) et en présence de trois goutte de pipéridine, a été mis en réaction dans un bécher de 50 ml. Le mélange a été laissé sous agitation à température ambiante jusqu'à formation d'un solide. En fin de réaction, le solide a été récupéré par filtration ensuite recristallisé dans l'éthanol.

3.2. Synthèse des molécules hybrides coumarin-3,4- dihydropyrimidin-2(H)-ones/thiones:

Un mélange de quantités équimolaires, de 3-acétylcoumarines **3a** (5 mmol) avec un dérivé benzaldéhydes **4** (5 mmol), de l'urée / thiourée **5** (5 mmol) et de l'acide acétique concentré (5 ml) en présence d'acétate d'ammonium (10%) a été laissé sous agitation à reflux pendant (8-12h).

La réaction a été suivie par CCM pour déterminer sa durée, celle-ci varie selon l'aldéhyde utilisé et l'urée/thio-urée.

Le solide formé obtenu a été lavé avec de l'eau froide jusqu'à obtention d'un pH neutre, suivi par filtration et recristallisé dans l'éthanol.



CHAPITRE III

Evaluation de l'activité biologique

Introduction :

Les composés contenant le noyau de la coumarine (2H -1- benzopyrone -2- one), constituent une classe importante des hétérocycles, qui occupent une place importante dans le monde des produits naturels et de la chimie organique synthétique [18]. Leurs dérivés présentent l'une des classes actives des composés ayant un large spectre d'activité biologique comme antibactérienne [8], anti-oxydante [14].

L'étude bibliographique révèle que les produits de Biginelli ont un potentiel thérapeutique considérable qui a donné naissance à une panoplie de produits qui ont des activités biologiques intéressantes comme antibactérienne [32].

I. Activité antioxydante :

Certaines recherches scientifiques récentes ont mis en évidence l'existence des facteurs communs responsables aussi bien du vieillissement que de maladies liées au stress oxydant comme le cancer, les maladies cardio-vasculaires, les maladies neurodégénératives (Parkinson et Alzheimer), et aussi certaines allergies et autres maladies chroniques. Ces diverses maladies auraient, entre autres, la même composante qui permet au bois de brûler, à l'huile de rancir, à l'aliment d'altérer ou au fer de rouiller. L'un des principaux acteurs de tout cela est l'oxydation de l'oxygène [38].

1. Stress oxydatif :

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [39].

2. Les radicaux libres :

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés [40].

Cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre [41].

3. Les antioxydants :

Dans les systèmes biologiques, un antioxydant est une substance qui, en faible concentration comparativement à la quantité des substances oxydables telles les espèces oxygénées réactives (ERO), retarde significativement ou prévient l'oxydation des substrats. Son rôle est d'intercepter les radicaux libres avant qu'ils ne réagissent avec le substrat [42].

La définition large du terme antioxydant est : « toute substance qui, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation d'un substrat » [42].

4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, in vitro et in vivo, l'activité antioxydante par piégeage des radicaux différents (**Tableau 9**). Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise [43-44].

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la méthode la plus courante qui est la méthode de DPPH .

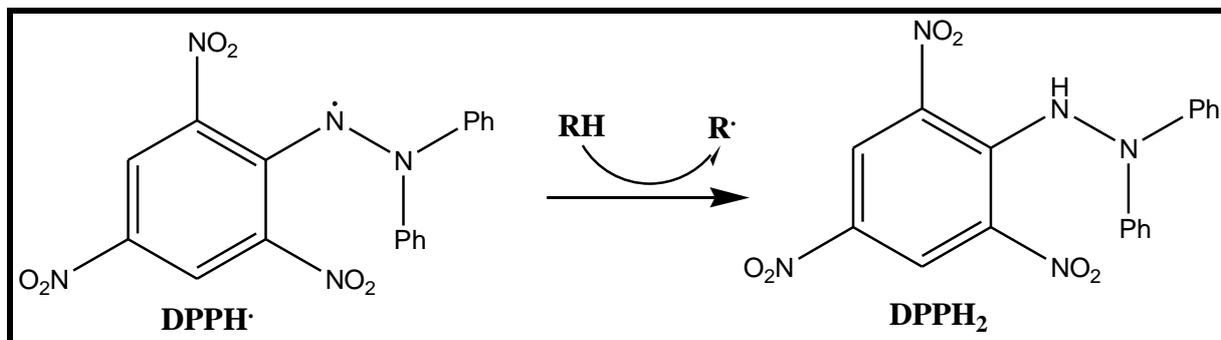
Tableau 9: Les méthodes les plus utilisées pour mesurer l'activité antioxydante :

Méthode	Réaction
Méthode FRAP (Ferric Reducing Power)	Réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) évalue le pouvoir réducteur des composés, la lecture se fait à 700 nm [45,46].
Méthode DPPH	Réduction du radical libre stable de 2,2-diphénylpicrylhydrazyle (DPPH), la lecture se fait à 515-518 nm selon le solvant utilisé [47,48].
Méthode ABTS	Le sel ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2-azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) perd un électron pour former un radical cation (ABTS^+) de couleur sombre en solution. En présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner ABTS^+ , ce qui entraîne la décoloration de la solution. La lecture se fait à 734 nm [46].
Méthode PPM (PhosphoMolybdate)	L'hydrogène et l'électron sont transférés vers le complexe oxydant (PPM) [47].

5. Evaluation du pouvoir anti-radicalaire par la méthode de DPPH :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier l'activité antioxydante des composés.

La réduction du radical DPPH par un antioxydant (**Schema20**) peut être suivie par spectrophotométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie [49].

**Schéma 20:** Structure du radical DPPH et son produit de réduction DPPH₂

6. Evaluation de l'activité antioxydante de la 3-acétylcoumarine et ses dérivés**(3a-g):**

Dans notre étude nous avons utilisé la méthode de piégeage du radical libre DPPH[•]; cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH[•]:

En présence des composés anti-radicalaires, le radical DPPH[•] est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•], qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon [49].

L'évaluation de l'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition, calculée selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} * 100$$

Avec :

A₀ : Absorbance à 517nm de la solution de DPPH[•] en absence de composé.

A₁ : Absorbance à 517nm de la solution de DPPH[•] en présence de composé.

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur d'IC₅₀, sachant que la IC₅₀ est la concentration nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH[•].

7. Résultats et discussion :

Les résultats obtenus par cette étude sont représentés dans la figure 15.

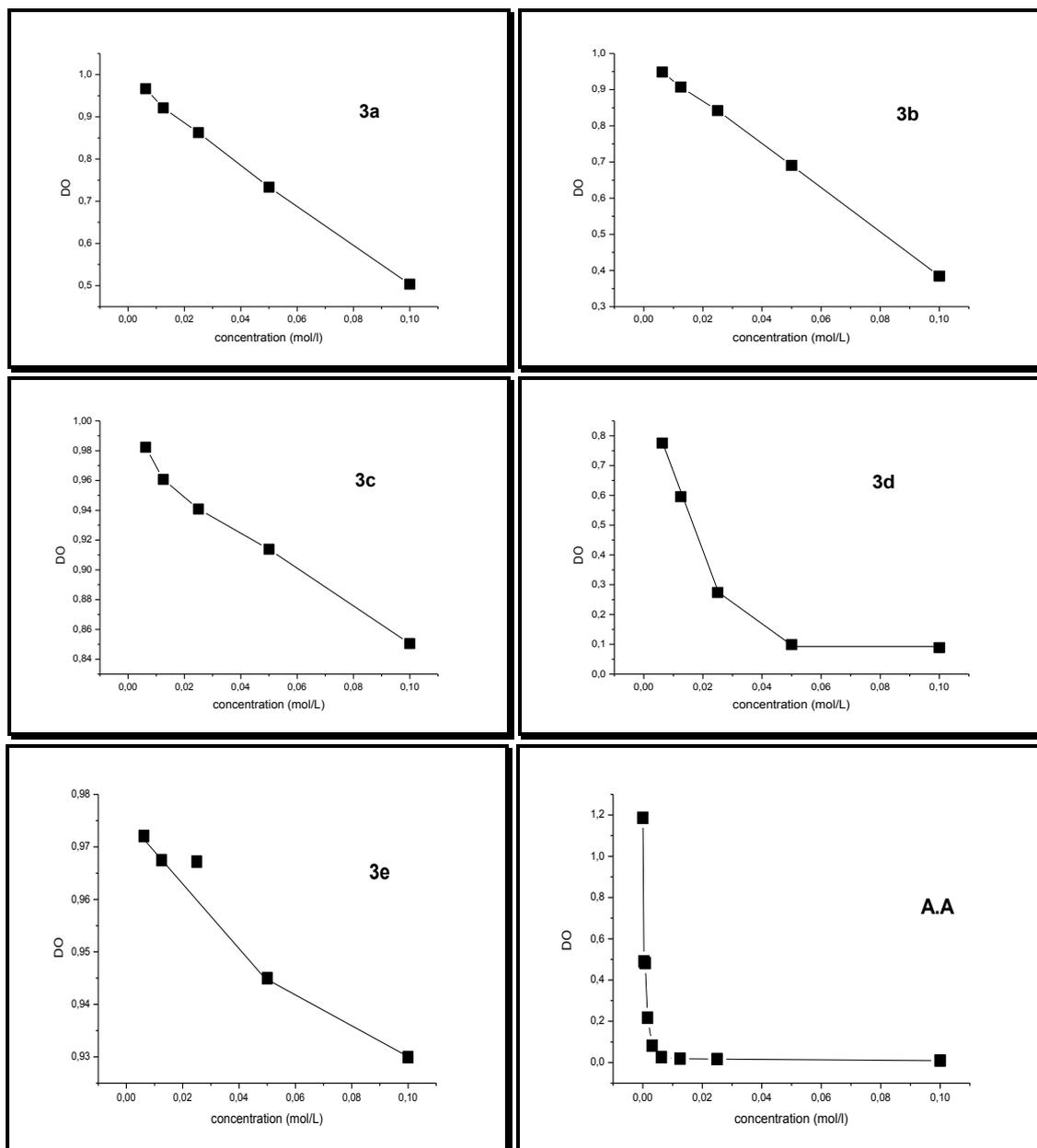


Figure 15 : Densité optique des composés (**3a-e**) et l'acide ascorbique en fonction de la concentration.

