N° d'ordre : …..

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE *:* CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

Synthèse et activité biologique de quelques dérivés chalcones, pyrazolyl-pyridines et oxazolyl-pyridines.

Présenté par : **IHADDADENE** **MOHAMED**

Soutenu publiquement, le 10 / 07 / 2019, devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	*Grade*	*Affiliation*	*Qualité*
DERMECHE Leila	*Pr*	*UMMTO*	*Président*
MAKHLOUFI-CHEBLI Malika	*Pr*	*UMMTO*	*Encadreur*
HIKEM-OUKACHA Djamila	*MCA*	*UMMTO*	*Examinatrice*
BENAZZOUZ-TOUAMI Amina	*MCB*	*UMMTO*	*Examinatrice*

Remerciements

*Je tiens à remercier en premier lieu **Mme MAKHLOUFI-CHEBLI Malika** professeur à l'université de Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou pour avoir accepté de m'encadrer et de me diriger, pour son soutien, ses encouragements, les discussions scientifiques, les critiques et conseils qui ont toujours été constructifs et pertinents qui m'ont permis d'évoluer tout au long de cette formation et de faire avancer ce travail. Soyez assurée, madame de ma profonde reconnaissance et de mon très grand respect.*

*Mes Remerciements vont aussi à **Mme DERMECHE Leila** professeur à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour l'honneur qu'elle m'a fait en présidant mon jury et pour son aide précieuse au cours de mon parcours.*

*Je remercie Mme **HIKEM-OUKACHA Djamila**, maître de conférence A à l'université de Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou d'avoir accepté d'examiner ce travail. Merci pour vos conseils, d'avoir toujours cru en moi et pour vos encouragements dans les moments où j'en avais le plus besoin, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.*

***J**e tiens également à remercier **Mme BENAZZOUZ-TOUAMI Amina** maître de conférence B à l'université de Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou de s'être intéressée à ce travail et d'avoir accepté d'en être l'examinatrice. Merci de m'avoir fait partager vos petites astuces de paillasse, vos connaissances en synthèse et en biologie.*

*Je remercie aussi **D^r ABDOUN Amar**, **D^r YAHI Sarah**, **D^r DANI Fariel** de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Microbiologie et pour leurs conseils avisés.*

*Je remercie aussi **M^elle OULD LAMARA Kamilia** étudiante en 1^ére année Doctorat pour sa disponibilité et son aide précieuse afin de terminer ce travail.*

Enfin, je suis reconnaissant à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

A mon cher père

Ma réussite a été et est toujours ton souci permanent, tes conseils et tes prières m'ont toujours accompagné. Je ne trouverai jamais assez de mots pour t'exprimer tout mon Amour, ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour les sacrifices consentis, tu es et tu resteras toujours mon modèle et mon héros.

Que Dieu le tout puissant t'accorde une longue vie pleine de bonheur et de santé afin que les efforts que tu as consentis pour ma réussite te soient récompensés. Un jour tu seras davantage plus fier de moi.

A ma chère mère

Aucune dédicace ne serait exprimer mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu as consenti pour mon éducation et mon bien être.

Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me portes depuis mon enfance j'espère que ta bénédiction m'accompagnera toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de tes vœux tant formulés, le fruit de tes innombrables sacrifice puisse dieu tout puissant t'accorde santé bonheur et une longue vie.

A mes frères et sœurs

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous, merci pour votre soutien infini et votre aide incessante, je vous souhaite beaucoup de réussite dans vos vies.

A ma petite nièce

Que j'aime tant et à qui je souhaite une longue vie remplie de bonheur et de réussite dans tout ce que tu entreprendras.

A la mémoire de ***mes grands-parents*** *qui veillent toujours sur nous, que dieu vous accueille dans son vaste paradis.*

A tous mes amis et tous ceux que j'aime.

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

Moumouh

Sommaire

Introduction générale ……..…1

Chapitre I : Etude bibliographique

I. Chalcones et dérivés ……...…2

I.1 Introduction …….……..2

I.2 Origine…….....3

I.3 Synthèse organique des chalcones……...….3

I.3.1 La condensation de Claisen-Schmidt……..3

I.3.2 Différentes méthodes de synthèse des chalcones…….....4

I.4 Propriétés pharmacologiques……..……...5

I.4.1 Activité anticancéreuse……...5

I.4.2 Agent anti paludique ……..6

I.4.3 Activité antioxydante……..6

II. Les Pyrazoles ……..…7

II.1 Définition……..7

II.2 Histoire et origines des Pyrazoles…….....7

II.3 Méthodes de synthèse de quelques Pyrazoles substitués……..8

II.3.1 A partir de 1,3-dicétones……8

II.3.2 Différentes voies de synthèse des pyrazoles……..9

II.4 Activités biologiques de quelques composés pyrazoliques…….11

II.4.1 Activité antimicrobienne ……...……....……...11

II.4.2 Activité anticancéreuse…….…11

II.4.3 Activité anti-inflammatoire……...11

III. Les Isoxazoles…….....12

III.1 Définition…….....12

III.2 Origine…….....12

III.3 Synthèses des isoxazoles…….....13

III.3.1 Cyclocondensation des α-hydroxycétones avec des cyanamides…….....13

III.3.2 Cyclisation des β-azidovinylcétones…….……..13

III.3.3 Isoxazoles 3,5-disubstitués…….....14

III.4 Activités biologiques des isoxazoles……..14
III.4.1 Agent anticancéreux……14
III.4.2 Agent antimicrobien……15
III.4.3 Agent anti-inflammatoire……15
Chapitre II : Partie expérimentale
I. Appareillages et techniques analytiques ……16
I.1. Point de fusion ……16
I.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) ……16
I.3. Spectroscopie infrarouge ……16
I.4. Spectrophotométrie UV-Visible ……..16
II. Réactifs ……16
III. Manipulations……17
III.1 Synthèse des chalcones à partir de la 4-acétylpyridine…….……17
III.2 Synthèse conventionnelle des Pyrazoles à partir des chalcones……..17
III.2 Synthèse conventionnelle des isoxazoles à partir des chalcones ……...18
IV Etude de l'activité biologique des Chalcones, des Pyrazoles et des isoxazole …19
IV.1. Activité antioxydante ……19
IV.1.1. Principe ……..19
IV.1.2. Mode opératoire ……20
IV.1.3 Détermination de la CE 50 ou CI 50……21
IV.2. Activité antibactérienne ……21
IV.2.1 Choix et origines des souches bactériennes testées …….……21
IV.2.2 Repiquage ……...…...……...22
IV.2.3 Confirmation des souches bactériennes ……..22
IV.2.4 Réalisation de l'antibiogramme ……..23
IV.2.4.1 Préparation de l'inoculum ……...……23
IV.2.4.2 Ensemencement et dépôt des disques ……..……...23
IV.3 Lecture des antibiogrammes ……..23
Chapitre III : Résultats et discussions
I. Introduction…….24

II. Synthèse des chalcones à partir de la 4-acétyl pyridine ……...…….24
II.1. Mécanisme de réaction ……...26
II.2. Diastéréoisomérie Z/E, Calcul théorique de l'énergie de stabilité…….....26
II.3. Résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)……..27
II.4. Analyse par spectrophotométrie UV-Visible……..27
II.5. Analyse par spectroscopie IR…….29
III. Synthèse des Pyrazolines/Pyrazoles à partir des chalcones ……..30
III.1. Mécanisme réactionnel……..32
III.2 Résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)…….32
III.3 Analyse par spectrophotométrie UV-Visible…….33
III.4 Analyse par spectroscopie IR…….34
IV. Synthèse des Isoxazoles à partir des chalcones ……...35
IV.1 Mécanisme réactionnel……...37
IV.2 Résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)…….40
IV.3 Analyse par spectrophotométrie UV-Visible…….40
IV.4 Analyse par spectroscopie IR ……....41
V. Activité biologique ...…….…..42
V.1. Activité antioxydante des chalcones, des pyrazoles et des isoxazoles……...42
V.1.2 Détermination de la CE 50 ou CI 50 …….……..45
V.3 Activité antibactérienne des chalones, des pyrazoles et des isoxazoles…….…...…..47
Conclusion…….…….52
Conclusion générale …….…….53
Perspectives…….……...…54
Annexe
Résumé

Liste des figures

Figure. I.1. Structure générale de la chalcone…….2

Figure I.2 Hybrides chalcone-coumarine……...5

Figure I.3. Chalcone antipaludique (6) et la plus puissante molécule……..6

Figure I.4. 3′-coumaroyl-2', 4, 4′-trihydroxy-6′-méthoxychalcone……7

Figure I.5 Le noyau Pyrazole…….7

Figure I.6 Antipyrine (9)……8

Figure I.7 Molécule synthétisées naturellement…….8

Figure I.8 Molécules présentant une activité bactérienne……11

Figure 1.9 N, N-bis [(3,5-diméthylpyrazol-1-yl) méthyl] aniline (14)…….11

Figure I.10 1-(4-phényl substitué)-3-phényl-1*H*-pyrazole-4-carbaldéhydes……...12

Figure I.11 Structure d'isoxazole……12

Figure I.12. N-(4-chlorophényl) isoxazole-5-carboxamide (22)……..14

Figure I.13 1,4-bis(3-(4-chlorophényl)-4-((4-chlorophényl) sulfonyl)isoxazol-5-yl)benzène (23)……15

Figure I.14. (E)-N-(4-((2,4-diméthoxybenzyl)carbamoyl)-3-méthylisoxazol-5-yl) acétimidate d'éhyle (24)……...15

Figure III.1$_a$ Spectre UV-visible du composé C_1 dans le DMSO……28

Figure III.1$_b$ Spectre UV-visible du composé C_2 dans le DMSO……...Annexe

Figure III.1$_c$ Spectre UV-visible du composé C_3 dans le DMSO……...Annexe

Figure III.1$_d$ Spectre UV-visible du composé C_4 dans le DMSO……...Annexe

Figure III.1$_e$ Spectre UV-visible du composé C_6 dans le DMSO……...Annexe

Figure III.1$_f$ Spectre UV-visible du composé C_7 dans le DMSO……Annexe

Figure III.1$_g$ Spectre UV-visible du composé C_8 dans le DMSO……...Annexe

Figure III.2$_a$ Spectre IR du composé C_1……..Annexe

Figure III.2$_b$ Spectre IR du composé C_2……..Annexe

Figure III.2$_c$ Spectre IR du composé C_4……. ……Annexe

Figure III.2$_d$ Spectre IR du composé C_7……. Annexe

Figure III.3 Formes tautomères de pyrazoline……30

Figure III.4$_a$ Spectre UV-Visible du composé P_1 dans le DMSO……...33

Figure III.4$_b$ Spectre UV-Visible du composé P_2 dans le DMSO……...Annexe

Figure III.4$_c$ Spectre UV-Visible du composé P_3 dans le DMSO ……..Annexe

Figure III.4$_d$ Spectre UV-Visible du composé P_4 dans le DMSO……...Annexe

Figure III.4$_e$ Spectre UV-Visible du composé P_5 dans le DMSO…….. Annexe

Figure III.4$_f$ Spectre UV-Visible du composé P_6 dans le DMSO……...Annexe

Figures III.5$_a$ Spectre IR du composé P_1…….Annexe

Figures III.5$_b$ Spectre IR du composé P_3……Annexe

Figures III.5$_c$ Spectre IR du composé P_6……Annexe

Figure III.6 Sites d'attaques nucléophiles et les structures de résonance possibles des chalcones $C_{1\text{-}8}$……37

Figure III.7 Charges partielles des atomes de la chalcone et de l'hydroxylamine dans de l'éthanol à l'aide de la méthode du logiciel ORCA……...38

Figures III.8$_a$ Spectre UV-Visible du composé i/i'$_1$ dans le DMSO……..……Annexe

Figures III.8$_b$ Spectre UV-Visible du composé i/i'$_2$ dans le DMSO…….. Annexe

Figures III.8$_c$ Spectre UV-Visible du composé i/i'$_3$ dans le DMSO……...40

Figures III.8$_d$ Spectre UV-Visible du composé i/i'$_4$ dans le DMSO……...Annexe

Figures III.8$_e$ Spectre UV-Visible du composé i/i'$_5$ dans le DMSO……...Annexe

Figures III.8$_f$ Spectre UV-Visible du composé i/i'$_6$ dans le DMSO……...Annexe

Figure III.9$_a$ Spectre IR du composé i/i'$_1$……Annexe

Figure III.9$_b$ Spectre IR du composé i/i'$_3$……Annexe

Figure III.9$_c$ Spectre IR du composé i/i'$_6$……... Annexe

Figure III.10$_a$ Densité Optique en fonction de la concentration de l'acide ascorbique……...43

Figure III.10$_b$ Densité Optique en fonction de la concentration des composés C_8, $P_{1\text{-}6,}$ $i_{1\text{-}6}$…43

Figure III.11$_a$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ de l'acide ascorbique…..…44

Figure III.11$_b$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé C_8……...44

Figures III.11$_c$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé P_1…….Annexe

Figures III.11$_d$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé P_2…….Annexe

Figures III.11$_e$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé P_3…….Annexe

Figures III.11$_f$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé P_4…….Annexe

Figures III.11$_g$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé P_5…….Annexe

Figures III.11$_h$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé P_6…….Annexe

Figures III.11$_i$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé i/i'$_1$…..Annexe

Figures III.11$_j$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé i/i'$_2$...…Annexe

Figures III.11$_k$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé i/i'$_3$.….Annexe

Figures III.11$_L$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé i/i'$_4$.….Annexe

Figures III.11$_m$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé i/i'$_5$.….Annexe

Figures III.11$_n$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé i/i'$_6$…..Annexe

Figure III.12 Valeur de la CI 50 du composé C_8 et de l'acide ascorbique (AA)…….46

Figure III.13 Valeurs des CI 50 des composés $P_{1\text{-}6}$ et de l'acide ascorbique (AA)…….46

Figure III.14 Valeurs des CI 50 des composés $i_{1\text{-}6}$ et de l'acide ascorbique (AA)……..47

Figure III.15 Diamètre des zones d'inhibition des composés $C_{1\text{-}8}$ ……49

Figure III.16 Diamètre des zones d'inhibition des composés $P_{1\text{-}6}$ ……...……..50

Figure III.17 Diamètre des zones d'inhibition des composés $i_{1\text{-}6}$……51

Liste de schémas

Schéma I.1 Les modifications biochimiques des chalcones……..3

Schéma I.2 Condensation de Claisen-Schmidt catalysée par la soude dans l'éthanol……...3

Schéma.I.3 : Différentes méthodes de synthèse des chalcones……..4

Schéma I.4. Synthèse des Pyrazoles à partir de 1,3-dicétones……...9

Schéma.I.5 Mécanisme réactionnel de la synthèse du Pyrazole……....9

Schéma.I.6 Différentes voies de synthèse des Pyrazoles…….10

Schéma I.7 Synthèse régiospécifique de 3-substitués-5-alkylioxazoles à partir d'oxime et de cyanamide……..13

Schéma I.8. Cyclisation du 4-azido-3-formyl-pyridones en isoxazolo-pyridones……...13

Schéma I.9. Synthèse d'isoxazoles 3,5-disubstitués……14

Schéma II.1 Mécanisme général de synthèse des chalcones à partir de la 4-acétylpyridine...17

Schéma II.2 Mécanisme général de synthèse des Pyrazoles à partir des chalcones……18

Schéma II.3 Mécanisme général de synthèse des isoxazoles à partir des chalcones……..18

Schéma II.4 : Mécanisme général de réduction de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)…….……20

Schéma.III.1 Synthèse des chalcones à partir de la 4-acétyl pyridine…….25

Schéma III.2 Mécanisme réactionnel de la Synthèse des chalcones……26

Schéma III.3 Synthèse des Pyrazoles à partir des chalcones……...31

Schéma III.4 Mécanisme réactionnel de synthèse des pyrazoles……32

Schéma III.5 Synthèse des Isoxazoles à partir des chalcones……..36

Schéma III.6 Mécanisme réactionnel de synthèse des isoxazoles……...39

Liste des tableaux

Tableau II.1 Temps de réaction des chalcones, Pyrazoles et des isoxazoles……...19

Tableau III.1 Résultats et propriétés physico-chimiques des chalcones obtenus……25

Tableau III.2 Calcul d'énergie des composés chalcones…….27

Tableau III.3 Rapports frontaux des différents produits…….27

Tableau III.4 Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible des composés C_{1-8}……..28

Tableau III.5 Résultats de la spectroscopie IR des chalcones…….29

Tableau III.6 Résultats et propriétés physico-chimiques des chalcones obtenus……31

Tableau III.7 Rapports frontaux des différents produits…….32

Tableau III.8 Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible des composés P_{1-6}……..34

Tableau III.9 Résultats de spectroscopie IR des pyrazoles…….34

Tableau III.10 Résultats et propriétés physico-chimiques des chalcones obtenus……..36

Tableau III.11 Rapports frontaux des différents produits……...40

Tableau III.12 Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible des composés i_{1-6}…….41

Tableau III.13 Résultats de spectroscopie IR des chalcones isoxazoles…….41

Tableau III.14 Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du Composé C_8 et de l'acide ascorbique…….43

Tableau III.15 Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des Composés P_{1-6} et de l'acide ascorbique…….43

Tableau III.16 Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des Composés i_{1-6} et de l'acide ascorbique…….44

Tableau III.17 La valeur de la CI 50 du composé C_8 et de l'acide ascorbique……..45

Tableau III.18 Les valeurs des CI 50 des composés P_{1-6} et de l'acide ascorbique……46

Tableau III.19 Les valeurs des CI 50 des composés i_{1-6} et de l'acide ascorbique……..47

Tableau III.20 Diamètre des zones d'inhibition des chalcones……...48

Tableau III.21 diamètre des zones d'inhibition des pyrazoles……...50

Tableau III.22 Diamètre des zones d'inhibition des isoxazoles…….……..51

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide Ascorbique

Abs : Absorption

ATB : Antibiotique

ATCC : American Type Culture Collection

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CAZ : Ceftazidime

CL : Colistine

CI 50 / CE50 : Concentration Inhibitrice /Concentration efficace

COX : Cyclooxygénase

% CR : Pourcentage capture radical

1D : une dimension

2D : deux dimensions

DO : Densité optique

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

E.Coli : Escherichia coli

Exp : Expérimental

IR : Infra Rouge

Kcal : kilo calorie

Lic A : licochalcone A

LOX : La lipoxygénase

MF : MC Farland

MO : Micro-ondes

MCF-7: Michigan Cancer Foundation – 7

QSAR : Quantitative Structure Activity Relationship

ORCA : Oxygen Radical Absorbance Capacity

P.aeruginosa : pseudomonas aeruginosa

P_f : Point de fusion

Pf litt : point de fusion de littérature

Pyr : pyrimidine

R_f : rapport frontal

Rdt : Rendement

Rif 5 : Rifampicine

S.Aureus : Staphylococcus aureus

UV-Visible : Ultra-Violet-Visible

µM : micro molaire.