La figure 15 a montré que les produits **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e** présentent une activité antioxydante envers le radical DPPH avec des densités optiques différentes. Les pourcentages d'inhibitions du radical DPPH des différents composés ont été calculés par la relation du pourcentage d'inhibition (**Tableau 10**).

Tableau10: Pourcentage d'inhibition de différentes dilutions des composés (**3a-e** et **AA**) :

Pourcentage d'inhibition (%)						
Produit	3a	3b	3c	3d	3e	AA
[C](mol/l)						
C₀=0.1	47.97	60.23	12.06	90.84	2.28	99
C₁=0.05	24.17	28.87	5.51	89.77	1.96	98.87
C₂=0.025	10.81	12.92	2.71	71.68	0.01	98.6
C₃=0.0125	4.78	6.18	0.66	38.45	0	98.4
C₄=0.00625	0.08	1.91	0	19.81	0	97

8. Détermination d'IC₅₀ des composés (3a-e):

Les pourcentages du DPPH[•] résiduels en fonction des concentrations des échantillons, nous permettent d'obtenir la quantité antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration de DPPH[•] initiale à 50%. Cette valeur est appelée la concentration efficace EC₅₀ et parfois notée IC₅₀ (concentration inhibitrice minimale). Plus cette valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est importante. La concentration inhibitrice minimale (IC₅₀) est estimée par extrapolation à 50% d'inhibition en traçant la droite % inhibition en fonction de la concentration (**Figure 16**).

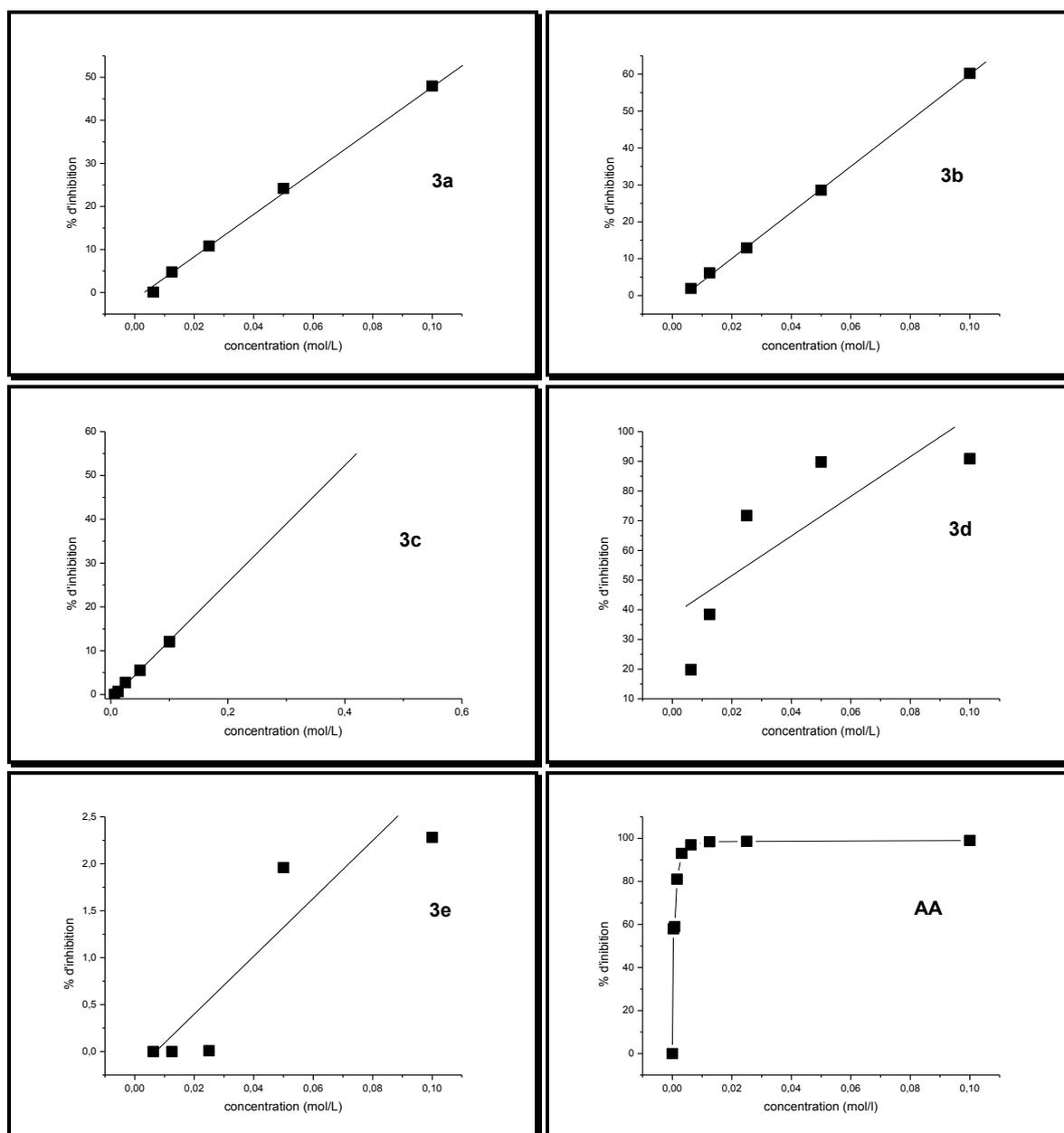


Figure 16: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH' des produits (**3a-e**) et de l'**AA** en fonction de la concentration.

Après avoir tracé le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration, nous avons calculés l'IC₅₀ par extrapolation à 50% d'inhibition en traçant la droite % inhibition en fonction de la concentration, les résultats obtenus sont représentés dans la figure 17 pour les produits **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e** et **AA**.

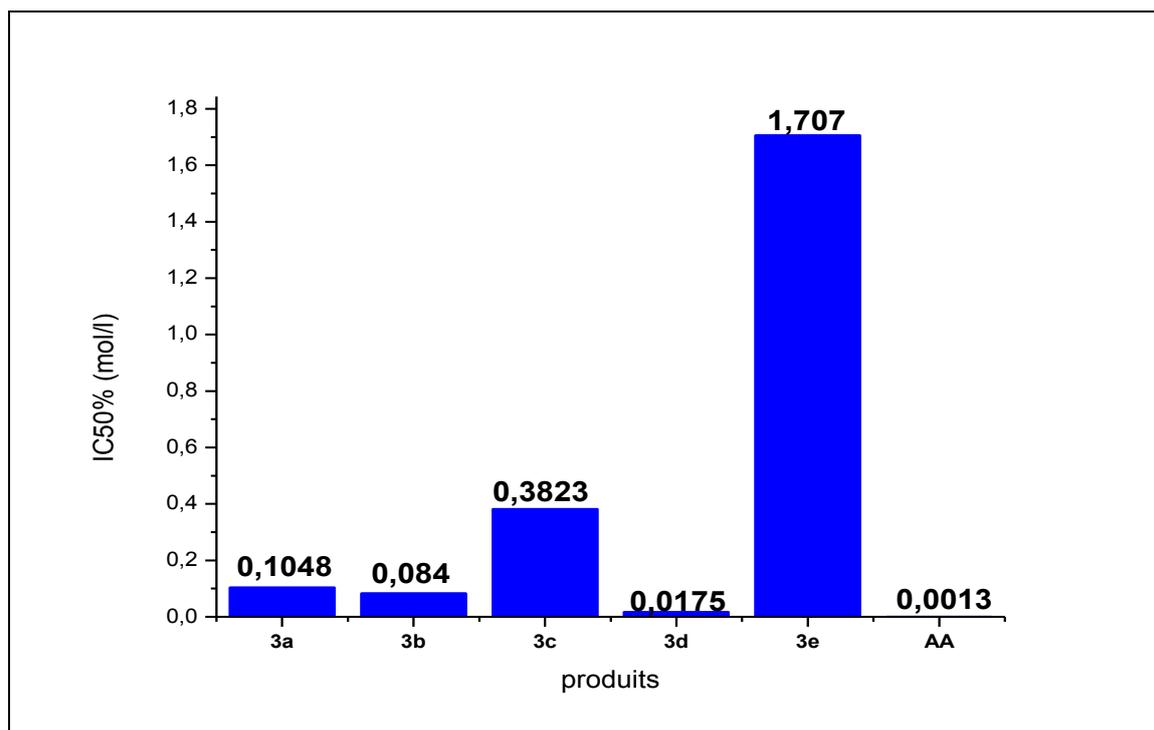


Figure 17: Les valeurs d'IC50% des composés (**3a-e**) et de l'acide ascorbique.

De là, nous pourrions conclure que tous les composés **3a**, **3b**, **3c**, **3d** et **3e** possèdent une activité antioxydante, cependant le produit 4-hydroxyl acétylcoumarine **3d** s'avère le plus actif de cette série. Ceci pourrait avoir un lien avec la position du groupement hydroxyle (position ortho). Il présente le pourcentage d'inhibition le plus important avec une valeur de 72 % mais qui reste très inférieure à l'activité de la référence utilisée (l'acide ascorbique).

II. Activité antibactérienne :

Certaines espèces microbiennes pathogènes, sont de moins au moins sensibles aux antibiotiques et développent des résistances multiples à ces derniers. D'où la nécessité d'orienter les recherches vers la synthèse des nouvelles molécules actives pouvant faire l'objet d'inhibition de développement des microorganismes [50]. D'après les études qui ont été faite sur l'activité antibactérienne des coumarines ; ces dernières sont efficaces contre les bactéries à Gram positif [51, 52, 53].

Dans ce chapitre nous allons utiliser la méthode de diffusion par disque en milieu solide pour évaluer l'activité antibactérienne des substances synthétisées et nous allons utiliser les bactéries à gram positif et négatif pour confirmer cette hypothèse.