λ : longueur d'onde

$\overline{\upsilon}$: nombre d'onde

Introduction générale

Les maladies pathogènes font l'objet d'une reconnaissance croissante par le corps médical depuis plusieurs siècles, elles sont déclenchées par différents agents qui sont le plus souvent des bactéries, des virus, des champignons ou des parasites.

Les hétérocycles oxygénés et azotés occupent une place importante dans la chimie organique et constituent un champ intéressant pour la recherche de nouveaux médicaments. Un très grand nombre de substances naturelles et de médicaments sont des hétérocycles saturés, partiellement saturés ou aromatiques. Approximativement deux tiers des publications en chimie concernent de près ou de loin les hétérocycles.

Les chalcones sont des composés organiques appartenant aux dérivés carbonylés α,β-insaturés possédant des propriétés pharmacologiques très intéressantes, comprenant l'activité antibactérienne, antivirale, anti-tumorale et anti-inflammatoire. Ils sont aussi connus comme des intermédiaires dans la synthèse de plusieurs composés hétérocycliques comme les pyrazoles, les isoxazoles et les flavonoïdes.

Les pyrazoles et les isoxazoles possèdent également une grande réactivité. Les différentes applications de ces molécules dans divers domaines ont suscité un intérêt grandissant de la part des chimistes, ce qui s'est traduit par la recherche et la préparation de molécules originales et aussi par l'établissement de méthodologies de synthèse nouvelles.

L'étude que nous avons entreprise dans le cadre de ce mémoire a pour objectif principal la préparation et l'identification structurale de molécules originales potentiellement actives sur le plan thérapeutique et biologique.

La méthodologie suivie consiste à synthétiser de nouvelles séries de pyrazoles et d'isoxazoles à partir des chalcones préalablement obtenues par la condensation de Claisen Schmidt de la 4-acétylpyridine avec différents aldéhydes aromatiques puis l'addition de l'hydrazine hydrate pour l'obtention des pyrazoles ou de l'hydroxylamine hydrochloride pour l'obtention des isoxazoles.

Dans ce manuscrit, nous détaillons dans le premier chapitre quelques généralités sur les chalcones, les pyrazoles et les isoxazoles ainsi que les différentes méthodes de synthèse et les différentes activités connues sur les composés contenant ces motifs. Dans le deuxième chapitre sont présentés les protocoles expérimentaux des synthèses et de l'activité biologique réalisées et les techniques de caractérisation structurale des molécules obtenues. Le troisième chapitre est consacré à la discussion des résultats expérimentaux et à l'évaluation antibactérienne in vitro et antioxydante de certains composés synthétisés au cours de ce travail. Une conclusion générale et des perspectives sur les avancées réalisées termineront ce manuscrit.

Chapitre I : Etude bibliographique

I. Chalcones et dérivés

I.1. Introduction

Les chalcones (ou 1,3-diarylprop-2-èn-1-ones) sont des énones aromatiques ou cétones α, β insaturées (figure I.1). Elles sont constituées d'un système conjugué contenant l'entité prop-2-ènal lié à chaque extrémité un groupe aryle. Les chalcones peuvent exister sous forme de deux stéréoisomères (**Z**) et (**E**) en fonction de la disposition des substituants autour de la double liaison centrale, dont les stéréoisomères **E** sont les plus abondants.

En raison de leur large application dans le domaine pharmaceutique et biologique, la synthèse des chalcones a suscité un énorme intérêt au cours des dernières années [1]. En effet à cause de leurs structures flexibles, et leur capacité à interagir avec différents récepteurs, les chalcones possèdent un large éventail d'activités biologiques, telles que les propriétés anti-tumorales, antibactériennes, antiallergiques, antivirales et antipaludiques [2, 3, 4] …etc. Ces dérivés sont caractérisés par des groupes différents et actifs comme: chlore, méthoxy, hydroxy, nitro [Cl, OMe, OH, NO_2] dans les cycles aromatiques [5,6]. Ils sont également considérés comme importants intermédiaires de synthèse pour la préparation de flavonoïdes et les isoflavonoïdes, qui sont largement présents dans les plantes non comestibles [1]. Les chalcones sont présentes dans de nombreuses plantes, il est néanmoins possible de les mettre au point en laboratoire.

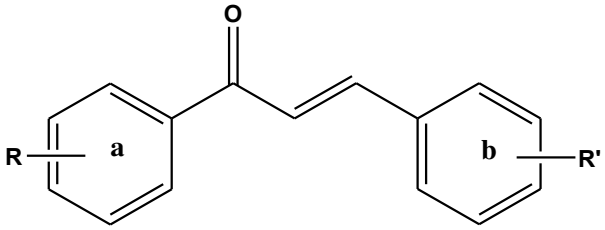


Figure. I.1. Structure générale de la chalcone.

I.2 Origine

Chalcones ou benzylidéneacétophénones sont des constituants importants de sources naturelles. Elles ont été isolées d'abord à partir de réglisse chinoise. Elles disposent d'un système conjugué contenant l'entité énone, qui a été reconnu comme la partie active principale dans les chalcones. À partir des plantes, la partie chalcone stable ne peut être isolée en raison de la présence de l'enzyme chalcone synthétase qui convertit immédiatement la chalcone en flavanone [7] (Schéma I.1).

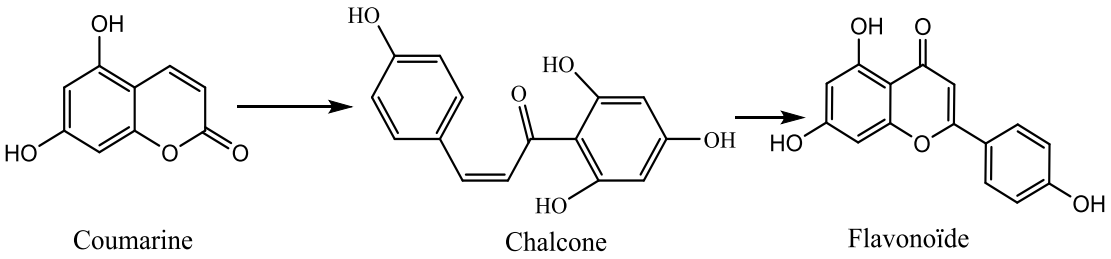


Schéma I.1 Les modifications biochimiques des chalcones.

I.3. Synthèse organique des chalcones

I.3.1. La condensation de Claisen-Schmidt

La condensation de Claisen-Schmidt est probablement la plus simple et la plus couramment utilisée des méthodes de synthèse des chalcones. Il s'agit d'une réaction d'aldolisation-crotonisation, entre une acétophénone et un benzaldéhyde, qui peut être catalysée par une base ou un acide, dans un solvant polaire [8] (Schéma I.2). Etant donné la variété des acétophénones et des benzaldéhydes disponibles dans le commerce, il est aisé d'obtenir un large panel de chalcones substituées. Les rendements de ce type de réaction varient selon les substitutions présentes sur les réactifs de départ (20-90%).

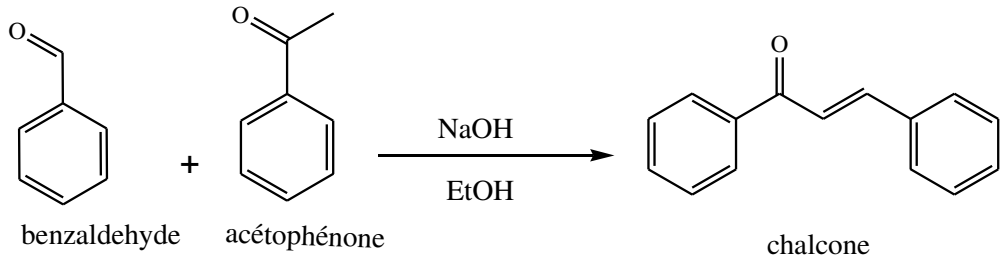


Schéma I.2 Condensation de Claisen-Schmidt catalysée par la soude dans l'éthanol.

I.3.2. Différentes méthodes de synthèse des chalcones

Les chalcones peuvent être obtenues par différentes voies de synthèse qui sont résumés dans le **schéma I.3**

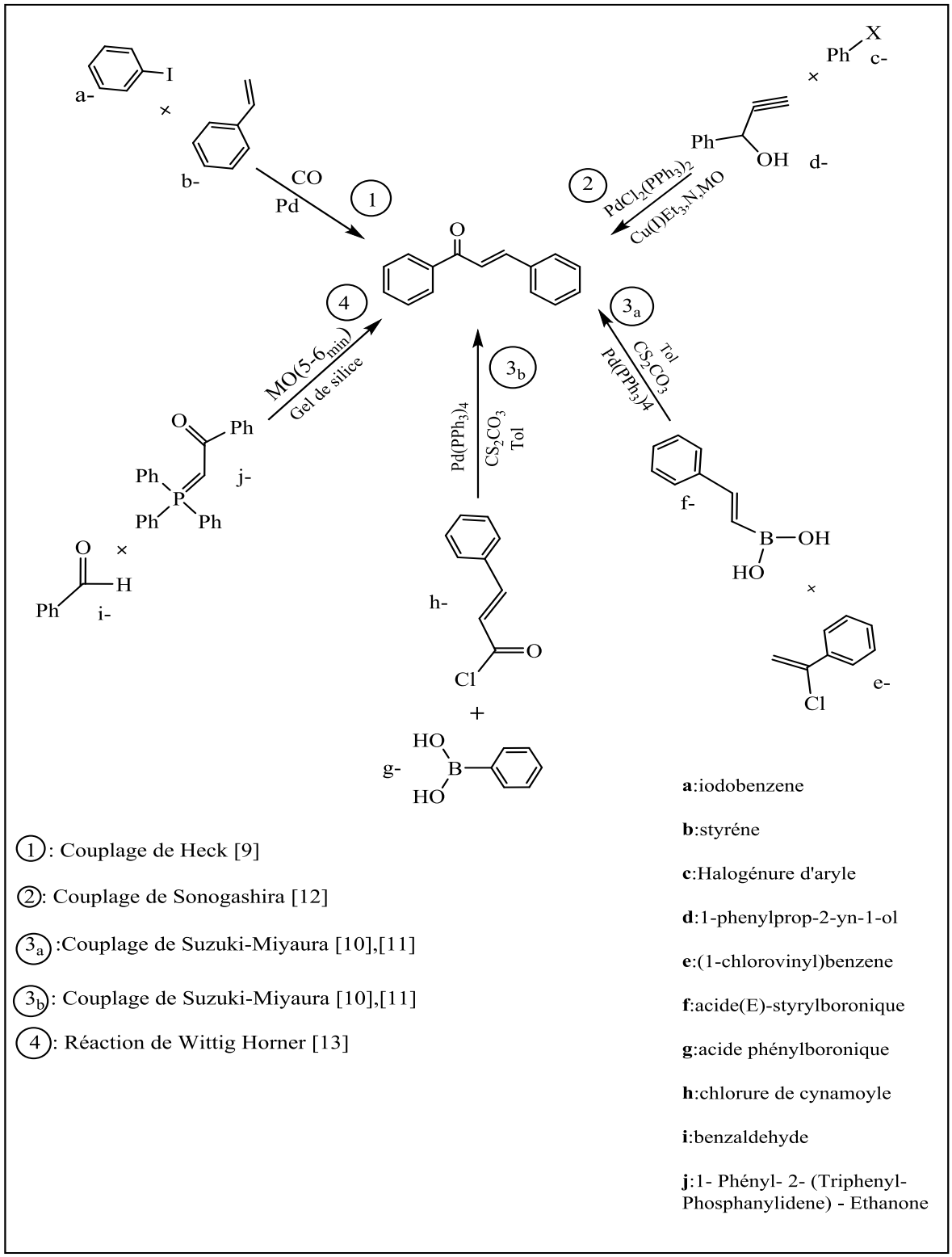


Schéma.I.3 : Différentes méthodes de synthèse des chalcones.

I.4. Propriétés pharmacologique

Les chalcones et leurs dérivés ont suscité un intérêt particulier au cours des dernières décennies en raison de l'utilisation d'un tel système. On pense que la présence de la fonctionnalité (double liaison en conjugaison avec carbonyle) est responsable des activités biologiques des chalcones, car sa suppression l'a rend inactive. Elle est la structure de base de nombreuses substances médicamenteuses couvrant une large gamme d'activités pharmacologiques qui sont plus en détail ci-dessous :

I.4.1 Activité anticancéreuse

Les molécules contenant plus d'un pharmacophore se sont révélées utiles pour le traitement du cancer [14,15]. En conséquence, la synthèse d'une série d'hybrides chalcone-coumarine, à savoir les composés **1-5** et leur évaluation in vitro sur un panel de quatre lignées de cellules cancéreuses humaines, KB (carcinome épidermoïde oral), C33A (carcinome cervical), MCF-7 (adénocarcinome du sein), A549 (poumon) et des fibroblastes normaux (NIH3T3) a été réalisé par Sashidhara et ses collaborateurs [16].

Les composés **4** et **5** ont montré une activité contre toutes les lignées cancéreuses, ces composés sont plus actifs contre C33A avec des CI50 comprises entre 3,59 µM et 8,12 µM. Le composé **5** avec le groupe -CH3 au niveau de l'anneau A s'est révélé être le plus actif contre C33A (CI50 = 3,59 µM), suivi de KB (CI50 = 17,97 µM), A549 (CI50 32,80 µM) et MCF7 (CI50 81,10 µM) avec activité contre la lignée cellulaire NIH3T3. La présence d'une fonctionnalité ester, en particulier d'un ester méthylique en position 3 et d'un cycle de la coumarine était considérée comme cruciale pour l'activité anticancéreuse de ces composés [16].

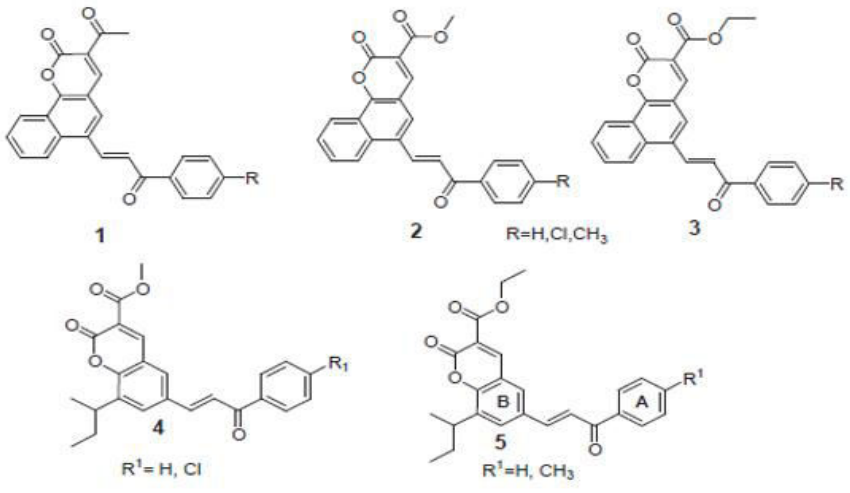


Figure I.2 Hybrides chalcone-coumarine.

I.4.2 Agent anti paludique

Le potentiel des chalcones en tant qu'agent antipaludique a été signalé pour la première fois en 1994 par Chen et al [17], où il a démontré l'action antipaludique de la licochalcone A (Lic A) présente dans les racines de réglisse chinoise. Yadav et al [18] qui a synthétisé 27 nouveaux dérivés de chalcone (figure.I.3) et a évalué leur activité antipaludique in vitro contre les stades sanguins asexués de Plasmodium falciparum.

Les composés portant des groupes -OCH_3 en position 2 et 4 sur le cycle B ont montré une bonne activité, alors que des groupes similaires en positions 3, 4 et 5 induite relativement moins puissante probablement due à un encombrement stérique dans le site actif de l'enzyme protéase de la cystéine.[18]

Le composé le plus actif, le 1-(4-benzimidazol-1-yl-phényl)-3-(2,4-diméthoxyphényl) propèn-1-one) **6** (figure I.3) a présenté une meilleure activité antipaludique comparativement à Lic A naturel avec une CI50 respective de 1,1 µg / mL et 1,43 µg / mL. [18]

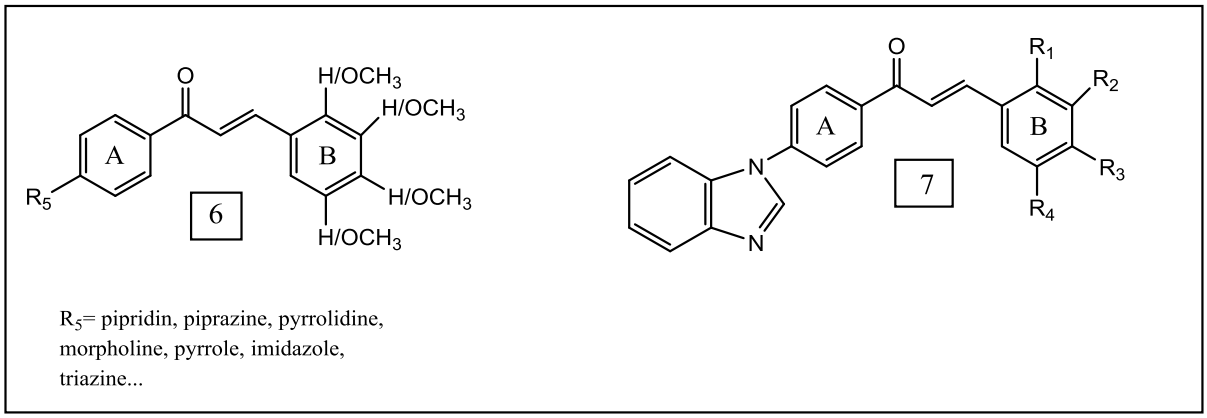
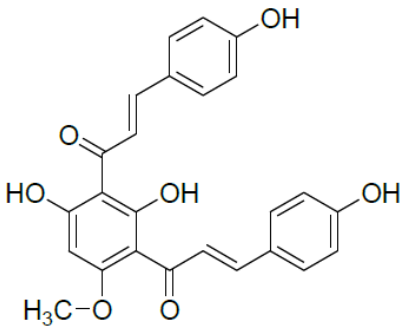


Figure I.3. Chalcone antipaludique (6) et la plus puissante molécule (7).

I.4.3 Activité antioxydante

Susanne et al.ont synthétisé le 3′-coumaroyl-2', 4,4′-trihydroxy-6′-méthoxychalcone (figure I.4), ont été structurellement dérivés de l'hélichryse. Le composé de la figure I.4 a montré l'activité cytotoxique la plus élevée contre les cellules HeLa avec une valeur de CI50 de 7,3 ± 0,4 µM. Les effets antioxydants ont été déterminés dans l'ORAC et a révélé une très forte activité pour ce composé [19].



8

Figure I.4. 3′-coumaroyl-2', 4, 4′-trihydroxy-6′-méthoxychalcone.

II. Les Pyrazoles

II.1 Définition

Le noyau pyrazole est un isomère structural de l'imidazole, le nom pyrazole provient du noyau pyrrole auquel on a ajouté un atome d'azote : ≪ azole ≫ (Figure I.5). Les deux atomes d'azote possèdent des propriétés différentes: l'un se comportant comme celui de la pyridine peut subir une protonation en milieu acide; l'autre possède la propriété de l'azote du pyrrole, le doublet participant à l'aromaticité du cycle. En nomenclature officielle, le motif pyrazole se nomme 1,2-diazole. Le Pyrazole est un hétérocycle aromatique plan π-excédentaire. Les réactions de substitutions électrophiles se font préférentiellement en position 4 et les attaques nucléophiles en position 3 et 5. [20]

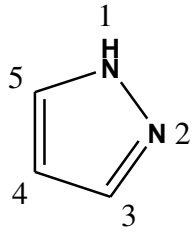


Figure I.5 Le noyau Pyrazole

II.2 Histoire et origines des Pyrazoles

Les Pyrazoles ont une illustre histoire ; en 1883, un chimiste allemand Ludwig Knorr a été le premier à découvrir l'activité antipyrétique du dérivé du pyrazole chez l'homme, il a nommé ce composé l'antipyrine. Cette structure a été obtenue accidentellement quand il a tenté de synthétiser des dérivés de la quinoléine ayant une activité antipyrétique, antipyrine. Le composé 2,3-diméthyl-1-phényl-3-pyrazoline-5-one (9) a une activité antipyrétique, analgésique et antirhumatismale. Ceci a stimulé l'intérêt du pyrazole en médecine et en chimie (figure I.6). [21]

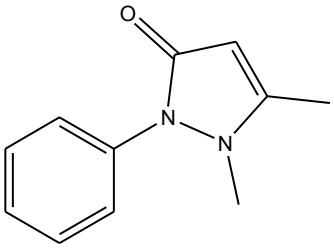
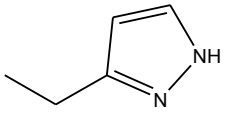
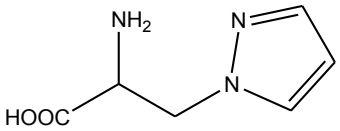


Figure I.6 Antipyrine (9)

Le motif pyrazole est rare dans la nature. Le premier dérivé pyrazolique naturel a été isolé par des chercheurs japonais Kosuge et Okeda en 1954. Jusqu'à leur découverte, on pensait que les Pyrazoles ne pouvaient être obtenus naturellement. Ils ont isolé le 3-éthyl-1*H*-pyrazole (10) à partir de Houttuynia cordata, une plante des «pipéracées » famille d'Asie tropicale; laquelle a montré une activité antimicrobienne. Ils ont également isolé l'acide 2-amino-3-(1*H*-pyrazol-1-yl) propanoique (11), un acide aminé, à partir de graines de pastèque (Citrullus vulgaris) (figure I.7) [22].



3-Ethyl-1H-pyrazole (10)



Acide 2-amino-3-(1*H*-pyrazol-1-yl) propanoique (11)

Figure I.7 Molécule synthétisées naturellement.

II.3 Méthodes de synthèse de quelques Pyrazoles substitués

Les Pyrazoles diversement substitués par des groupements aromatiques et hétéroaromatiques possèdent de nombreuses activités biologiques, ce qui les rend particulièrement intéressants. Plusieurs méthodes de synthèse sont connues nous en exposerons quelques-unes :

II.3.1 A partir de 1,3-dicétones

La cyclocondensation des composés 1,3-dicarbonylés avec les dérivés de l'hydrazine est une approche simple et rapide pour obtenir des Pyrazoles polysubstitués. Cette méthode développée par Knorr à la fin du 19 ^{ème} siècle aboutit généralement, en présence de substrats 1,3-dicarbonylés non symétriques, à la formation de deux régioisomères pouvant s'avérer difficilement séparables (schéma 1.4). [23]

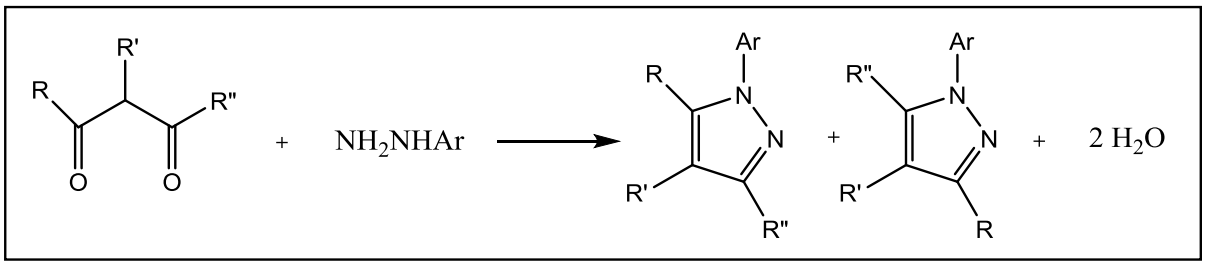


Schéma I.4. Synthèse des Pyrazoles à partir de 1,3-dicétones

Le mécanisme de la réaction passe d'abord par la formation d'une imine suivie d'une cyclisation déshydratante pour former le pyrazole (Schéma I.5).

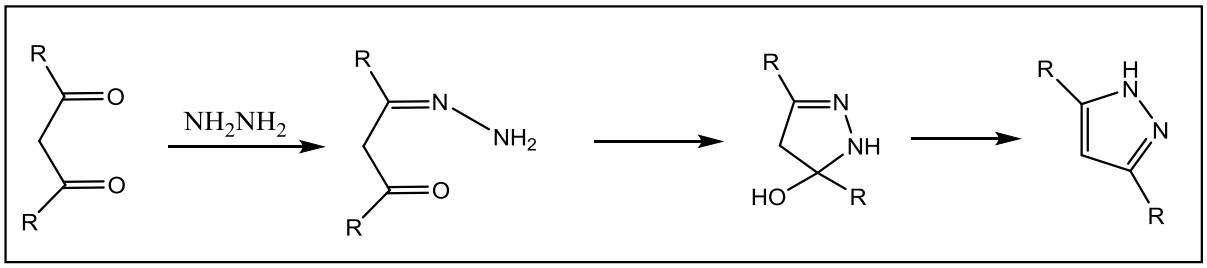
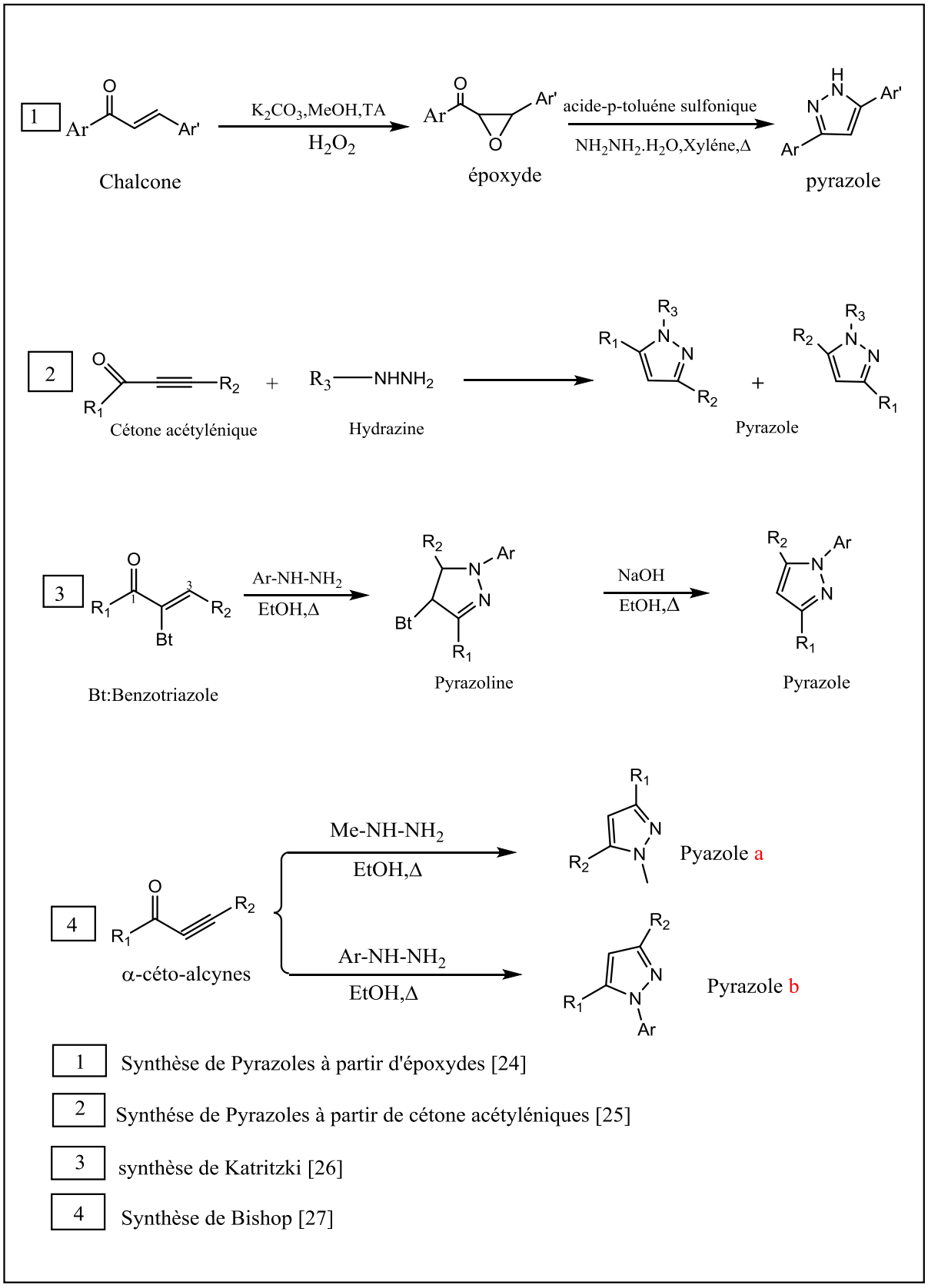


Schéma.I.5 Mécanisme réactionnel de la synthèse du Pyrazole.

II.3.2 Différentes voies de synthèse des Pyrazoles

Il existe plusieurs méthodes pour synthétiser les Pyrazoles, le schéma I.6 résume les grandes voies de synthèse de ces derniers :



1 Synthèse de Pyrazoles à partir d'époxydes [24]

2 Synthèse de Pyrazoles à partir de cétone acétyléniques [25]

3 synthèse de Katritzki [26]

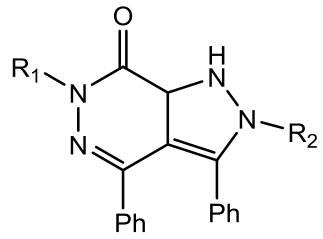
4 Synthèse de Bishop [27]

Schéma.I.6 Différentes voies de synthèse des Pyrazoles

II.4 Activités biologiques de quelques composés pyrazoliques

II.4.1 Activité antimicrobienne

Plusieurs nouveaux dérivés de la pyrazolo [3,4-d] pyridazine ont été préparés, ces composés ont été examinés pour leurs activités antimicrobiennes contre les bactéries et les mycètes à GRAM négatif et à GRAM positif. Les composés (12) et (13) ont montré une activité sélective et efficace contre deux bactéries GRAM positif le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus) (cierge atcc 7064 de B, et S.doré Atcc 6538)*, et une bactérie à GRAM négatif Migula de *Pseudomonas putida* (putida atcc 12633 de P.) (Figure I.8) [28].



(12): $R_1 = C_6H_3Cl_2(2,5)$; $R_2 =$ Pyr.

(13): $R1 = C_6H_2Cl_3$ (2, 4, 6); $R_2 = CH_3$.

Figure I.8 Molécules présentant une activité bactérienne.

II.4.2 Activité anticancéreuse

L'activité anticancéreuse du tripode N, N-bis [(3,5-diméthylpyrazol-1-yl) méthyl] aniline (14) a été étudiée par Bouabdallah et coll [29]. Ces structures ont montré une remarquable activité cytotoxique envers deux cellules tumorales (figure I.9).

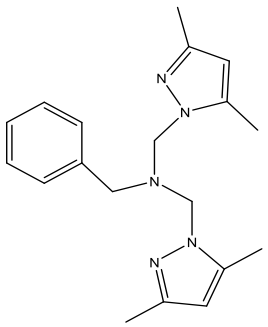


Figure 1.9 N, N-bis [(3,5-diméthylpyrazol-1-yl) méthyl] aniline (14)

II.4.3 Activité anti-inflammatoire

Selvam et al. [30] ont synthétisé une série de 1-(4-substitués phényl)-3-phényl-1*H*-pyrazole-4-carbaldéhydes et ont testé leurs activités anti-inflammatoires. 15, 16 et 17 ont montré une activité maximale par rapport au médicament standard, le Diclofénac Sodique (Figure I.10).

(15) R1 = H, R2 = F

(16) R1 = H, R2 = Br

(17) R1 = H, R2 = Cl

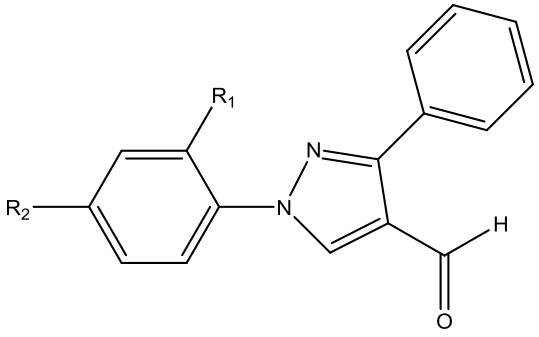


Figure I.10 1-(4-phényl substitué)-3-phényl-1*H* pyrazole-4-carbaldéhydes.