1. Les souches bactériennes :

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria. Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1 μ m. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration [54].

2. Les antibiotiques :

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appel à des substances dites : antibiotiques. Ces derniers sont synthétisés par des microorganismes (le plus souvent des champignons). Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) [55].

La sensibilité d'une bactérie varie selon la nature de l'antibactérien [54].

3. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion des disques en milieu solide:

L'activité biologique se manifeste par l'apparition d'une zone d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque contenant le produit. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé [56].

Les produits qui semblaient être actifs, font l'objet d'une évaluation de leurs activités par la méthode de dilutions en milieu solide pour l'étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI) [50].

4. Lecture des antibiogrammes :

La lecture des antibiogrammes se fait par la mesure des diamètres d'inhibitions autour des disques. La sensibilité aux différents produits est classée selon le diamètre des zones d'inhibitions comme suit [56] :

- non sensible (-) pour le diamètre moins de 8 mm ;
- sensible (+) pour un diamètre entre 9 à 14 mm ;
- très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15 à 19 mm ;
- extrêmement sensible (+++) pour le diamètre supérieure à 20 mm.

5. Résultats et discussions :

5.1. Des diamètres d'inhibition de l'acétylcomarine et ses dérivés (3a-g) :

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Diamètre de zone d'inhibition (en mm) des produits **3a-g** ainsi que l'antibiotique utilisé (cefotaxime):

Molécules testées	Zone d'inhibition (mm)		
	<i>E. coli</i> ATCC25922 Gram -	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27858 Gram -	<i>S. aureus</i> ATCC25923 Gram +
3 a	5	5	7
3 b	5	5	10
3 c	5	5	12
3 d	5	5	13
3 e	5	5	34
3 f	5	5	8
3g	5	5	8
DMSO	5	5	5
ATB	30	32	37

D'après les résultats obtenus, les souches bactériennes se comportent différemment vis-à-vis des produits testés. En effet, les bactéries à gram négatif *Escherichia Coli* et *Pseudomonas Aeruginosase* se sont révélées résistantes et plus complexes que celle de *staphylocoques* (bactérie à Gram positif), qui ne possèdent pas de membrane externe. C'est en particulier cette dernière qui confère aux bactéries à Gram négatif leur relative imperméabilité par rapport aux bactéries à Gram positif.

La souche *Staphylococcus aureus* est sensible vis-à-vis des produits **3b**, **3c**, **3d** et **3e** qui inhibent de façon considérable la croissance de la bactérie avec des diamètres d'inhibition de 10 ,12 ,13 et 34 mm respectivement (**figure 18**).

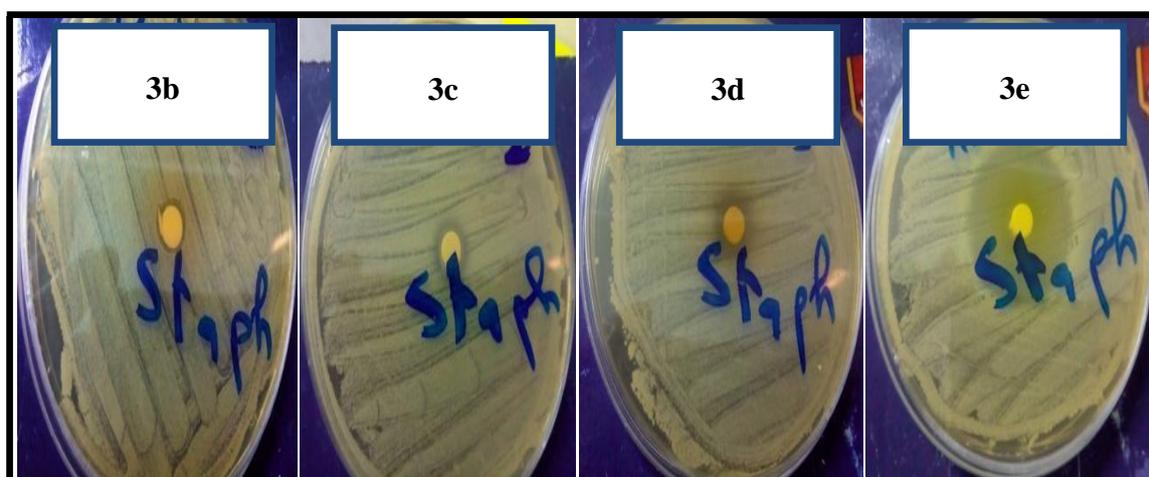


Figure 18 : Effet des composés (**3b-e**) sur la souche bactérienne *S.aureus*

L'activité des composés **3b**, **3c** et **3d** est due probablement à la présence du groupement hydroxyle (OH) substitué sur le noyau benzénique de la coumarine qui peut être source des radicaux libres stables qui rentre dans le cycle redox en présence de l'oxygène de l'air, peut provoquer la déstabilisation des lysosomes et la diminution du potentiel membranaire mitochondrial [57].

Le composé **3e** présente l'activité antibactérienne la plus forte, cela est dû à la présence du groupement électroattracteur (NO₂) par effet mésomère lié au noyau benzénique de l'acétylcoumarine.

Nous avons également constaté que les composés **3a**, **3f** et **3g** n'ont montré aucune sensibilité vis-à-vis des souches bactériennes cela est peut être due au fait que la diffusion dans la gélose est nettement lente, ou à cause de la faible solubilité, ou à la résistance de ces souches bactériennes.

Aucune zone d'inhibition n'a été observée pour le solvant DMSO.

5.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des composés **3b**, **3c**, **3d** et **3e** :

Pour déterminer la CMI des molécules testés **3b**, **3c**, **3d**, **3e** pour la souche bactérienne (*staphylococcus aureus*) qui semblaient être actifs, nous avons procédé à des dilutions en milieu solide à partir de la concentration initiale (10^{-1} mol/l) jusqu'à la concentration minimale d'inhibition. Les résultats visibles à l'œil nu obtenus sont donnés dans le tableau 12

Tableau 12: CMI des composés **3b**, **3c**, **3d** et **3e** dans *S. aureus*

Composé	CMI (mol/l)
3b	$C_4=6.25\times 10^{-3}$
3c	$C_1=5\times 10^{-2}$
3d	$C_3=1.25\times 10^{-2}$
3e	$C_5= 3.125\times 10^{-3}$

D'après les résultats obtenues dans le tableau 12 nous avons constaté, que le composé **3e** présente la activité la plus forte, suivie par les deux composés **3b** et **3d** successivement et en dernière position vient le composé **3c** avec l'activité antibactérienne la moins forte.

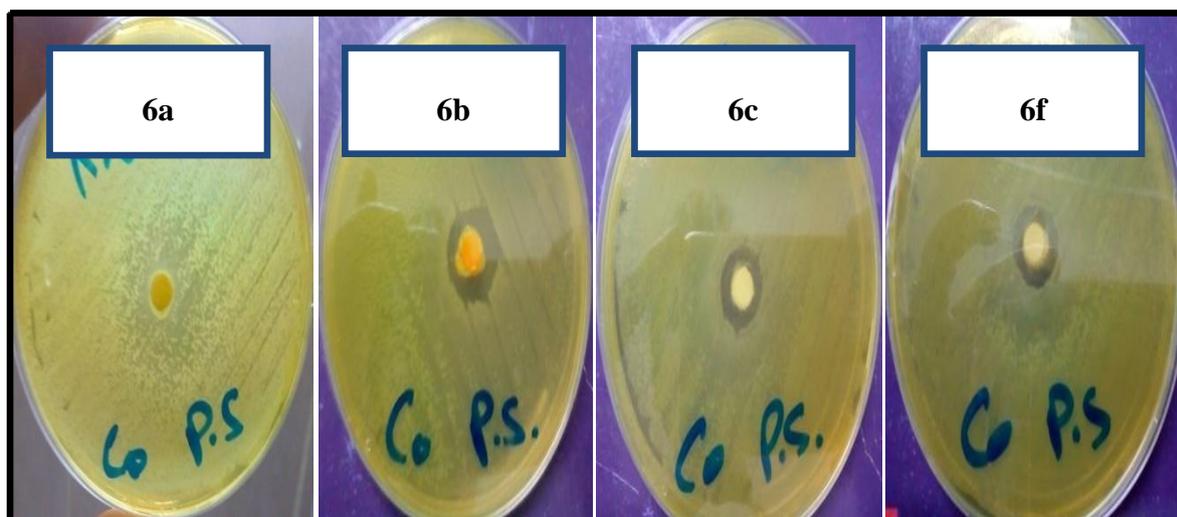
5.3. Des diamètres d'inhibition des molécules hybrides synthétisés (**6a-f**):

Les tests antimicrobiens sont réalisés aussi sur les molécules hybrides 3-acétylcoumarin-3,4-dihydropyrimidinones/thiones (**6a-f**). Les zones d'inhibitions enregistrées sont données dans le tableau 13.

Tableau13: Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des molécules hybrides **6a-f**

Molécules testées	Zone d'inhibition (mm)		
	<i>E. coli</i> ATCC25922 Gram -	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27858 Gram -	<i>S. aureus</i> ATCC25923 Gram +
6 a	6	20	8
6 b	5	18	6
6 c	5	14	7
6 d	7	8	6
6 e	6	7	6
6 f	8	15	6
DMF	6	7	6
ATB	30	32	37

La souche *P. aeruginosa* est sensible vis-à-vis des produits **6a**, **6b**, **6c** et **6f** qui inhibent de façon considérable la croissance de la bactérie avec des diamètres d'inhibition de 20, 18, 14 et 15 mm respectivement (**figure19**).

**Figure 19:** Effet des produits **6a**, **6b**, **6c** et **6f** sur la souche bactérienne *P.aeruginosa*

Les composés **6d** et **6e** n'ont montré aucune activité vis-à-vis des souches bactériennes cela est peut être due au fait que la diffusion dans la gélose est nettement lente, ou à cause de la faible solubilité, ou à la résistance de ces souches bactériennes à ces produits.