La présence de fonctions halogénures en position para augmente l'activité.

III. Les Isoxazoles

III.1 Définition

Les composés hétérocycliques à 5 chainons peuvent être classés selon les hétéroatomes qu'ils comportent, leur emplacement ainsi que le nombre d'insaturation qu'ils contiennent. Le premier type de ces hétérocycles largement utilisés dans la synthèse organique est l'isoxazole.

Le système isoxazolique comporte un atome d'oxygène en position 1, un atome d'azote en position 2 et deux instaurations à l'intérieur du cycle, ce qui lui confère un caractère aromatique (Figure I.11). Il comporte trois positions dans lesquelles, une ou plus, peuvent subir une substitution soit en position alpha, bêta ou gamma [31].

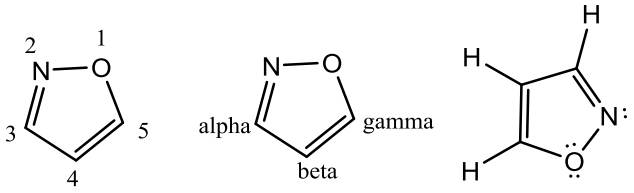


Figure I.11 Structure d'isoxazole

III.2 Origine

L'isoxazole a été reconnu pour la première fois par Ludwig Claisen en 1888 sous le nom de monoazole. Plus tard, il a été nommé isoxazole par Hantschen, à cette époque il y avait que deux composés isoxazoles qui ont été isolés en 1852. Cependant, le développement de la chimie d'isoxazole s'est produit significativement qu'après 1930 et bien que les structures n'aient été pas disposées jusqu'à 1946 par Quilico et al. [31].

III.3 Synthèses des isoxazoles

III.3.1 Cyclocondensation d'α-hydroxycétones avec des cyanamides

Diverses réactions de cyclocondensation pour la synthèse des isoxazoles ont été décrites dans la littérature. Nous citons à titre d'exemple la méthode de Nitz et al. [32] considérée parmi les premiers travaux de synthèse qui consiste à la condensation des α-hydroxycétones avec des cyanamides comme réactifs de départ. En premier temps, le N-méthoxy-N-méthylphénylacétamide (étape 2) réagis avec l'oxime (a) générant in situ l'intermédiaire (b), qui sera lui même traité par une solution acide donnant le produit cétalo-oxime (c) qui subit une cyclodésydratation conduisant au 3-méthyl-5-(phénylméthy1) isoxazole (d) (Schéma I.7).

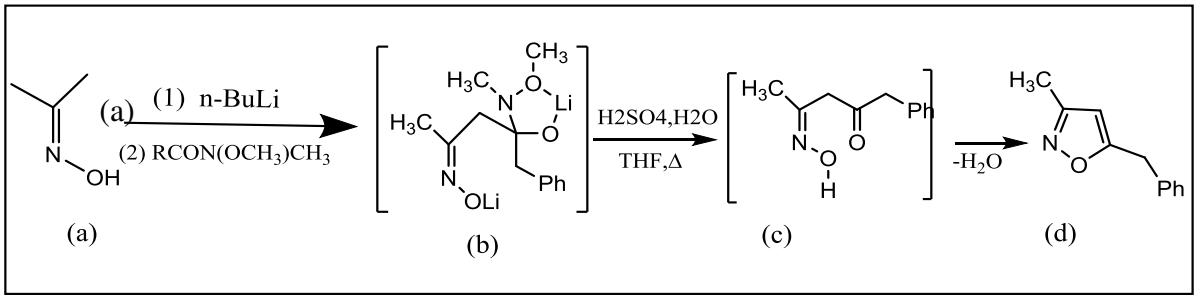


Schéma I.7 Synthèse régiospécifique de 3-substitués-5-alkylioxazoles à partir d'oxime et de cyanamide.

III.3.2 Cyclisation de β-azidovinylcétones

La synthèse d'isoxazole peut être réalisée à partir de β-azidovinylcétones selon la méthode décrite par Khattab [33], cette méthode consiste en une seule étape à la préparation du 4-chloro-3-formylpyridone **(19)** à partir du 4-hydroxypyridone **(18)** en utilisant le chlorure de phosphoryle comme réactif dans DMF, ensuite l'azidation du composé **(20)** a été obtenu à partir du chloroaldéhyde **(19)** à température ambiante ou à reflux dans l'acétone comme solvant, ce dernier a été condensé in situ pour donner l'isoxazolopyridone **(21)**,(Schéma I.8).

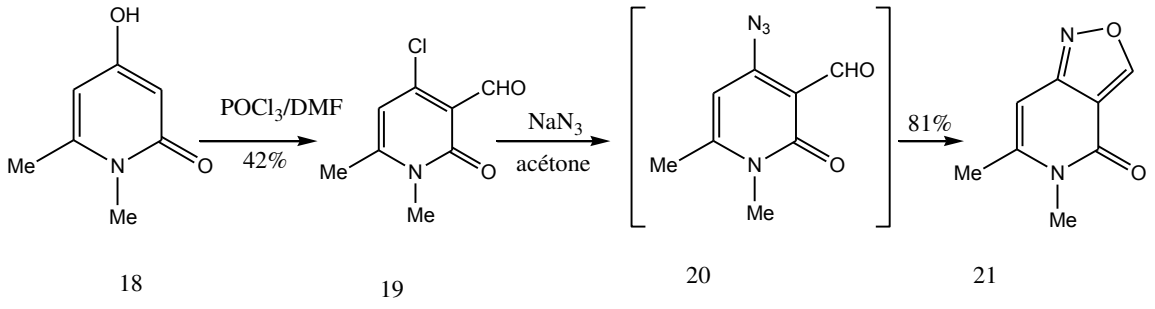


Schéma I.8. Cyclisation du 4-azido-3-formyl-pyridones en isoxazolo-pyridones

III.3.3 Isoxazoles 3,5-disubstitués

Les isoxazoles 3,5-disubstitués sont obtenus par voie régiosélective avec de bons rendements par une procédure en trois étapes douce et pratique utilisant une réaction de cycloaddition catalysée au cuivre (I) entre les oxydes de nitrile générés *in situ* et les acétylènes terminaux [34].

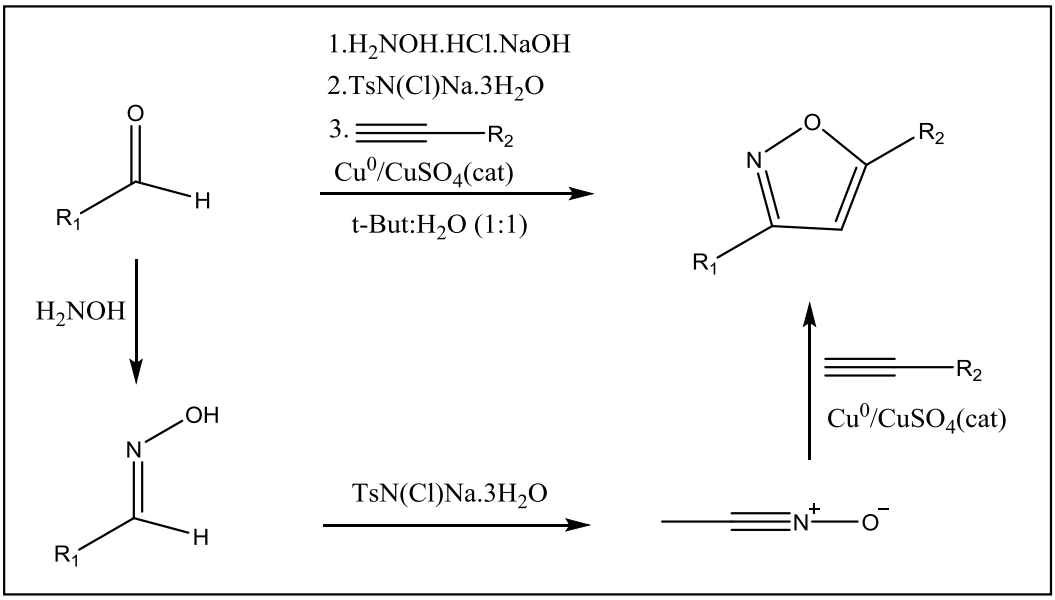


Schéma I.9. Synthèse d'isoxazoles 3,5-disubstitués.

III.4. Activités biologiques des isoxazoles

III.4.1 Agent anticancéreux

Une nouvelle série de dérivés d'isoxazole, le N-(phényl) isoxazole-5-carboxamide, a été étudié pour leur activité anticancéreuse chez la souris (cancer du côlon). Les résultats ont montré que le composé 22 (figure I.12) était le plus actif contre les tumeurs du colon 38 et CT-26 des cellules de souris avec une CI 50 de 2,5 µg / mL pour les deux lignées cellulaires et pourrait être encore étudié comme agent chimiothérapeutique prometteur pour le traitement du cancer du côlon [35].

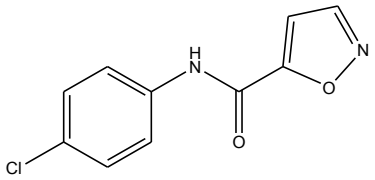


Figure I.12. N-(4-chlorophényl) isoxazole-5-carboxamide (22).

III.4.2 Agent antimicrobien

En 2014, Lavanya et al. ont synthétisé deux séries de nouveaux composés, le 1,4-phénylène bis-arylsulfonyl-pyrazole et l'isoxazole. Parmi ces composés, ceux ayant un cycle isoxazole ont montré une meilleure activité antimicrobienne que les composés portant une fraction pyrazole, en particulier, le composé **23** (figure I.13) qui a présenté d'excellentes activités antibactériennes et antifongiques, qui est identifié comme un agent antimicrobien prometteur [36].

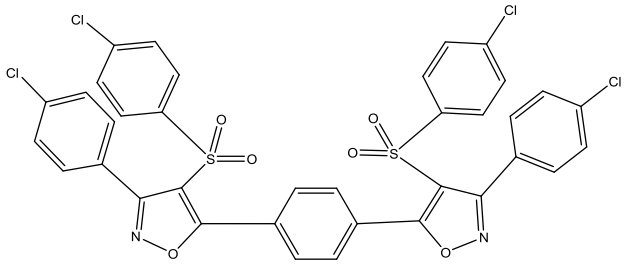


Figure I.13 1,4-bis(3-(4-chlorophényl)-4-((4-chlorophényl) sulfonyl)isoxazol-5-yl)benzène (23)

III.4.3. Agent anti-inflammatoire

La lipoxygénase (LOX) et la cyclooxygénase (COX) sont deux facteurs essentiels (enzymes) dans l'inflammation. Une série de dérivés contenant de l'isoxazole ont été synthétisés et leur activité anti-inflammatoire a été analysée via une inhibition de la LOX et de la COX. Le composé **24** de la figure I.14 inhibe significativement l'activité de LOX et COX. En outre, il a également montré une bonne inhibition sur la croissance de la tumeur in vitro et in vivo. Le résultat pharmacologique indique ce composé comme agent prometteur contre l'inflammation et le cancer [37].

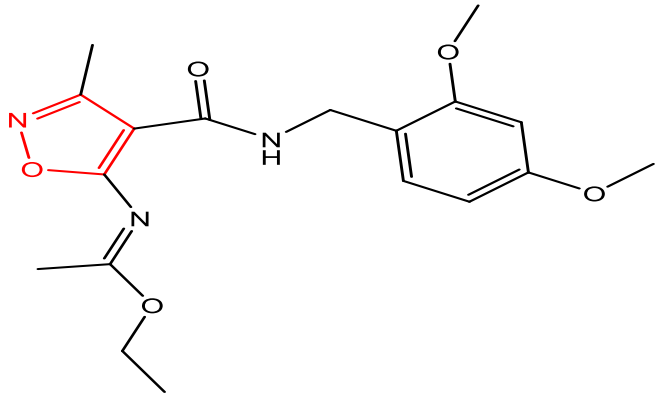


Figure I.14. (E)-N-(4-((2,4-diméthoxybenzyl)carbamoyl)-3-méthylisoxazol-5-yl) acétimidate d'éhyle (24)

Références bibliographiques

[1] I. Jioui, K. Danoun, A. Solhy, M. Jouiad, M. Zahouily, B. Essaid , C. Len, A. Fihri, Journal of Industrial and Engineering Chemistry 39 (2016) 218–225.

[2] S.J.Swamy et B. Kumar, India. J. Chimie. Sed, B, 35 N°5 (1996) 484-490.

[3] L. Allinger, P. Cava. R. Johnson. A. Lebel, L. Steven. Chimie Organique, Mc grawhill, Paris, vol 2 (1983) 534-551.

[4] G. Dévoré, 3ème édition, Chimie Crganique, les grandes fonctions simples paris librairie, 560-562.

[5] Li. Ronghi and G.L. Kenyon; J. Med. Chem.; 38 (1995) 5031 – 5037.

[6] F. Dorvault "L'office" XX1ère édition; Ed, Vigot (1982) 965-969.

[7] Shailendra Mandge, Hemendra P. Singh, S. Dutta Gupta and N.S. Hari Narayana Moorthy. Synthesis and Characterization of Some Chalcone Derivatives. Trends in Applied Sciences Research 2 1 (2007) 52-56.

[8] Benjamin Rioux. Synthèse et vectorisation de biomolécules type Chalcone en vue d'une application anticancéreuse. Thèse doctorat. Université de Limoges France, (2016).

[9] X.F. Wu, H. Neumann, A. Spannenberg, T. Schulz, H.J. Jiao, M. Beller, Journal of American Chemical Society, 132 (2010) 14596-14602.

[10] M.A. Selepe, F.R.V. Heerden, Molecules, 18 (2013) 4739-4765.

[11] S. Eddarir, N. Cotelle, Y. Bakkour, C. Rolando, Tetrahedron Letters, 44 (28) (2003) 5359-5363.

[12] O.G. Schramm, Multi-component Heterocycle Syntheses Based upon Sonogashira Coupling Isomerization (Dissertation), Ruprecht-Karls University, Heidelberg, Germany, 2006, p3.

[13] Caiding Xu , Guoying Chen & Xian Huang. CHALCONES BY THE WITTIG REACTION OF A STABLE YLIDE WITH ALDEHYDES UNDER MICROWAVE IRRADIATION, Organic Preparations and Procedures International: The New Journal for Organic Synthesis, 27(5) (1995) 559-561.

[14] Y.C. Mayur, G.J. Peters, V.V. Prasad, C. Lemo, N.K. Sathish, Curr. Cancer Drug Targets 9 (2009) 298-305.

[15] V.R. Soloman, C. Hu, H. Lee, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 7585-7592.

[16] K.V. Sashidhara, A. Kumar, M. Kumar, J. Sarkar, S. Sinha, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 7205-7212.

[17] M. Chen, T.G. Theander, S.B. Christensen, L. Hviid, L. Zhai, A. Kharazmi, Antimicrob. Agents Chemother. 38 (1994) 1470.

[18] N. Yadav, S.K. Dixit, A. Bhattacharya, L.C. Mishra, M. Sharma, S.K. Awasthi, V.K. Bhasin, Chem. Biol. Drug Des. 80 (2012) 340.

[19] S. Vogel, M. Barbic, G. Jürgenliemk, J. Heilmann: Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. European Journal of Medicinal Chemistry; 45(6): (2010) 2206-2213.

[20] T. Eicher, S. Hauptmann. The Chemistry of Heterocycles, Edition George Thieme Verlag Stuttgart-New York,1995, p179.

[21] Chimie Organique 3^{e} édition, B Pavlov et A. Térentiev p560-561.

[22] K. Ajay Kumar, P. Jayaroopa. "Pyrazoles : Synthetic Strategies and Their Pharmaceutical Application-An Overview", International Journal of Pharm. Tech. Research CODEN (USA):IJPRIF ISSN : 0974-4304; Vol.5 (2013) 1473-1486.

[23] L. Knorr, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 16 (1883) 2597-2603.

[24] R. LeBlanc, J. Dickson, T. Brown, M. Stewart, H.N. Pati, D. VanDerveer, H. Arman, J. Harris, W. Pennington, H.L. Jr. Holt, M. Lee. Synthesis ; 13(21) (2005) 6025-3604.

[25] C. Moureu, R. Delange, Bull. Soc. Chem. Fr, 25 (1901) 302-311.

[26] A. R. Katritzky, M. Wang, S. Zhang, M. V. Voronkov, *J. Org. Chem.*; 66 (2001) 6787.

[27] B. C. Bishop, K. M. Brands, A. D. Gibb, D. Kennedy, Synthesis; (2004) 43-47.

[28] E. Akbas; I. Berber, Euro. J. Med. Chem., 40 (2005) 401-406.

[29] I. Bouabdallah, L.A. M'Barek, A. Zyad, A. Ramdani, I. Zidane, A. Melhaoui," anticancer effect of three pyrazole derivatives", Nat. Prod. Res., vol. 20 (2006) 1024-1030.

[30] T.P. Selvam, P.V. Kumar, G. Saravanan, C.R. Prakash. Microwave-assisted synthesis, characterization and biological activity of novel pyrazole derivatives. J. Saudi. Chem. Soc. 18 (2014) 1015–1021.