Une zone d'inhibition très faible a été observée pour le solvant DMF.

5.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des composés **6a**, **6b**, **6c** et **6f** :

Pour déterminer la CMI des molécules testés **6a**, **6b**, **6c** et **6f** pour la souche bactérienne (*P. aeruginosa*) qui semblaient être actifs, nous avons procédé à des dilutions à partir de la concentration initiale (3.3×10^{-2} mol/l) jusqu'à la concentration minimale d'inhibition. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 14

Tableau 14: CMI des composés **6a**, **6b**, **6c** et **6f** dans *P. aeruginosa*

Composé	CMI (mol/l)
6a	$C_3 = 4.125 \times 10^{-3}$
6b	$C_2 = 8.25 \times 10^{-3}$
6c	$C_1 = 1.65 \times 10^{-2}$
6f	$C_1 = 1.65 \times 10^{-2}$

D'après les résultats obtenues dans le tableau 14 nous avons constaté, que le composé **6a** présente l'activité la plus intéressante, suivi par le composé **6b**, par contre les composés **6c** et **6f** ont une activité antibactérienne la moins forte.

Conclusion :

Dans le cadre de ce travail, nous avons évalué l'activité biologique des composés 3-acétylcoumarines synthétisés par l'étude de l'activité antibactérienne et antioxydante. Nous avons également évalué l'activité antibactérienne des dérivés dihydropirimidinones/ thiones.

L'activité antioxydante du composé 3-acétylcoumarine et ses dérivés synthétisés a été réalisé par la méthode de piégeage de radicale DPPH. Les résultats obtenus ont montré que la réduction de DPPH est enregistré pour les composés **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e** avec des IC 50% différentes, dont le composé **3d** présente la concentration inhibitrice minimal la plus basse, mais qui restent faibles par rapport à la référence utilisée.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur trois souches bactériennes. Selon la méthode de diffusion des disques, seuls les composés **3b**, **3c**, **3d** et **3e** possèdent une activité antibactérienne contre la souche à Gram positif contrairement aux souches à gram négatif qui manifeste une résistance pour tous les produits testés. Par contre les molécules hybrides synthétisées **6a**, **6b**, **6c** et **6f** possèdent une activité antibactérienne contre la souche à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*) et aucune activité vis-à-vis de *Escherichia coli* et celle *Staphylococcus aureus*. Les produits qui semblaient être actifs ont fait l'objet de la détermination de la CMI.

1. Activité antioxydant :

Les produits de l'acétylcoumarine et ses dérivés synthétisés sont préparés à des concentrations de 10^{-1} mole/L dans le DMSO puis dilués à un demi pour avoir des concentrations de 5×10^{-2} M ; $2,5 \times 10^{-2}$ M ; $1,25 \times 10^{-2}$ M et $6,25 \times 10^{-3}$ M. Quant à la solution de DPPH, elle est préparée en solubilisant 4 mg de DPPH dans 100mL d'éthanol.

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

L'absorbance du DPPH• est déterminée par spectrophotométrie Visible à 517nm. Les résultats obtenus pour chaque produit testé sont comparés à ceux obtenus pour l'acide ascorbique pris comme contrôle positif.

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

2. Activité antibactérienne :

2.1. Choix et origines des souches microbiennes testées

Le choix des bactéries a été porté sur trois souches fréquentes en pathologie humaine. Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus*.

Bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* [51].

2.2.1. *Escherichia coli* ATCC 25922 (bacille à Gram négatif) :

Commensal du tube digestif, est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales [51].

2.2.2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853:

Ce sont des bacilles Gram négatif, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques. *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales [4].

2.2.3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Cocci à Gram positif) :

Nommée aussi staphylocoque doré, tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales [51]. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aigue, intoxication alimentaire [4].

Les souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* sont des souches hospitalières isolées de patients hospitalisés à l'établissement public hospitalier d'AIN EL HAMMAM (EPH) et *Staphylococcus aureus* est une souche hospitalière isolée des patients hospitalisés au Centre Hospitalier Universitaire de TIZI OUZOU (CHU). Les tests antibactériens ont été établis à l'hôpital d'AIN EL HAMMAM (EPH).

2.2. Tests antimicrobiens

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des produits synthétisés, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme), celle-ci permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations des produits synthétisés.

2.3. Les milieux de culture :

Selon la méthode utilisée et selon les souches, nous avons utilisé les milieux suivants:

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents produits synthétisés [53].

2.4. Réalisation de l'antibiogramme :

2.4.1. Milieu pour antibiogramme :

Le milieu adéquat doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm.

Les géloses doivent être séchées avant l'emploi de 18h à 24h.

2.4.2. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 18h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacun des souches bactériennes à tester. Des suspensions bactériennes ont été préparées dans 5 ml d'eau physiologique.

2.4.3. Ensemencement et dépôt des disques

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

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

Les échantillons à tester ont été dissout dans le DMSO pour les composés **3a-g** et les autre produits **6a-f** dans le DMF à des concentrations respectifs de 10^{-1} et 3.3×10^{-2} mol/l.

- Le témoin négatif : représente les solvants utilisés pour la préparation des échantillons le DMSO et DMF.
- Le témoin positif : représente l'antibiotique utilisé, il est choisi selon la nature de la souche bactérienne, nous avons opté pour l'antibiotiques Cefoxitaxine 30 µg de la marque HIMIDIA qui un antibiotique commun entre les trois souches utilisés.

Les disques en papier Wattman ont été stérilisés à l'autoclave pendant 15min à 180°C.

2.4.4. Incubation

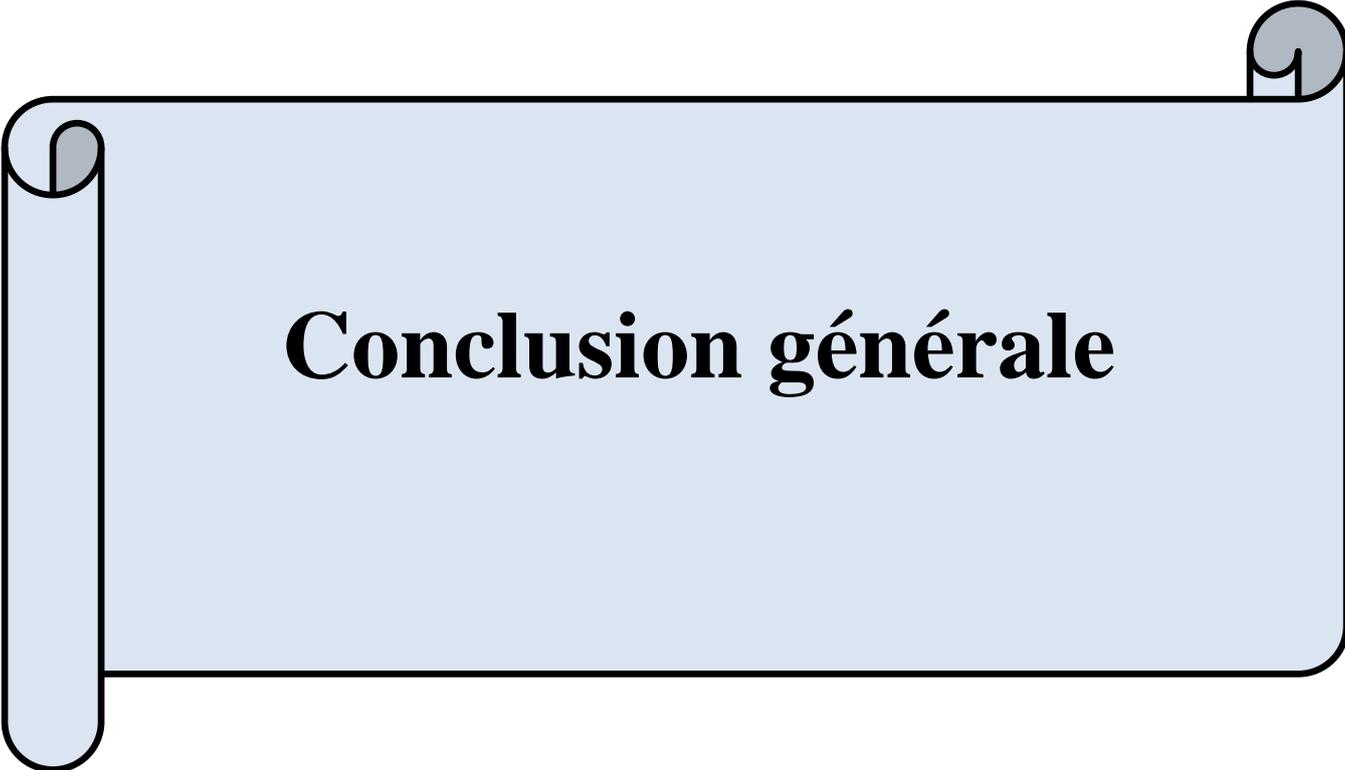
Les boites de pétri sont ensuite fermées et mise à l'étuve à 37°C pendant 24h.

2.4.5. Lecture des antibiogrammes :

La lecture des antibiogrammes se fait par la mesure des diamètres d'inhibitions autour des disques. La sensibilité aux différents produits est classée selon le diamètre des zones d'inhibitions [54].

2.5.Détermination des concentrations minimales inhibitrices :

La CMI est la plus petite concentration nécessaire pour inhiber la croissance d'une bactérie visible à œil nu. Pour déterminer la CMI d'une molécule, on teste des concentrations décroissantes d'antibiotique vis à vis d'un germe [4].



Conclusion générale

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

La réaction de condensation de Knoevenagel est une réaction importante en synthèse organique elle permet d'offrir une classe de produits possédant des activités biologiques très intéressantes. Dans un premier temps, Nous avons pu réaliser la synthèse d'une série de dérivés de 3-acétylcoumarine **3a-g** par condensation des dérivés du salicylaldéhyde avec l'acétoacétate d'éthyle en présence de la pipéridine comme catalyseur, notant que les conditions réactionnelles appliquées sont relativement simples et économiques et les rendements sont globalement importants.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de la réaction multicomposants de Biginelli et cela par la condensation de 3-acétylcoumarine synthétisé **3a**, des dérivés du benzaldéhyde et l'urée/thio-urée en présence d'acétate d'ammonium comme catalyseur et l'acide acétique comme solvant, dans le but d'avoir des dihydropyrimidinones/thiones biologiquement actifs **6a-f**.

La caractérisation des composés synthétisés en utilisant la combinaison de plusieurs méthodes (Pf, CCM, UV-Visible et IR), a permis de révéler les structures de ces composés d'une part et de compléter notre formation dans le domaine d'une autre part.

L'évaluation de l'activité biologique des composés a été faite par l'étude de l'activité antioxydante pour les composés **3a-g** en utilisant la méthode du piégeage du radical DPPH. Les résultats ont montrés que le composé **3d** s'avère le plus actif avec une IC 50% de 0.0175 mol/l mais qui reste faible par rapport à la référence utilisée.

L'étude antibactérienne des composés synthétisés **3a-g** a montré une bonne activité antibactérienne pour les composés **3b**, **3c**, **3d** et **3e** contre la bactérie à Gram positif utilisée (*Staphylococcus aureus*) et aucune activité vis-à-vis des souches à gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*). Pour les composés **6a**, **6b**, **6c** et **6f** synthétisés, ils possèdent une activité antibactérienne contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* et aucune activité vis-à-vis d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*. Les produits qui semblaient être actifs ont fait l'objet de la détermination de la CMI. Les composés **3a**, **3f**, **3g**, **6d** et **6e** ne présentent aucune activité contre les trois souches. La fusion de la DHPM avec la 3-acétylcoumarin a conféré aux molécules hybrides une activité antibactérienne inexistante dans la molécule de départ.

Ce travail fera donc l'objet d'une publication internationale après avoir réalisé et complété tous les analyses spectroscopiques nécessaires.

Perspectives

L'ensemble des résultats exposé sont encourageant et très prometteurs et les perspectives qui en découlent sont nombreuses, parmi elles :

- Compléter la caractérisation avec d'autres techniques d'analyse afin de confirmer notre étude comme (RMN 1H, RMN 13C, spectroscopie de masse et analyse élémentaire)
- Effectuer la synthèse de coumarin-3,4- dihydropyrimidin-2(*H*)- ones/thiones dans des conditions opératoires différentes (ex sous Micro-Onde) afin d'améliorer les rendements.
- Evaluer l'activité antioxydante des molécules hybrides.

Références bibliographiques

- [1] Moussouni K., Dehbi L. Contribution a l'étude de la réactivité de l'acide triacétique lactone (tal) et de la 3-acétoacétyl coumarine. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou. Faculté Des Sciences. Département De Chimie, 2015.
- [2] Al-Ayed A S., Naceur H. A new and efficient method for the synthesis of novel 3-acetyl coumarins oxadiazoles derivatives with expected biological activity. *Molecules*, 19, 911-924, 2014.
- [3] Prasanna B., Praveen Kumar K., Rakesh N., Prashanthi Y. An efficient one pot three component synthesis of 4-aryl-6-(3-coumarinyl) pyrimidin-2 (1h)-ones Under solvent free conditions. *Int J Chem Sci*, 10(4), 1905-1912, 2012.
- [4] Benazzouz-Touami A. Synthèse de nouvelles séries hétérocycliques d'intérêts thérapeutiques, valorisation en UV-Visible et fluorescence. Thèse de doctorat : Chimie des Matériaux et de l'Environnement. Chimie Pharmaceutique. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou, 2016.
- [5] Arnaud P., Jamart B., Bodiguel J., Brosse N. *Chim. Org, Cours*, 17^{ème} Ed, 2004.
- [6] Chikhaoui Ch., Madji S. Synthèse étude spectroscopique comportement électrochimique et activité biologique des complexes a ligands hétérocycliques. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou, Faculté Des Sciences, Département De Chimie. 2017.
- [7] Djemoui Dj. Contribution a l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de quelques coumarines synthétisées. Université Kasdimerbah Ouargla. Faculte Des Sciences Et De La Technologie Et Sciences De La Matière, 2012.
- [8] Khelil Amira. Synthèse par réaction de Biginelli d'hybrides de coumarines et du donepezil potentiellement actifs contre la maladie d'alzheimer. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou Faculte des Sciences Departement de Chimie, 2017.
- [9] Rezine F., Fedouche M S. Coumarines a intérêt thérapeutique : synthèse et contrôle analytique. Université Abou Bekr Belkaïd. Faculte De Médecine Dr Benzerdjeb B. Tlemcen, 2017.

Références bibliographiques

- [10] El-Agrody A.M., Abd El-Latif M.S., El-Hady N.A., Fakery A.H., Bedair A.H. *Molecules*, 6, 519- 527, 2001.
- [11] (A) Patonay T., Litkei G. Y., Bogнар R., Erdei J., Misztic C. *Pharmazie*, 39, 86-91,1984.
(B) Shaker R.M., *Pharmazie*, 51, 148-151, 1996.
- [12] El-Farargy A.F., *Egypt J. Pharm. Sci.* 32, 625-632, 1991.
- [13] Manolov I., Danchev N.D., *Eur. J. Med. Chem.* 30, 531- 536, 1995.
- [14] Emmanuel-Glota A.A., Fylaktakidou K.C., Hadjipavlou-Litina D.J., Litinas K.E., Nicolaides D.N. *Heterocycl J. Chem*, 38, 717-722, 2001.
- [15] Nofal Z.M., El-Zahar M., Abd El-Karim S. *Molecules*, 5, 99- 113, 2000.
- [16] Raviraj K., Manjunath G., Manohar K. Synthesis and biological activities of some substituted 4-(4-(1, 5-diphenyl-1h-pyrazol-3-yl) phenoxy)methyl) coumarins. *Indian J Chem*13, 201-204, 2004.
- [17] Derriche Kahina. Synthèse Sans Solvant Par Voie Conventiоnnelle Et Sous Irradiation Micro-Onde Des Coumarines En Utilisant Les Polyoxométallates De Type Keggin. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou faculté des sciences département de chimie, 2016.
- [18] Battach Abderrazak. Synthèse de quelques dérivés de la coumarine. Université Ziane Achour de Djelfa, Faculté des sciences Et La Technologie. Département Des Sciences De La Matière, 2015.
- [19] Nabeel A A A., Qassim A H J. Synthesis of some substituted pyrimidines derived from 3-acetyl comarin. *Asian journal of chemistry*, 27, 3687-3691, 2015.

Références bibliographiques

- [20] Vazquez-Rodriguez S., Serra S., Santos Y., Santana L. Efficient Synthesis of Coumarin-Chalcones Hybrids as New Scaffold with Antibacterial Interest. 14th International electronic conference on synthetic organic chemistry, 2010.
- [21] Saher L., Makhloufi-Chebli M., Dermeche L., Dermeche S., Boutemeur-Khedis B., Rabia Cherifa., Hamdi Maamar., M S Silva Artur. 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. Tetrahedron journal homepage: www.elsevier.com, 2018.
- [22] (A) Strecker A., Justus Liebigs Annalen. Der Chemie. 75, 27-45, 1850.
(B) Strecker A., Justus Liebigs Annalen. Der Chemie. 91, 349-351, 1854.
- [23] Hantzsch A. Chem. Ber. 14, 1637-1638, 1881.
- [24] (A) Biginelli P. Chem. Ber. 24, 2962-2967, 1891.
(B) Biginelli P. Chem. Ber. 24, 1317-1319, 1891.
- [25] Sandhu S., Bansal Y., Silakari O., Bansal G. Coumarin Hybrids as Novel Therapeutic Agents. Elsevier. 3806–3814, 2014.
- [26] Marie Gizolme. Réactions multicomposants et isonitriles. Chimie. Ecole Polytechnique X. <https://Pastel.Archives-Ouvertes.Fr/Pastel-00003258>, 2010.
- [27] Oble J. Nouvelles Réactions Multicomposant avec des Phénols et des Isonitriles. Thèse De Doctorat, Chimie organique, Ecole polytechnique, 2007.
- [28] Chouguiat L. Développement de nouvelles méthodes pour les réactions multicomposants de hantzsch et de biginelli: préparations des 3,4-dihydropyrimidinones et 1,4-dihydropyridines. Faculté des sciences exactes de l'université Mentouri de Constantine, Magistère, 2010.
- [29] Laurent HUET. Réactions radicalaires multicomposant appliquées à la synthèse de lactones et pipéridinones fonctionnalisées. Thèse. Université Bordeaux I. École doctorale des sciences chimiques. 4262, 2011.

Références bibliographiques

- [30] GHALEM W. Synthèse De Molécules d'intérêt Biologique: Préparation Des Dérivés De La 3,4-Dihydropyrimidinone Et De La 1,4-Dihydropyridine Par Des Réactions A Composants Multiples. Université Mentouri-Constantine. Faculté des sciences exactes. Thèse. Département de chimie.
- [31] Boulcina R. Développement de nouveaux catalyseurs pour les réactions de hantzsch et de biginelli et préparation des epoxyesters et epoxycétones quinoléiques. Faculté des sciences exactes de l'Université Mentouri-Constantine. Chimie Organique.
- [32] Galabov A. S., Velichkova E., Karparov A. *Arzneim-Forsch.* 34, 9-14, 1984.
- [33] Haggarty S. J., Mayer T. U., Miyamoto D. T., Fathi R., King R. W., Mitchison T. J., Schreiber S. L. *Chem. Biol.* 7, 275-286, 2000.
- [34] Hossan A. S., Abu-Melha, H. M.; Al-Omar, M. A. *Molecules.* 17, 13642-13655, 2012.
- [35] Aness P., Javed A S., Gazge M., Vijay M., Khursheed A. Novel 3-acetylcoumarin schiff's base synthesis from different acid hydrazide. *International Research Journal Of Pharmacy*, 4, 2230-8407, 2013.
- [36] Ngyen T C., Tran T D., Ngyen A T. Synthesis of 3- acetyl-6-iodo-coumarin and it's derivatives. Ho Chi Minh City University of Pedagogy.Viet Nam, 2013.
- [37] Reena V. and al., «Fluor chem. », 89, 153, 2013.
- [38] Le Cren F., *Les antioxydants, la révolution du XXIe siècle*, 2ème édition, 2004.
- [39] Boyd B. et al, Ford C. Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des Personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*, 4 (6), 7, 2003.
- [40] Jacques B., André R., *Biochimie métabolique* Ed ellipses, Paris, 217-225, 2004.
- [41] Martinez-Cayuella M., Oxygen free radicals and human disease, *Biochem*, 77, 147-161, 1995.