[31] Soukaina ALAOUI , Synthèse innovante d'une nouvelle famille de sulfonamideisoxazoles, 1,2,3-triazoles et N-nucléosides par cycloaddition dipolaire-1,3 et des réactions tandem sous ultrasons: application en cancérologie , Thèse doctorat, Université Mohammed V faculté des science Rabat,Maroc,2017, P51-52.

[32] T. J. Nitz, D. L. Volkots, D. J Aldous, R. C. Oglesby. J. Org. Chem. ; 59 (1994) 5828-5835.

[33] Khattab, A. F. Liebigs Ann. 3(1996) 393-399.

[34] T.V Hansen, P. Wu, et V.V. Fokin. One-Pot Copper (I)-Synthèse Catalysée d'Isoxazoles 3,5-Disubstitués. The Journal of Organic Chemistry, 70 (19) (2005) 7761–7764.

[35] J. Shaw, B. Chen, J.P. Bourgault, et al. Synthesis and biological evaluation of novel N-phenyl-5-carboxamidyl isoxazoles as potential chemotherapeutic agents for colon cancer. Am. J. Biomed. Sci. 4 (2012) 14–25.

[36] G. Lavanya, L. Mallikarjuna Reddy, V. Padmavathi, A. Padmaja. Synthesis and antimicrobial activity of (1,4-phenylene) bis(arylsulfonylpyrazoles and isoxazoles). Eur. J. Med. Chem. 73 (2014) 187–194.

[37] M. Maczynski, J. Artym, M. Kocieba, I. Kochanowska, S. Ryng, M. Zimecki. Anti-inflammatory properties of an isoxazole derivative – MZO-2. Pharmacol. Rep. 68 (2016) 894–902.

Chapitre II : Partie expérimentale

I. Appareillages et techniques analytiques

I.1. Point de fusion

Les points de fusion des chalcones et des Pyrazoles et des isoxazoles ont été mesurés à l'aide d'un appareil digital de type **melting point apparatus SMP30** au laboratoire de chimie pharmaceutique de la faculté des sciences.

I.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La pureté des chalcones et des Pyrazoles et des isoxazoles a été contrôlée par chromatographie sur couche mince en utilisant des plaques prêtes à l'emploi en gel de silice de type 60 **F254** à support en aluminium. Les produits sont dissous dans le méthanol et l'acétate d'éthyle, l'éluant utilisé est un mélange de chloroforme – méthanol (3 ml / 13 gouttes). La révélation des produits a été effectuée en utilisant l'iode sublimé.

I.3. Spectroscopie infrarouge

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

I.4. Spectrophotométrie UV-Visible

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

II. Réactifs

Les solvants utilisés : l'éthanol, méthanol apportés par Honeywell, pour ce qui est du chloroforme, acétate d'éthyle, diéthylether, dimethylsulfoxyde (DMSO) sont apportés par SIGMA – ALDRICH.

Les réactifs utilisés : la 4-acétyl pyridine apporté par RIEDEL-DE HAEN AG SEELZE-HANNOVER, pour l'hydrazine hydrate, l'hydroxyde de sodium, hydroxylamine hydrochloride, aldéhydes aromatiques : benzaldéhyde, le 4-chlorobenzaldéhyde, le 4-hydroxybenzaldéhyde, le paraméthoxybenzaldéhyde sont apporté par SIGMA-ALDRICH, le N,N-dimethylbenzaldéhyde par ALDRICH, le 3-nitrobenzaldéhyde et le 4-nitrobenzaldéhyde par Fluka, le 2,6-dichlorobenzaldéhude par MERECK-Schuchardt et enfin l'acétate de sodium fabriqué par Panreac.

III. Manipulations

III.1 Synthèse des chalcones à partir de la 4-acétylpyridine

Dans un bécher de 300 mL, on introduit 0,02 mol d'un dérivé d'aldéhyde et 15mL d'éthanol ou de méthanol ensuite on lance l'agitation à température ambiante pendant 5 min et jusqu'à solubilisation totale dans le cas d'un aldéhyde solide.

On place le bécher dans un bain de glace et on ajoute une solution aqueuse de NaOH à 10% en maintenant l'agitation à 0 °C. Après quelques minutes, 0,02 mol (2.2 mL) de la 4-acétylpyridine sont ajoutés gouttes à gouttes pendant 10 min. Un solide se forme dès l'addition des premières gouttes et à la fin de l'addition de la 4-acétylpyridine le mélange réactionnel est laissé sous agitation magnétique pendant 1h à 0 °C puis 1h à température ambiante (voir le tableau II.1, Schéma II.1). Le produit formé est ensuite filtré et recristallisé si nécessaire. La pureté est contrôlée par la chromatographie sur couche mince (CCM).

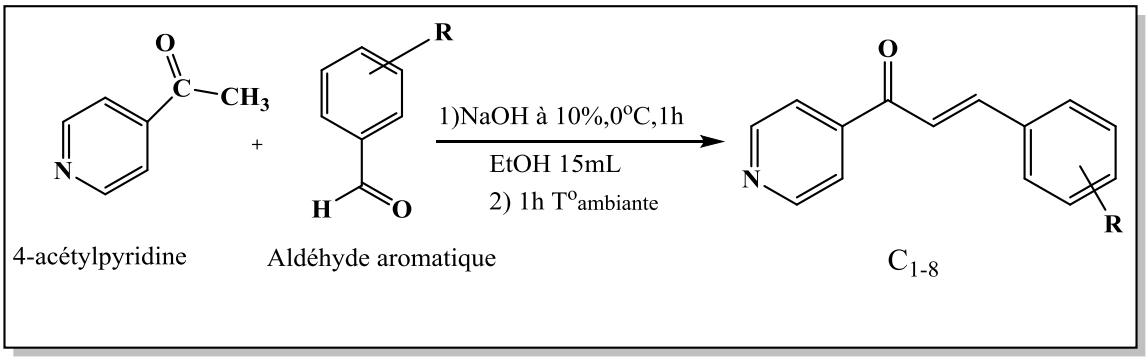


Schéma II.1 Mécanisme général de synthèse des chalcones à partir de la 4-acétylpyridine.

III.2 Synthèse conventionnelle des Pyrazoles à partir des chalcones

Dans un ballon de 50 mL surmonté d'un réfrigérant et muni d'une agitation magnétique, sont introduits 2mmol de la chalcone (dissoute dans 5ml d'éthanol), 0,164g d'acétate de sodium (2mmol), et 0,2 ml d'hydrazine hydrate (4mmol). Le mélange est porté au reflux pendant 3 à 6h (Voir le tableau II.1, Schéma II.2).A la fin de la réaction on ajoute de l'eau distillée glacée, le solide formé est filtré puis séché et recristallisé dans l'éthanol ou dans un mélange éthanol/eau si nécessaire. La pureté est contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM).

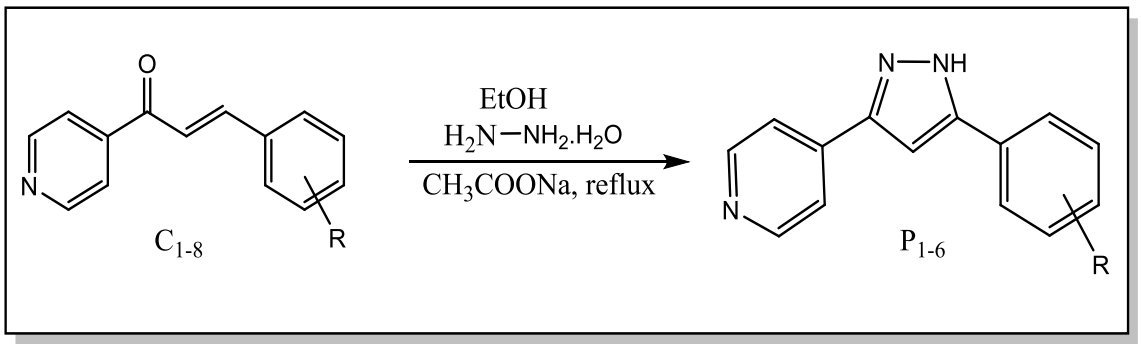


Schéma II.2 Mécanisme général de synthèse des Pyrazoles à partir des chalcones.

III.2 Synthèse conventionnelle des isoxazoles à partir des chalcones :

Dans un ballon de 50 mL surmonté d'un réfrigérant et muni d'une agitation magnétique, sont introduits 2mmol de la chalcone (dissoute dans 5mL d'éthanol), 0,33g d'acétate de sodium (4mmol) et 0,28 g d'hydroxylamine hydrochloride (4mmol). Le mélange est porté au reflux pendant 10 mn à 6h (voir le tableau II.1, Schéma II.3).

A la fin de la réaction on ajoute de l'eau distillée glacée, le solide formé est filtré puis séché et recristallisé à l'éthanol si nécessaire. La pureté est contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM).

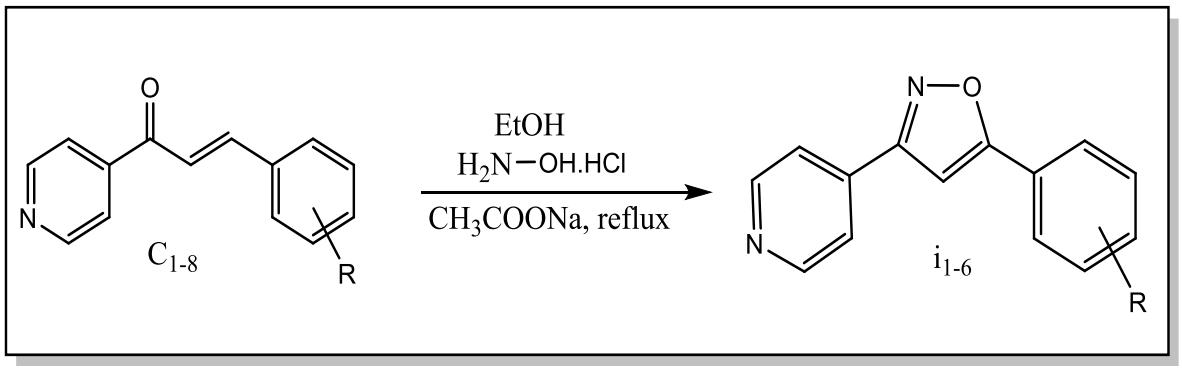


Schéma II.3 Mécanisme général de synthèse des isoxazoles à partir des chalcones.

Tableau II.1 : Temps de réaction des chalcones, Pyrazoles et des isoxazoles

Entrée	N° du composé	R	Durée
1	C1	H	2h
2	C2	4-Cl	2h
3	C3	2,6-$(Cl)_2$	2h
4	C4	4-N,N-$(CH_3)_2$	2h
5	C5	3-NO_2	2h
6	C6	4-NO_2	2h
7	C7	4-OCH_3	2h
8	C8	4-OH	2h
9	P1	4-Cl	4h
10	P2	2,6-$(Cl)_2$	3h
11	P3	4-N,N-$(CH_3)_2$	3h
12	P4	3-NO_2	6h
13	P5	4-NO_2	4h
14	P6	4-OCH_3	4h
15	i1	4-Cl	3h
16	i2	2,6-$(Cl)_2$	10 mn
17	i3	4-N,N-$(CH_3)_2$	3h
18	i4	3-NO_2	6h
19	i5	4-NO_2	4h
20	i6	4-OCH_3	3h

IV. Etude de l'activité biologique des Chalcones, des Pyrazoles et des isoxazole

IV.1 Activité antioxydante

IV.1.1 Principe

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

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

Cette réduction qui se traduit par une diminution de l'absorbance de la solution de DPPH˙ en présence d'antioxydant est suivie par spectrophotométrie à 517 nm par apport à un témoin d'antioxydant commercial.

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

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

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

A_1 : Absorbance à 517 nm de l'échantillon après une heure de temps.

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

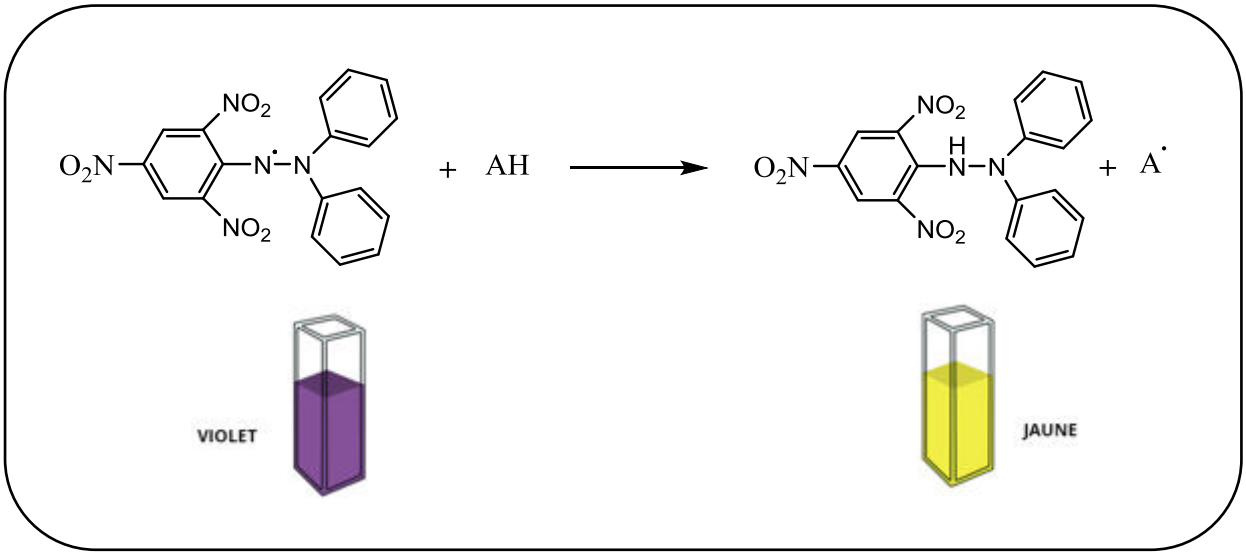


Schéma II.4 Mécanisme général de réduction de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH).

IV.1.2 Mode opératoire

Les produits testés sont préparés à des concentrations de 10^{-1} mol/L dans le DMSO puis dilués à un demi pour avoir des concentrations de 5×10^{-2} M ; $2{,}5\times 10^{-2}$ M ; $1{,}25\times 10^{-2}$ M et $6{,}25\times10^{-3}$ M. Quant à la solution de DPPH˙ , elle est préparée en solubilisant 4 mg de DPPH˙ dans 100 mL de méthanol.

Un volume de 40 µL, de chaque échantillon de chacune des concentrations est ajouté à 2 ml d'une solution de radicaux DPPH˙dissoute dans le méthanol. 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 517 nm.
Les résultats obtenus pour chaque produit testé sont comparés à ceux obtenus pour l'acide ascorbique pris comme contrôle positif.
Le blanc ou le standard est préparé à partir de 2 mL de la solution méthanolique du radical DPPH˙ et 40 µL de DMSO puis laissé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant une heure.

IV.1.3 Détermination de la CE 50 ou CI 50

La concentration efficace (CE 50) est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur de CE 50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. La concentration inhibitrice (CI 50) est estimée par extrapolation à % CR= 50% en traçant la courbe % CR en fonction de la concentration ou bien en utilisant la formule de la droite % CR en fonction de la [C], **y = a [C] + b**, où **a** est la pente de cette droite. Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux III.14-16 et illustrés dans les figures III.12-14 pour la chalcone C_8, les pyrazoles $P_{1\text{-}6}$, les isoxazoles $i_{1\text{-}6}$.

IV.2. Activité antibactérienne

IV.2.1 Choix et origines des souches bactériennes testées

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

- ✓ Bactéries à GRAM positif : ***Staphylococcus aureus ATCC 25923***
- ✓ Bactéries à GRAM négatif : ***Escherichia coli ATCC 25922 Pseudomonas aeruginosa ATCC 25922***

- ➢ *Escherichia coli* : C'est une bactérie intestinale GRAM négatif des Mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie. *E.coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aigues d'appareil urinaire [1].

- ➢ *Pseudomonas aeruginosa* : Ce sont des bacilles GRAM négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de flagelles, il s'agit de bactéries

résistantes pour plusieurs antibiotiques [1]. Elles sont responsables de 16 % des cas de pneumonie nosocomiale, 12 % des infections urinaires [2].

- *Staphylococcus aureus* : ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880. En 1883, Ogston a créé le nom «Staphylocoque» pour décrire ces grains groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin. Ce sont des coccis GRAM positif, de forme non sporulée, elles sont habituellement non capsulées ou possèdent des capsules limitées et se développent uniquement en anaérobiose [3,4].

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

IV.2.2 Repiquage

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

IV.2.3 Confirmation des souches bactériennes

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

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

IV.2.4 Réalisation de l'antibiogramme

IV.2.4.1 Préparation de l'inoculum

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

IV.2.4.2 Ensemencement et dépôt des disques

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

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

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

IV.3 Lecture des antibiogrammes

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

- Non sensible (-) pour le diamètre moins de 8mm [3].
- Sensible (+) pour un diamètre entre 9 à 14 mm [3].
- Très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15 à 19 mm [3].
- Extrêmement sensible (+ + +) pour un diamètre supérieur à 20 mm [3].

References bibliographiques

[1] PERCIVAL, SL. Microbiolog of water bornediseases. Elsevier Academicn Press, (2004) 480.