Références bibliographiques

- [42] Tiwari A. K., Antioxidants: New-generation therapeutic base for polygenic disorders, *Curr.Sci.*, 86 (8), 1092-1102, 2004.
- [43] Ammar R. and al., Antioxidant and freeradical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of rhamnus alaternus, 116, 258, 2009.
- [44] Benzie I. F. F., Strain, J. J., «The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power the frap assay», 239, 70, 1996.
- [45] Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. Antioxydant activity of dietary polyphenol as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.* 48, 3396-402, 2000.
- [46] Popovici C., Ilonka S., Bartek T Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel.* 4, 25-39, 2009.
- [47] Kebbab Ryma : Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété Chamlal : Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation. Thèse de magister UMMTO, 2014.
- [48] PORTES, E., Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes : propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse Doctorat, Université de BORDEAUX I, 2008.
- [49] Mohemmedi Z., «mémoire de magister université aboubakr belkaid, Tlemcen», 2006.
- [50] IMMOUNE L., ZEBICHE N. Synthèse et activités biologiques de quelques molécules hétérocycliques. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou Faculté Des Sciences Département De Chimie. 2016.

Références bibliographiques

- [51] Khan I., Kulkari M.V., Gopal M. Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15, 3584-3587, 2005.
- [52] Cottiglia F., Loy G.,Garan D., Floris C., Casu M., Pompei R., Bonsignore L. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*, 8(4), 302-305, 2001.
- [53] Laure F. Etude de la composition chimique et de la biodiversité du *Calophyllum urophyllum* de Polynésie française. Thèse de Doctorat, Nice, 373, 2005.
- [54] Nauciel. C., Vildé J.L. *Bactériologie médicale*. Paris. Masson, 2èmeEd ,5-10, 2005.
- [55] Boudjouref M. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisiacampestris* L. Université Ferhat Abbes, Sétif. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biochimie, 2011.
- [56] Choi Y.M et al, Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*, 39, 756-761, 2006.
- [57] Benabdallah M. Préparation et étude de la réactivité de quelques dérivés de Naphtoquinones en vue de leurs applications biologiques potentielles. Thèse de Doctorat, Université de Telemcen, 2012.

Annexes

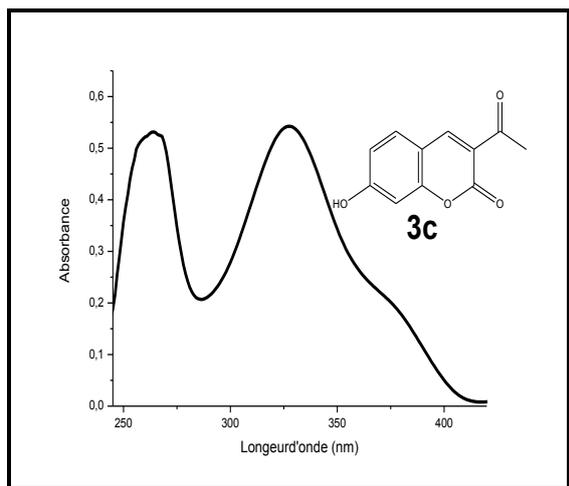


Figure 20 : Spectre UV-vis du composé **3c**

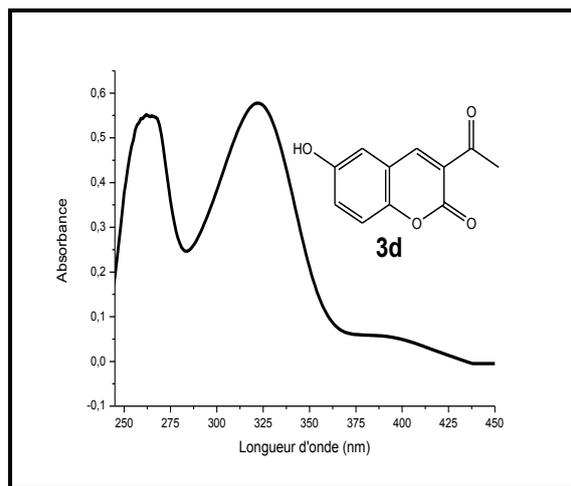


Figure 21 : Spectre UV-vis du composé **3d**

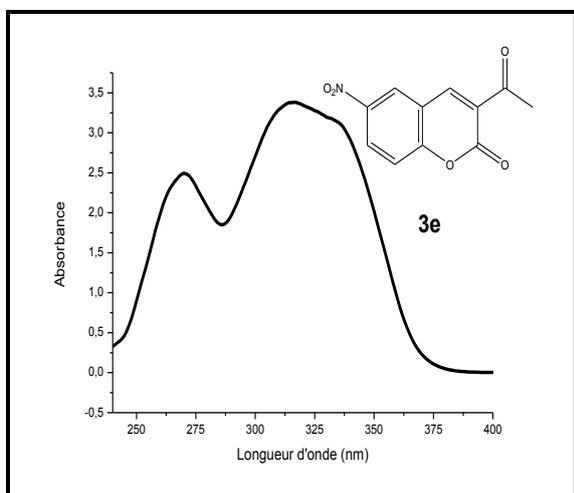


Figure 22 : Spectre UV-vis du composé **3e**

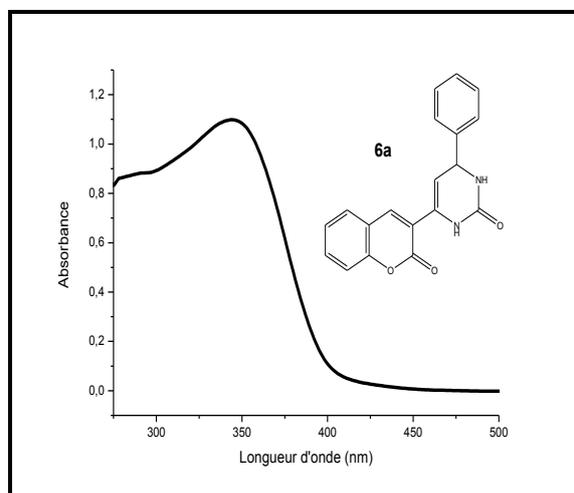


Figure 23 : Spectre UV-vis du composé **6a**

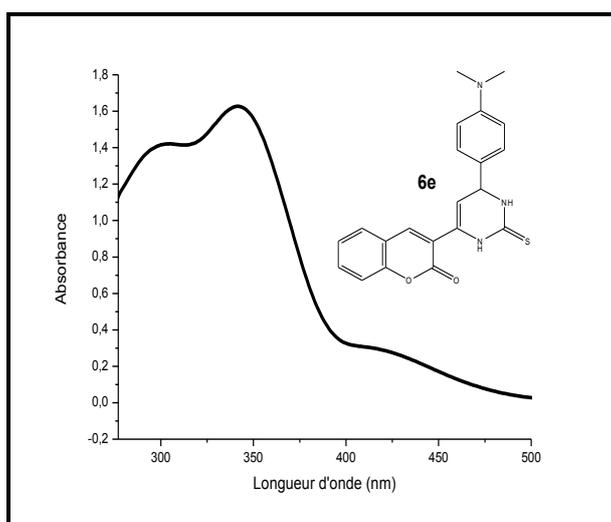


Figure 24 : Spectre UV-vis du composé **6e**

Annexes

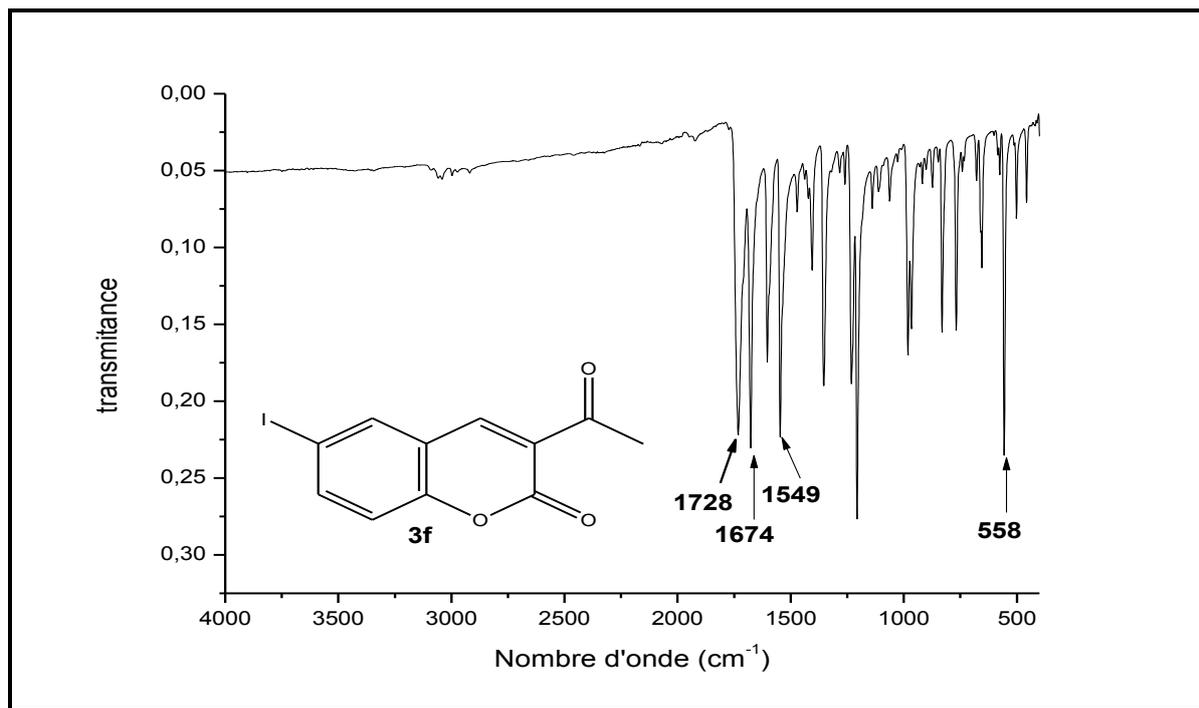


Figure 25 : Spectre IR du composé **3f**

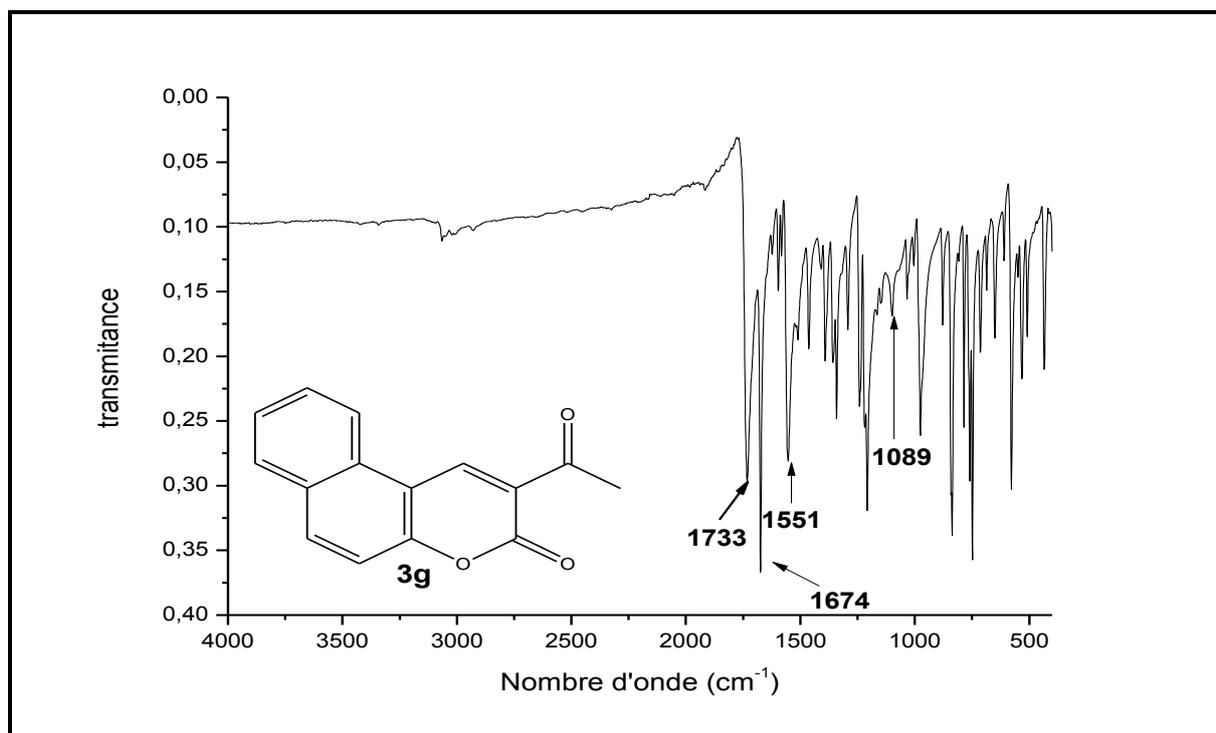


Figure 26 : Spectre IR du composé **3g**

Annexes

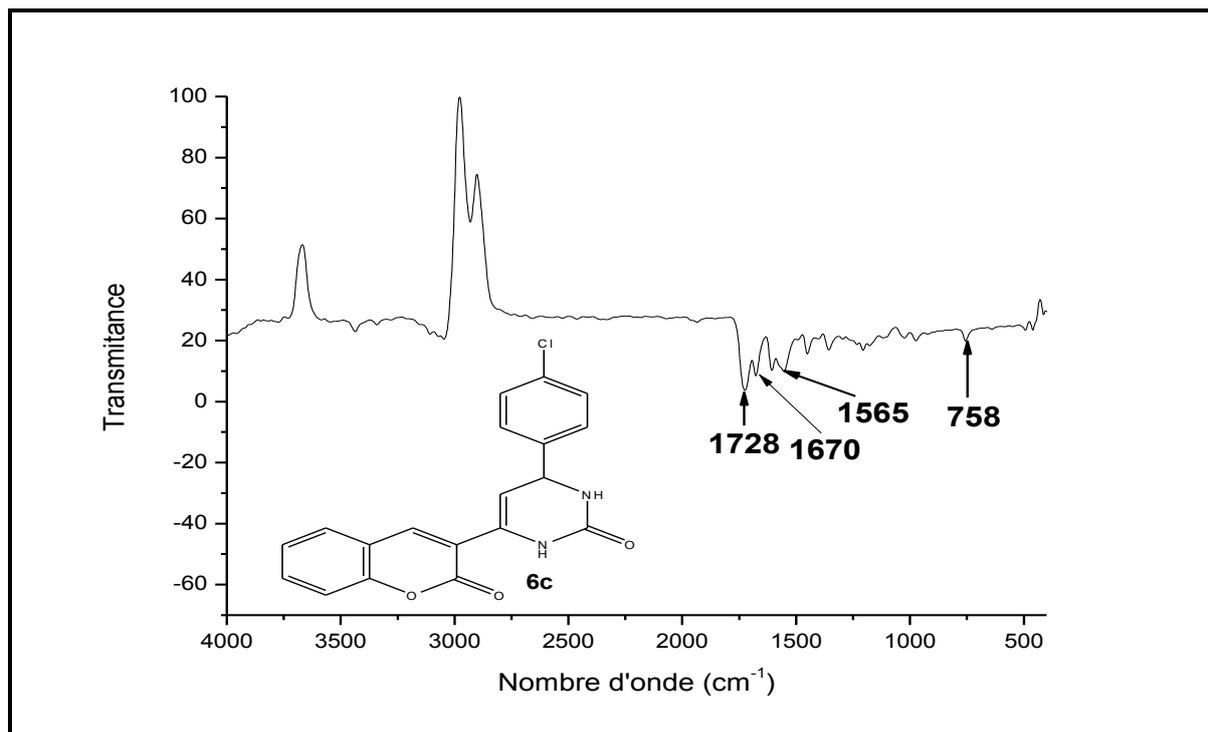


Figure 27 : Spectre IR du composé 6c

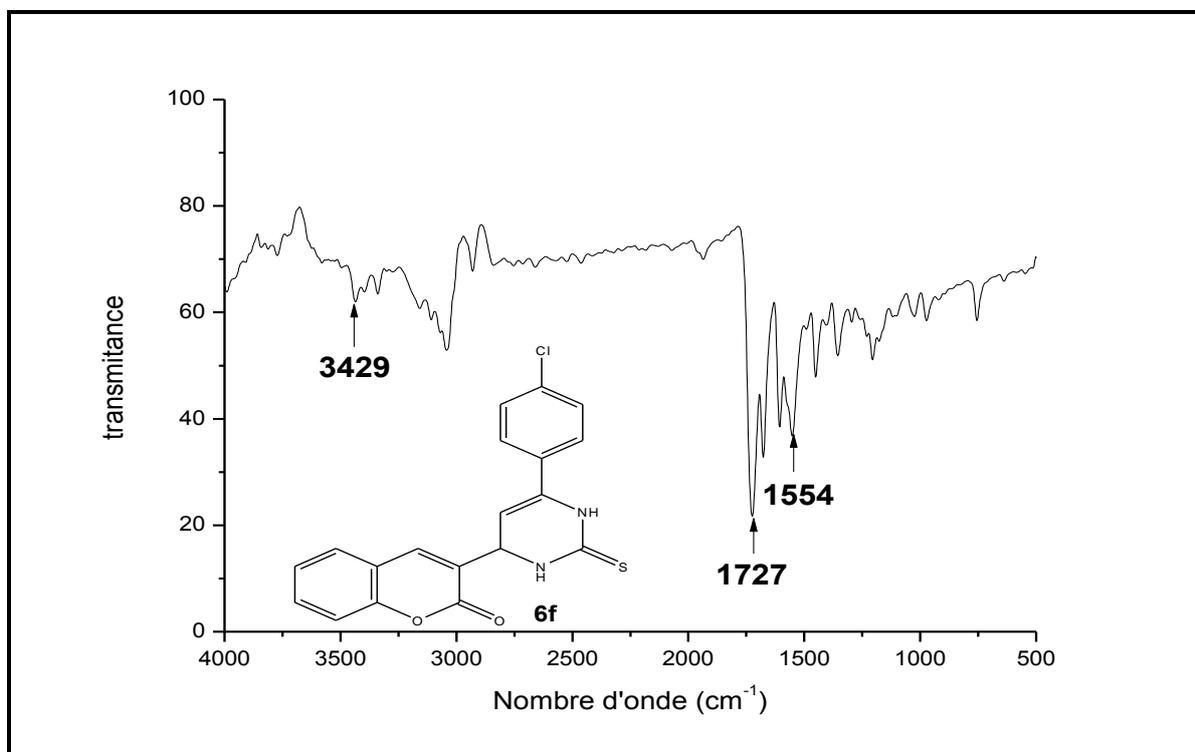
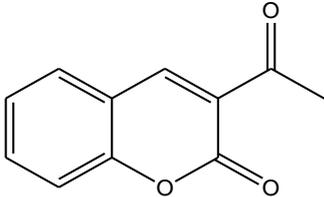
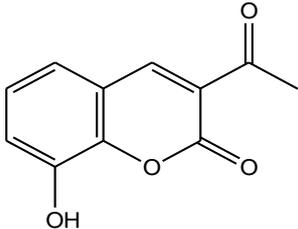
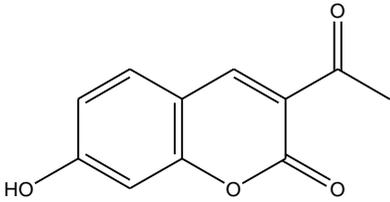
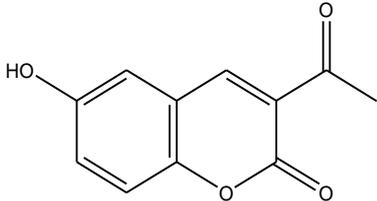
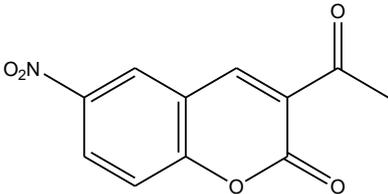
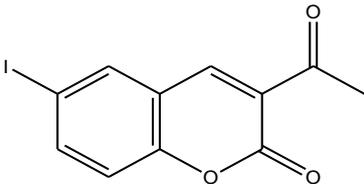