[2] VAN DELDEN, C, IGLEWSKI, BH. Cell-to-cellsignalin and Pseudomonas aeruginosa infections. Energ Infect Dis, 4 (1998) 551.

[3] AVRIL. J. L., DABERNAT. H., DENIS. F., MONTEIL. H. Bactériologie clinique. 2ème édition. 3 (1992) 9.

[4] DWORK, MM., Falkows. Microbes at work : From wastes to resources. Ed. New York : springer, (2006) 1248.

[5] Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). 7ème édition. (2014) 22.

Chapitre III : Résultats et discussions

I. Introduction

Les chalcones occupent une place importante parmi les produits naturels, ce sont des Intermédiaires clés dans la biosynthèse des flavonoïdes [1-4] et d'autre hétérocycles biologiquement actifs tel que les Pyrazoles, les thiazoles et d'autres. Elles peuvent être obtenues par condensation aldolique de dérivés comportant un groupement acétyle et d'aldéhydes aromatiques (par catalyse acide ou basique).dans ce travail, nous avons synthétisé dans un premier temps une série de composées chalcones dérivés de la 4-acétylpyridine via la condensation de Claisen-Schmidt sur les dérivés de benzaldéhyde en présence d'un catalyseur basique tel l'hydroxyde de sodium, dont on a obtenu une sélectivité totale vers ces composés chalcones. La deuxième étape de ce travail consiste sur la condensation de ces cétones α, β-insaturées ou chalcones obtenues avec les dérivés binucléophiles, hydrazine et hydroxylamines qui a conduit à deux séries de composés hétérocycliques pyrazoles et isoxazoles avec des rendements satisfaisants.

II. Synthèse des chalcones à partir de la 4-acétyl pyridine

Afin d'optimiser les conditions les plus concevables et les plus rentables de la réaction, nous avons réalisé plusieurs tests en faisant varier les conditions réactionnels selon ce qui a été reporté dans la littérature sur l'acétophénone et les dérivés 2-et 3- acétylpyridine [5-7]. Nous avons initié la synthèse de la chalcone en faisant réagir le N,N-diméthylbenzaldéhyde avec la 4-acétylpyridine en milieu alcoolique à température ambiante ou à reflux pendant un temps, en présence de l'hydroxyde de sodium ou l'hydroxyde de potassium comme base selon la condensation de Claisen-Schmidt élaborée dans le schéma III.1. Après plusieurs tests, nous sommes arrivés à conclure que la 4-acétylpyridine réagit différemment à l'acétophénone. La chalcone se forme lorsqu'on ajoute la 4-acétylpyridine goutte à goutte sur le mélange alcoolique (éthanol ou méthanol) contenant l'aldéhyde et NaOH aqueux à 10 %.

La pureté des composés (C_{1-8}) est confirmée par CCM et leurs structures sont identifiées par leur point de fusion et les différentes techniques d'analyses ; spectrophotométrie UV-Visible et infrarouge IR et comparées aux valeurs reportées dans la littérature pour certains composés.

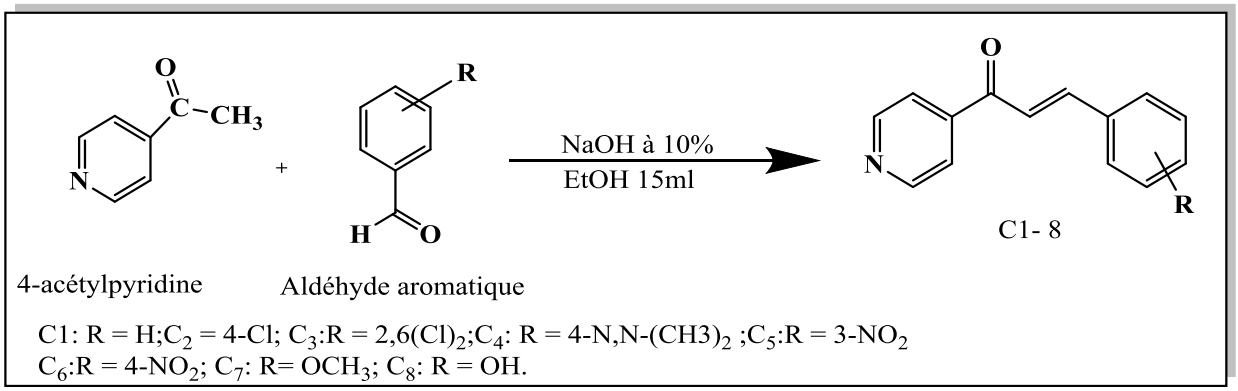


Schéma III.1 Synthèse des chalcones à partir de la 4-acétyl pyridine.

Les propriétés physico-chimiques de ces produits sont données dans le tableau III.1 ci-dessous. La durée de réaction pour toutes les chalcones était de 2 heures.

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

Composé	R	Aspect	Rdt Exp	Rdt litt [réf]	Pf °C Exp	Pf litt [réf]
C1	H	Poudre fine jaune pâle	62%	-	72-74	-
C2	4-Cl	Poudre cristalline vert pâle	72%	52 % [7]	143-145	134-135 [7]
C3	2,6-$(Cl)_2$	Poudre très fine blanc cassé	70%	-	100-102	-
C4	4-N, N-$(CH_3)_2$	Poudre fine cristalline orange	65%	77% [6]	119-123	122 [6]
C5	3-NO_2	Poudre très fine blanc cassé	69%	-	180-183	-
C6	4-NO_2	Poudre fine grise	80%	50 % [7]	168-172	187-190 [7]
C7	4-OCH_3	Poudre cristalline jaunâtre	73%	72% [8]	115-117	104-106 [8]
C8	4-OH	Poudre marron foncé	36%	-	187-190	-

II.1. Mécanisme de réaction

Le mécanisme de la réaction de Claisen Schmidt passe d'abord par la formation de l'entité énolate formée par déprotonation d'un hydrogène en alpha du carbonyle de la 4-acétylpyridine par l'ion hydroxyde fournit par la base NaOH. L'énolate ainsi formée se condense sur le carbonyle de l'aldéhyde pour donner un composé β-hydroxycétone qui se déshydrate sous l'effet de la température en une cétone α, β insaturé E ou chalcone désirée (Schéma III.2)

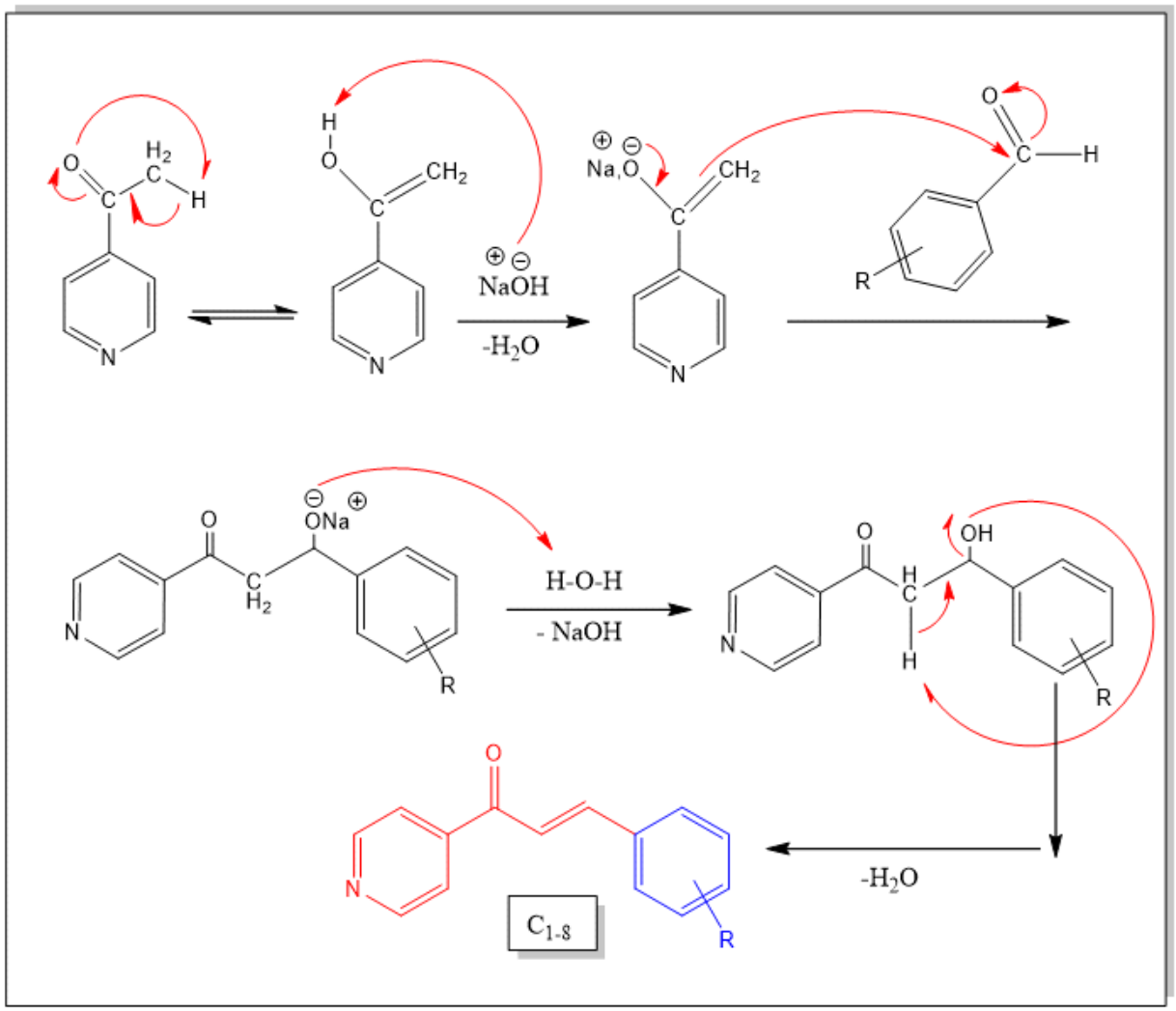


Schéma III.2 Mécanisme réactionnel de la Synthèse des chalcones

II.2. Diastéréoisomérie Z/E, calcul théorique de l'énergie de stabilité

Les Cétones α,β-insaturées peuvent exister sous deux formes diastérioisomères Z et E. Dans la plus part des cas, le stéréo-isomère E est le plus majoritaire. Afin de déterminer

théoriquement l'isomère le plus stable obtenu dans chaque cas des molécules C_{1-8}, nous avons réalisé des calculs théoriques d'enthalpie de formation de ces composés en utilisant le logiciel **Chem3D 16.0** et avec la méthode semi empirique PM3 **[9]**, les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau III.2 ci-dessous.

Tableau III.2 Calcul d'énergie des composés chalcones

		ΔH_f (Kcal/mol)	
Composés	**R**	**E**	**Z**
C1	H	37,83	41,51
C2	4-Cl	32,37	35,73
C3	$2,6(Cl)_2$	30,92	31,59
C4	N, $N(CH_3)_2$	36,34	36,55
C5	$3\text{-}NO_2$	30,18	33,34
C6	$4\text{-}NO_2$	30,51	33,33
C7	$4\text{-}OCH_3$	-0,54	03,87
C8	4-OH	-7,55	-03,01

La stabilité la plus grande correspond à la valeur d'enthalpie la plus faible. D'après les résultats enregistrés par le logiciel, le stéréo-isomère **E** est le plus stable pour toute la série des chalcones synthétisées.

II.3. Résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) des chalcones en utilisant comme éluant un mélange de deux solvants chloroforme-méthanol (3 ml / 13 gouttes) a révélé la présence d'une seule tache pour tous les produits (**C_{1-8}**), les R_f calculés sont représentés dans le tableau III.3 ci-dessous.

Tableau III.3 Rapports frontaux des différentes chalcones C_{1-8}.

Composé	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Rf	0,6	0,75	0,74	0,87	0,6	0,38	0,7	0,45

II.4. Analyse par spectrophotométrie UV-Visible

L'analyse par spectrophotométrie UV-Visible réalisée pour les chalcones synthétisées dans le DMSO à une concentration de $3x10^{-5}$ M, montre deux bandes dans le domaine UV. La

première apparait entre 265-277 nm d'une faible intensité qui ne peut être attribuée qu'au groupement imine (C=N, aromatique) de la pyridine [10] et la deuxième très intense à 286-354 nm attribuable au groupement carbonyle (C=O). A titre d'exemple, le spectre UV-vis du composé C1 (figure III.1_a) montre une petite bande fine à 268 nm et une autre plus intense et plus large à 313 nm.

Les spectres de l'analyse par spectrophotométrie UV-Visible des composés C_{2-4}, C_{6-8} sont donnés en annexe dans les figures III.1_{b-g}, et les valeurs des bandes enregistrées sont donnée dans le tableau III.4.

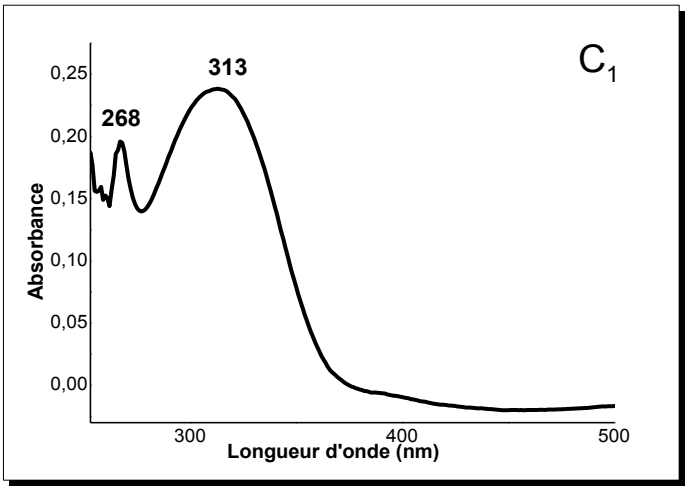


Figure III.1_a Spectre UV-visible du composé C1 dans le DMSO

Tableau III.4 Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible des composés C_{1-8}

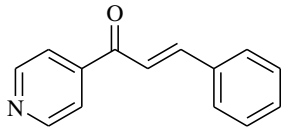
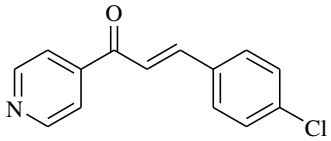
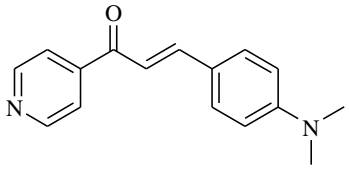
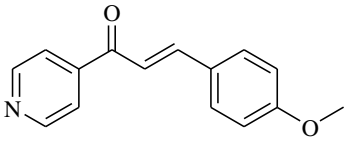
Composés	λ abs (nm)
C_1	268 π-π* 313 π-π*
C_2	268 π-π* 319 π -π*
C_3	269 π-π* 296 π -π*
C_4	251 π-π* 340 π-π*
C_5	Insoluble dans le DMSO
C_6	277 π-π* 347 π -π*
C7	268 π-π* 354 π -π*
C8	265 π-π* 286 π -π*

II.5. Analyse par spectroscopie IR

Les spectres infrarouges sont représentés en annexe figures III.2_{a-d}.

Sur les spectres infrarouges des composés (C_1, C_2, C_4, C_7), on note l'apparition de la fréquence de vibration caractéristique de la fonction cétone (C=O) et l'apparition d'une bande caractéristique de la liaison HC=CH (trans) ce qui confirme la formation des cétones α,β-insaturées (chalcones synthétisées). Les principales bandes obtenues sont données dans le tableau III.5.

Tableau III.5 Résultats de la spectroscopie IR des chalcones

Composé	Nombre d'onde cm^{-1}	Nombre d'onde cm^{-1} littérature [réf]
C1	1663 (C=O); 1570 (C=N); 1446 (HC=CH); 762 (C-H Vibration de flexion d'un cycle benzénique, 5H adjacents). 	-
C2	1661 (C=O) ; 1586 (C=N,); 1486 (HC=CH); 803 (C-H Vibration de flexion d'un cycle benzénique substitué en para, 2H adjacents) ; 680 (C-Cl). 	1684(C=O) ;1601(C=N) ; 1492 (HC=CH) ; 750 (C-Cl) [**11,12**]
C4	2900 (C-H, Ar); 2793 (C-H, ali, CH_3); 1656 (C=O); 1587 (C=N, pyr); 1523 (HC=CH) ; 1229 (C-N) ; 808 (C-H Vibration de flexion d'un cycle benzénique substitué en para, 2H adjacents). 	-
C7	2947 (C-H, ar); 2841 (C-H, ali, CH_3); 1659 (C=O) ; 1586 (C=N) ; 1510 (HC=CH); 989 (C-O-C); 802 (C-H Vibration de flexion d'un cycle benzénique substitué en para, 2H adjacents) 	2916(C-H, ar); 2838(C-H, ali,CH_3) ;1684(C=O ; 1596(HC=CH) ;1512(C=N) ; 1141 (C-O-C) **[11]**

III. Synthèse des Pyrazolines/Pyrazoles à partir des chalcones

Les pyrazolines constituent une classe importante des composés hétérocycliques. Leur structure est constituée de deux atomes d'azote adjacents et trois atomes de carbone formant un motif hétérocyclique à cinq chaînons avec un carbone asymétrique en position 5. Il n'a qu'une seule double liaison endocyclique à caractère basique [13].

Trois formes tautomères de la pyrazoline sont susceptibles de se former (Figure III.3), la 2-pyrazoline est la forme tautomère de pyrazoline la plus stable [13]. Les composés de ce type sont les plus fréquemment étudiés. À partir de l'analyse aux rayons X, la structure de 2-pyrazoline a une conformation d'enveloppe.

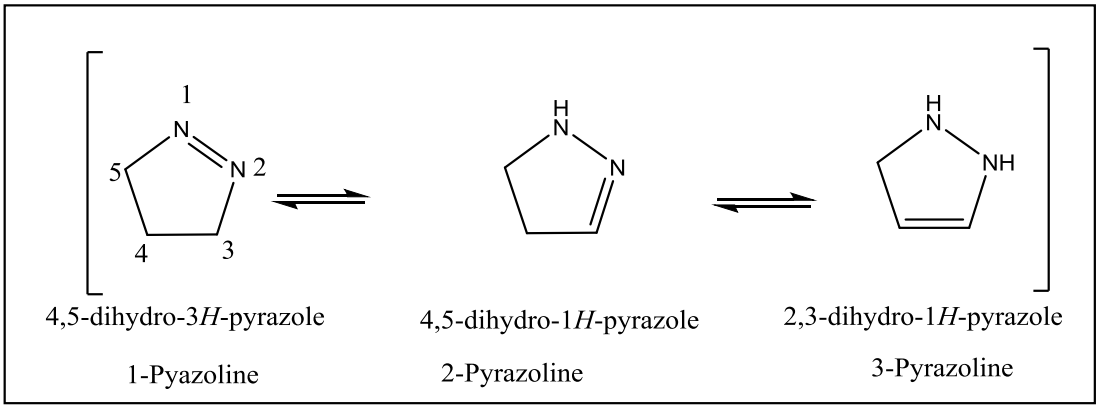


Figure III.3 Formes tautomères de la pyrazoline

Les 2-pyrazolines sont insolubles dans l'eau en raison de leur caractère lipophile à cause de leur faible basicité, mais solubles dans le propylène glycol et dans les acides concentrés, formant des sels instables qui se dissocient lors de l'addition de l'eau. Ces composés présentent d'intéressantes propriétés biologiques, telles que: l'activité antibactérienne et antifongique qui sont évaluées dans ce travail afin d'étudier la relation structure-activité. Les pyrazoles sont obtenues par oxydation des pyrazolines.

Après plusieurs tests réalisés pour arriver à un mode opératoire rentable, reproductible et facile à mener, nous avons pu synthétiser une série de nouvelles pyrazoles par la cyclisation des cétones α,β-insaturées dérivées de la 4-acétylpyridine préalablement synthétisées, avec l'hydrazine.

Nous avons initié notre travail en utilisant des quantités équimolaires des deux réactifs chalcones et hydrazine hydrate, au reflux de l'éthanol et sans présence de catalyseur. Après plusieurs heures de reflux, aucun produit ne s'est formé. Nous avons donc cherché à modifier les conditions expérimentales afin d'obtenir des résultats meilleurs et reproductibles.

L'action de deux équivalents d'hydrazine hydrate sur un équivalent d'une chalcone **C_{1-8}** dans l'éthanol en présence d'un équivalent d'acétate de sodium, conduit à la formation d'un seul produit noté **P** après un chauffage à reflux pendant 3 à 6 h et addition d'eau distillée glacée (voir le schéma III.3 et le tableau III.6). Après recristallisation, la pureté de ces produits a été vérifiée par la CCM et les propriétés physico-chimiques de ces derniers sont données dans le tableau III.6 ci-dessous.

Les structures sont identifiées par les techniques d'analyse ; spectrophotométrie UV-Visible et infrarouge IR.

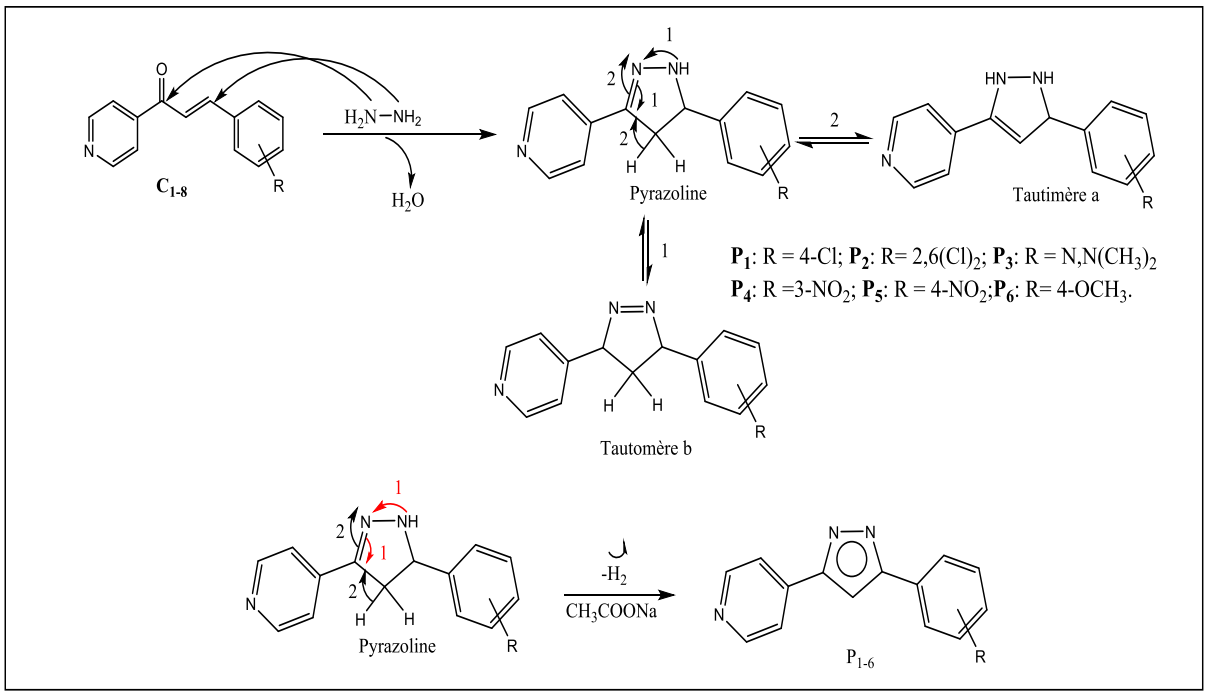


Schéma III.3 Synthèse des pyrazoles à partir des chalcones

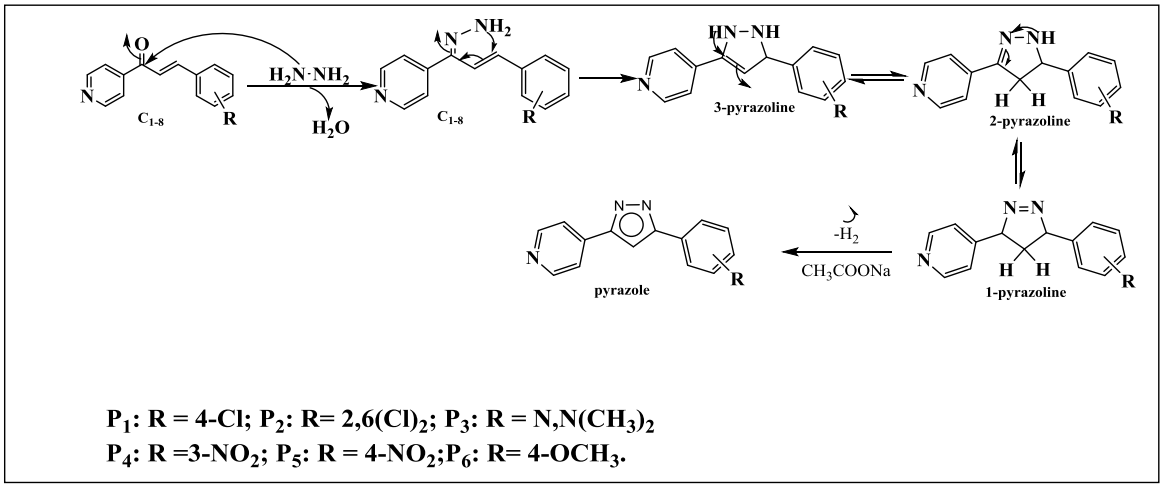
Tableau III.6 Résultats et propriétés physico-chimiques des chalcones obtenus.

Composé	R	Temps (h)	Aspect et couleur	Rdt	Pf °C
P_1	4-Cl	4	Poudre cristalline Jaune pâle	82%	152-155
P_2	2,6-$(Cl)_2$	3	Poudre marron clair	66%	107-109
P_3	4-N,N-$(CH_3)_2$	3	Poudre fine jaunâtre	72%	262-266
P_4	3-NO_2	6	Poudre jaunâtre	91%	108-109
P_5	4-NO_2	4	Poudre marron	19%	105-107
P_6	4-OCH_3	4	Poudre jaune pâle	64%	110-113

III.1. Mécanisme réactionnel

Le mécanisme réactionnel de la formation du noyau 2-pyrazoline/pyrazole dépend de type de l'hydrazine utilisée (substituée ou non) ainsi que la nature des solvants employés et le catalyseur. En milieu alcoolique et en présence de l'hydrazine hydrate on obtient une pyrazoline avec un hydrogène labile sur l'atome d'azote. Le mécanisme passe par deux étapes : la première consiste en une formation de l'imine et la deuxième conduit à la réaction de cyclisation pour former un cycle à cinq chaînons (noyau 2-pyrazoline). D'autre part, si l'hydrazine utilisée est monosubstituée, la pyrazoline formée sera alkylée, quel que soit le solvant employé et le mécanisme passe par les mêmes étapes citées précédemment. Le schéma III.4, présente les deux étapes.

L'utilisation d'une base minérale forte (NaOH, CH_3COONa …etc) conduit à la libération d'une molécule d'hydrogène et la formation d'une pyrazole.



P_1: R = 4-Cl; P_2: R= 2,6(Cl)$_2$; P_3: R = N,N(CH$_3$)$_2$
P_4: R =3-NO$_2$; P_5: R = 4-NO$_2$;P_6: R= 4-OCH$_3$.

Schéma III.4. Mécanisme réactionnel de synthèse des pyrazoles.

III.2 Résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) des Pyrazoles en utilisant un éluant constitué d'un mélange de solvants chloroforme-méthanol (3 ml / 13 gouttes) a révélé la présence d'une seule tache pour tous les produits (**P_{1-6}**) avec des R_f représentés dans le tableau III.7 ci-dessous.

Tableau III.7 Rapports frontaux des différents produits.

Composé	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5	P_6
R_f	0,49	0,63	0,88	0,51	0,83	0,55

III.3 Analyse par spectrophotométrie UV-Visible

L'analyse par spectroscopie UV-Visible des pyrazoles synthétisées P_{1-6} est réalisée dans le DMSO comme solvant et à une concentration de $6{,}25x10^{-5}$ M. Les spectres enregistrés montrent l'apparition de deux bandes d'intensités différentes ; la première ayant la plus grande intensité est observé à 236 nm correspondant au chromophore C=N du noyau pyridinique [10] et la 2^{éme} moins intense allant de 319 à 396 nm qui ne peut être attribuée qu'au groupement C=N (imine) des pyrazoles.

Dans les composés P_{1-6}, on remarque que l'absorbance de la bande correspondant à la fonction C=N de la pyridine est plus intense que celle C=N (imine) de la pyrazole contrairement aux composés (C_{1-4}, C_{6-8}) dans lesquels on observe une forte absorption de la fonction C=O par rapport à la fonction C=N du noyau pyridine, cependant le spectre UV-Visible ne peut différentier entre les deux spectres.

Les spectres de l'analyse par spectrophotométrie UV-Visible des composés P_{1-6} sont donnés dans les figures III.4$_{a-f}$. (Voir annexe) et les valeurs des bandes enregistrées sont données dans le tableau III.8.

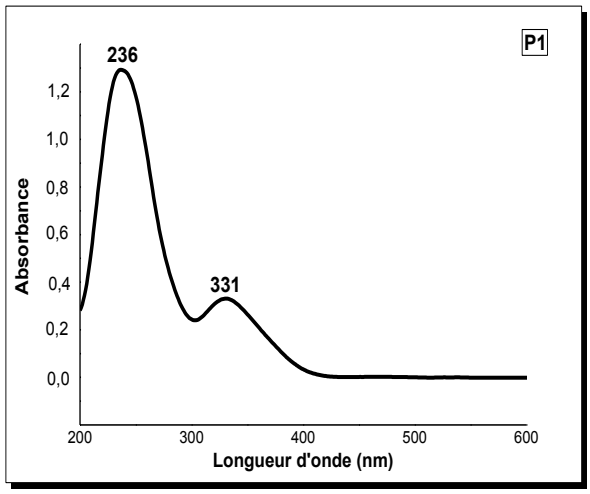


Figure III.4$_a$ Spectre UV-Visible du composé **P_1** dans le DMSO

Tableau III.8 Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible des composés P_{1-6}

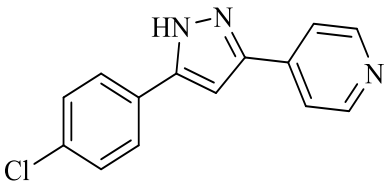
Composés	λ abs (nm)
P_1	236 π-π* 331 π-π*
P_2	236 π-π* 331 π-π*
P_3	235 π-π* 325 π-π* 396 π-π*
P_4	236 π-π* 319 π-π*
P_5	236 π-π* 375 π-π*
P_6	236 π-π* 343 π-π*

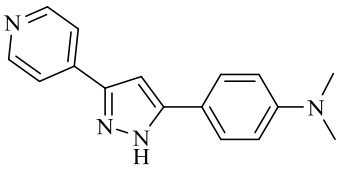
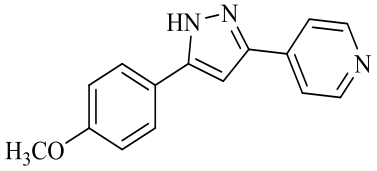
III.4 Analyse par spectroscopie IR

Les spectres infrarouges enregistrés pour les composés P_1, P_3 et P_6 sont représentés en annexe figures III.5_{a-c}. Sur ces spectres, on note la disparition de la fréquence de vibration caractéristique de la fonction vinyle (C=C) et du carbonyle (C=O) et l'apparition de deux nouvelles bandes attribuables aux vibrations d'élongation (C=N) et (C-N), ce qui atteste la formation du cycle pyrazoles. Les principales bandes obtenues sont données dans le tableau III.9. [14, 15,16]

L'absence du pic caractéristique de C-H hybridé sp^3 du noyau pyrazoline, indique que la réaction a donné la formation d'une pyrazole. [16]

Tableau III.9 Résultats de spectroscopie IR des pyrazoles

Composés	**Nombre d'onde (cm^{-1})**
P1	3277 (N-H); 2903 (C-H, Ar); 1689 (C=N, pyraz); 1598 (C=N, pyridine); 1489 (HC=CH); 1214 (C-N). 

P3	2908 (N-H); 2798 (C-H, Ar); 1594 (C=N, pyraz); 1549 (C=N, Pyridine); 1360 (HC=CH); 1226 (C-N). 
P6	3343 (N-H) ; 2957 (C-H, Ar) ; 1607 (C=N, pyraz) ; 1592 (C=N, pyridine) ; 1538 (HC=CH); 1243 (C-N) 

La structure exacte des composés $P_{1\text{-}6}$ sera confirmée par l'analyse spectrométrie de masse et par spectroscopie RMN du ^{1}H, ^{13}C (1D et 2D).

IV. Synthèse des Isoxazoles à partir des chalcones

Depuis quelques années, l'intérêt de préparer les dérivés d'isoxazole n'a cessé de croître, cela étant lié à leurs diverses applications en synthèse organique, ainsi qu'à leurs vertus avérée dans plusieurs domaines notamment en pharmacie, biologie, médecine, agriculture et aussi dans l'industrie [17].

En s'inspirant du mode opératoire de préparation des isoxazoles développé par Seham Y. Hassan [18], nous avons procédé à la préparation des dérivés de l'isoxazole incorporé dans une structure contenant également le motif pyridine et un aryle et ce à partir des chalcones et l'hydroxyle amine hydrochloride en présence d'acétate de sodium.

D'une manière problématique, nous n'avions pas pu obtenir les isoxazoles en travaillant dans une quantité équimolaire de la chalcone et de l'hydroxylamine hydrochloride et l'acétate de sodium. Après avoir déterminé les conditions optimales pour la synthèse des isoxazoles en travaillant avec un équivalent de la chalcone et 2 équivalents d'hydroxylamine hydrochloride et d'acétate de sodium et cela dans le but de neutraliser le sel généré par l'HCl et favorisé la précipitation du composé isoxazole à l'ajout de l'eau distillé glacée à la fin de la réaction .

Nous avons généralisé ce procédé à la synthèse d'une série d'isoxazoles en changeant les substrats de départ (Chalcones $C_{2\text{-}3\text{-}4\text{-}5\text{-}6\text{-}8}$).