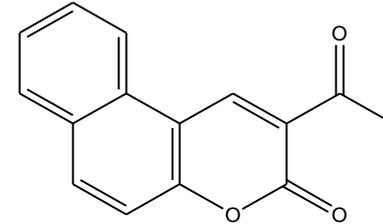
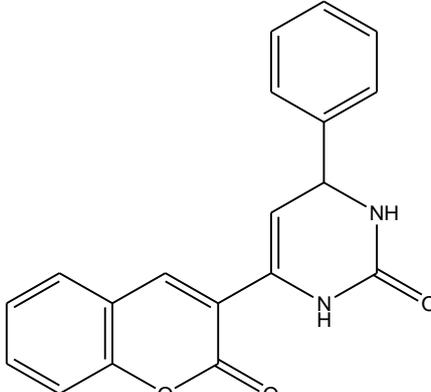
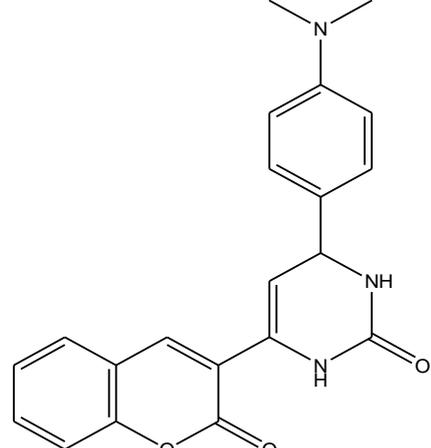
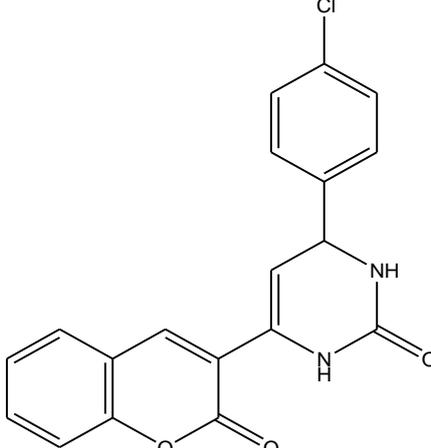
Figure 26 : Spectre IR du composé 6f

Annexes

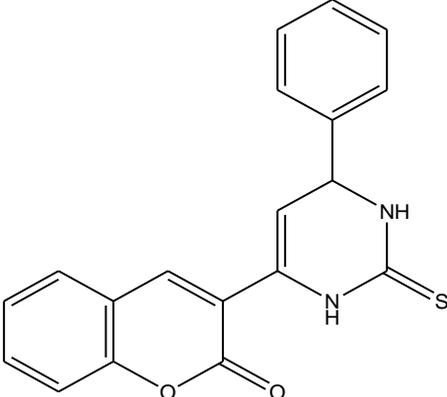
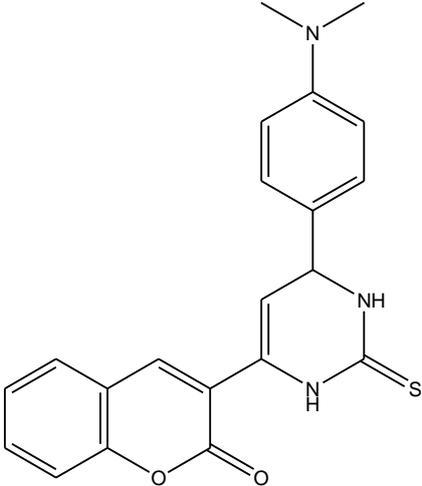
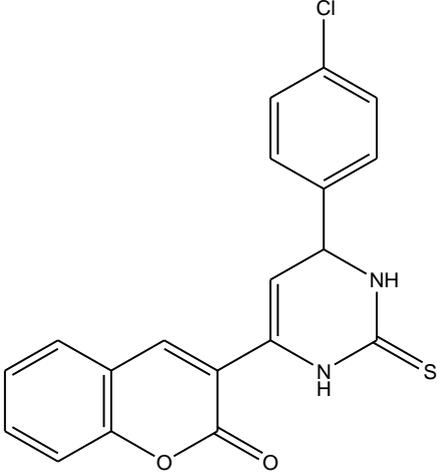
Récapitulatif des molécules synthétisées par l'utilisation de Chem Draw Ultra 8.0 :

Notation	Formule	Nom chimique	Masse molaire (g/mol)
3a		3-acétyl-2 <i>H</i> -chromen-2-one	188
3b		3-acétyl-8-hydroxy-2 <i>H</i> -chromen-2-one	204
3c		3-acétyl-7-hydroxy-2 <i>H</i> -chromen-2-one	204
3d		3-acétyl-6-hydroxy-2 <i>H</i> -chromen-2-one	204
3e		3-acétyl-6-nitro-2 <i>H</i> -chromen-2-one	233
3f		3-acétyl-6-iodo-2 <i>H</i> -chromen-2-one	313

Annexes

3g		3-acétyl-3 <i>H</i> - benzo[<i>f</i>]chromen-2-one	238
6a		6-(2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-3-yl)- 4-phenyl-3,4- dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)- one	317
6b		4-(4-(dimethylamino) phenyl)-6-(2-oxo-2 <i>H</i> - chromen-3-yl)-3,4- dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)- one	360
6c		4-(4-chlorophenyl)-6-(2- oxo-2 <i>H</i> -chromen-3-yl)-3,4- dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)- one	351.5

Annexes

6d		3-(6-phenyl-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)-2 <i>H</i> -chromen-2-one	333
6e		3-(6-(4-(dimethylamino)phenyl)-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl)-2 <i>H</i> -chromen-2-one	376
6f		3-(6-(4-chlorophenyl)-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-4-yl)-2 <i>H</i> -chromen-2-one	367.5

Résumé

L'objectif de ce travail porte sur le développement de nouvelles molécules hybrides à activité biologique. La synthèse et la caractérisation par différentes techniques d'analyse à savoir : Pf, CCM, UV-Vis et IR de la 3-acétylcoumarine et ses dérivées ont été effectués. De plus, l'évaluation de leurs activités antioxydantes par la méthode de réduction du radical DPPH a été réalisée. Les résultats obtenus ont montré que certains produits dérivés de 3-acétylcoumarine présentent une activité antioxydante mais qui varie d'un composé à un autre. Cette étape est d'autant plus importante que c'est la 3-acétylcoumarine synthétisée qui va servir de matière première à la synthèse de molécules hybrides par la réaction de Biginelli. L'estimation de l'effet antibactérien a été déterminée par la méthode de diffusion de disque pour les différents produits synthétisés. Les résultats obtenus varient d'une souche à l'autre et d'un composé à un autre.

Mots clés : acétylcoumarine, molécules hybrides, réaction de Biginelli, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

The aim of this work is the development of new hybrid molecules with biological activity. Synthesis and characterization by various analysis techniques Viz. Pf, CCM, UV-Vis and IR of 3-acetylcoumarin and its derivatives were carried out. Besides, the evaluation of their antioxidant activities by the radical reduction method DPPH is realised. The obtained results showed that certain products derived from 3-acetylcoumarin exhibit antioxidant activity but which varies from one compound to another. This step is as important as the synthesized 3-acetylcoumarin that will serve as raw material for the synthesis of hybrid molecules by the Biginelli reaction. The estimation of the antibacterial effect was determined by the disk diffusion method for the various synthesized products. The obtained results vary from one strain to another and from one compound to another.

Key words: acetylcoumarin, hybrid molecules, Biginelli reaction, antioxidant activity, antibacterial activity.

المخلص

الهدف من هذا العمل هو تطوير جزيئات هجينة جديدة ذات نشاط بيولوجي . تم إجراء التوليف و التوصيف بواسطة تقنيات التحليل المختلفة و هي : Pf و CCM و UV-VIS و IR من الأستيلكومارين و مشتقاته . بالإضافة إلى ذلك، تقييم أنشطتها المضادة للأكسدة عن طريقة الحد من جذر DPPH. و قد تحققت و أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن بعض المنتجات المشتقة من الأستيلكومارين تظهر نشاط مضاد للأكسدة و لكنها تختلف من مركب إلى آخر . هذه الخطوة هي أكثر أهمية لأنها هي الأستيلكومارين المركب الذي سيكون بمثابة مادة خام لتخليق الجزيئات الهجينة من بقلع Biginelli. ثم تحديد تقدير التأثير المضاد للبكتيريا بواسطة طريقة نشر القرص لمختلف المنتجات المركبة . النتائج التي تم الحصول عليها تختلف من سلسلة إلى أخرى و من مركب إلى آخر .

الكلمات الرئيسية : الأستيلوماكين، الجزيئات الهجينة، رد فعل Biginelli، نشاط مضادات الأكسدة، و النشاط المضاد للبكتيريا .