La pureté des composés est confirmée par CCM et leurs structures sont identifiées par les différentes techniques d'analyse ; spectrophotométrie UV-Visible et infrarouge IR.

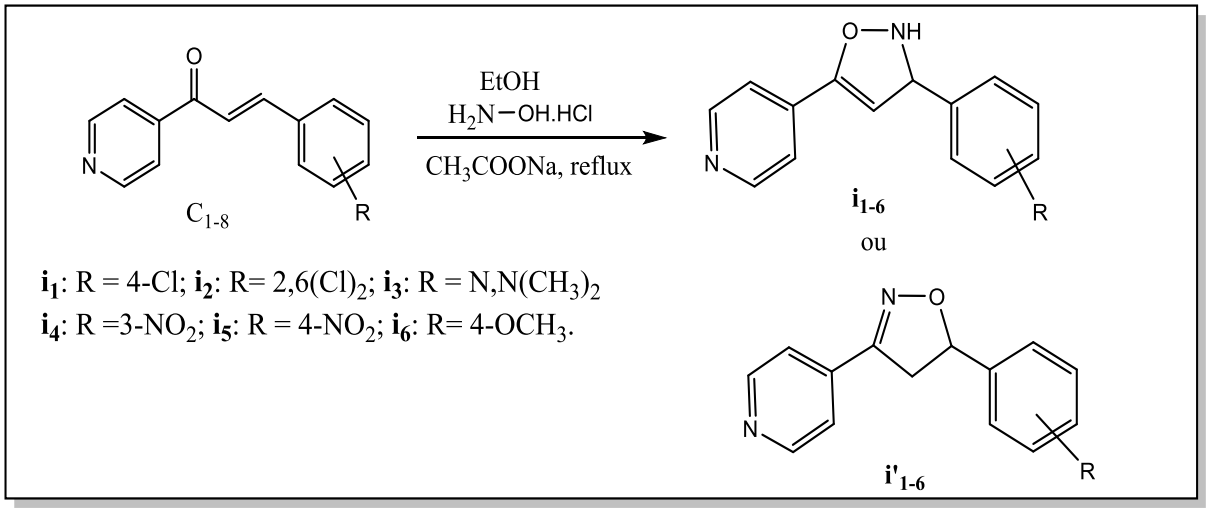


Schéma III.5 Synthèse des Isoxazoles à partir des chalcones.

Les propriétés physico-chimiques de ces produits sont données dans le tableau III.10 ci-dessous.

Tableau III.10 Résultats et propriétés physico-chimiques des chalcones obtenus.

Composé	R	Temps (h/min)	Aspect et couleur	Rdt	Pf °C
i_1/i'_1	4-Cl	3h	Poudre cristalline blanche	20%	182-185
i_2/i'_2	2,6-$(Cl)_2$	10 min	Poudre blanche	38%	183-184
i_3/i'_3	4-N,N-$(CH_3)_2$	3h	Poudre fine orange	79%	100-104
i_4/i'_4	3-NO_2	6h	Poudre jaune cacahouète	97%	104-107
i_5/i'_5	4-NO_2	4h	Poudre cristalline marron chocolat	53%	118-120
i_6/i'_6	4-OCH_3	3h	Poudre cristalline blanche	21%	125-127

IV.1 Mécanisme réactionnel

Compte tenu des résultats, nous pouvons dans notre cas envisager deux structures possibles :

Deux sites d'attaques nucléophiles A et B peuvent être envisagés et chaque cas conduit à une structure isoxazole.

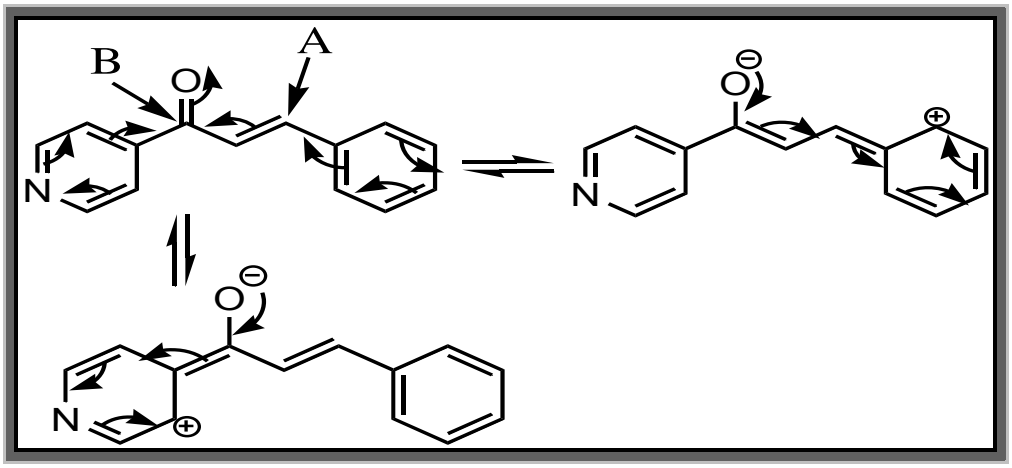


Figure III.6 Sites d'attaques nucléophiles et les structures de résonance possibles des chalcones $C_{1\text{-}8}$

Comme l'oxygène est électronégatif, la densité électronique autour du groupement C=O est très élevée et le carbone de ce carbonyle serait très électrophile. En effet, la présence du noyau aromatique est en faveur d'une extension de la délocalisation qui implique les doublets de **O** et de la liaison π de l'oléfine en alpha du carbonyle. Cette délocalisation des liaisons π avec le carbonyle est aussi possible du côté de la pyridine mais pas avec la liaison oléfinique. L'augmentation de la densité électronique autour du groupement C=O, laisse supposer l'attaque d'abord sur le site B ensuite sur le A et formation des composés **$i_{1\text{-}6}$.**

Pour pouvoir expliquer ce mécanisme, affirmer le premier site d'attaque nucléophile et déduire la structure de l'isoxazole probable des études théoriques qui portent sur le calcul de charges de Mulliken des atomes de la chalcone et de l'hydroxylamine, en utilisant le logiciel ORCA et avec la méthode DFT B3LYP / 6-311G ** [19-20] ont été réalisés. La figure III.7 présente les charges de chaque atome des molécules participant à la réaction.

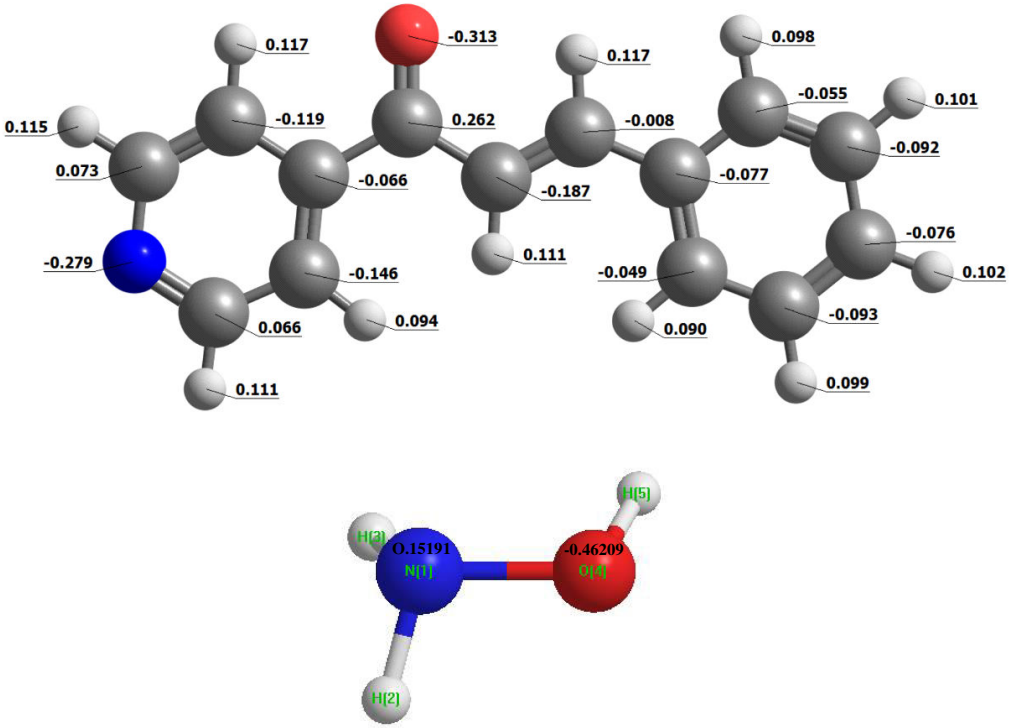


Figure III.7 Charges partielles des atomes de la chalcone et de l'hydroxylamine dans de l'éthanol à l'aide de la méthode du logiciel ORCA.

Les résultats montrent que l'atome de carbone du carbonyle (site B) est plus électropositif que celui de la liaison éthylénique en béta du carbonyle (site A) et que l'oxygène de l'hydroxylamine est plus électronégatif que l'atome d'azote, ce qui suggère que la réactivité de l'hydroxylamine débute par l'addition des doublets non liants de OH sur le carbonyle B ensuite le doublet de l'atome d'azote s'additionne sur A suivi par une déshydratation pour donner les isoxazoles $\mathbf{i_{1\text{-}6}}$ selon le mécanisme montré dans le schéma III.6).

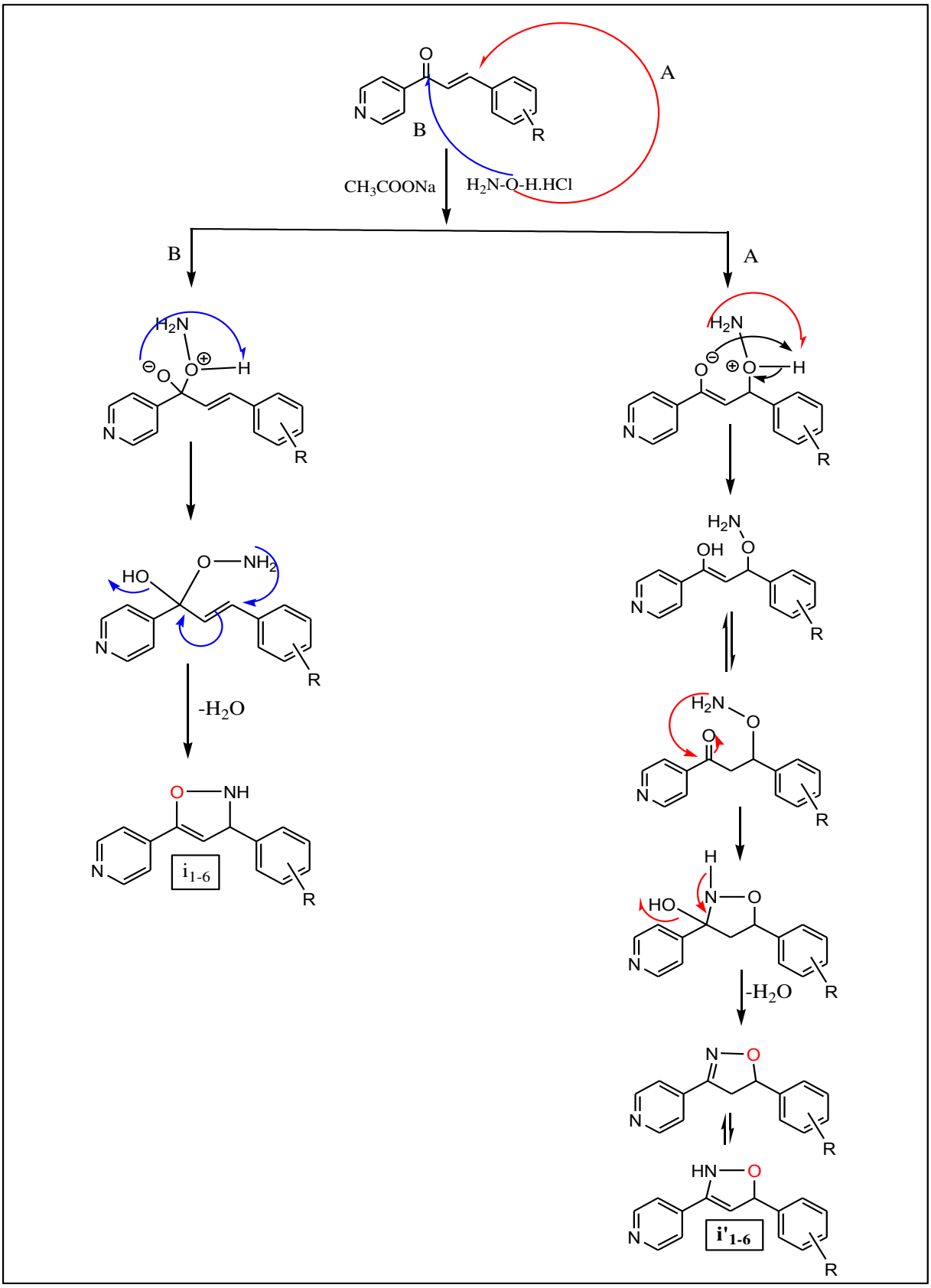


Schéma III.6 Mécanisme réactionnel de synthèse des isoxazoles

IV.2 Résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) des Isoxazoles en utilisant un éluant constitué d'un mélange de solvants chloroforme-méthanol (3 ml / 13 gouttes) a révélé la présence d'une seule tache pour tous les produits ($\mathbf{i_{1\text{-}6}}$) avec des R_f représentés dans le tableau III.11 ci-dessous.

Tableau III.11 Rapports frontaux des différents produits.

Composé	i_1/i'_1	i_2/i'_2	i_3/i'_3	i_4/i'_4	i_5/i'_5	i_6/i'_6
R_f	0,43	0,27	0,61	0,24	0,30	0,51

IV.3 Analyse par spectrophotométrie UV-Visible

L'analyse par spectroscopie UV-Visible des isoxazoles synthétisées $i_{1\text{-}6}$ montre l'apparition de deux bandes d'intensité différente pour les i_1, $i_{3\text{-}6}$; la première allant de 235 à 239 nm et la 2 ème allant de 312 à 320 nm caractéristiques des noyaux pyridine et isoxazole [10,21] .

Les spectres de l'analyse par spectrophotométrie UV-Visible des composés $i/i'_{1\text{-}6}$ sont donnés dans les figures III.$8_{a\text{-}f}$ (voir annexe).

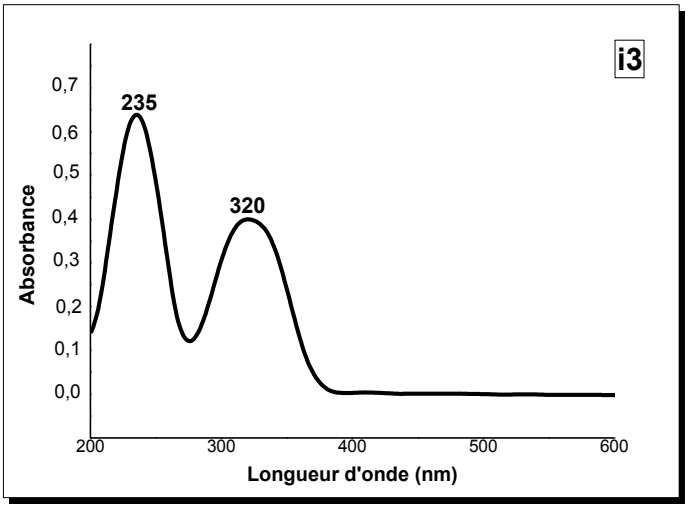


Figure III.8_c Spectre UV-Visible du composé i/i'3 dans le DMSO

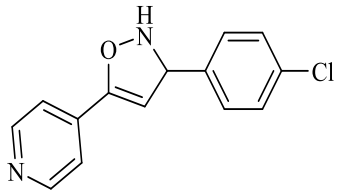
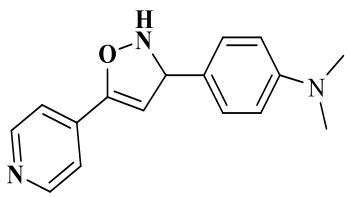
Tableau III.12 Résultats de la spectrophotométrie UV-Visible des composés i_{1-6}

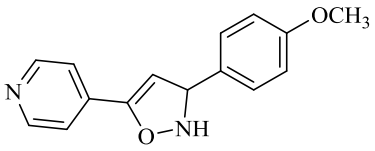
Composés	λ abs (nm)
i_1/i'_1	237 π-π* 320 π-π*
i_2/i'_2	286 π-π*
i_3/i'_3	235 π-π* 320 π-π*
i_4/i'_4	239 π-π* 318 π-π*
i_5/i'_5	236 π-π* 317 π-π*
i_6/i'_6	236 π-π* 312 π-π*

IV.4 Analyse par spectroscopie IR

Les spectres infrarouge des composés (i/i'**1**, i/i'**3**, i/i'**6**) sont représentés en annexe figures III.9_{a-c}. Sur ces spectres IR on note la disparition de la fréquence de vibration caractéristique de la fonction vinyle (C=C) et de (C=O) et l'apparition de nouvelles bandes attribuables aux vibrations d'élongation (C-O) et (C-N) pour les composés i_1, i_3, i_6, ce qui atteste la formation du cycle isoxazole. Les principales bandes obtenues sont données dans le tableau III.13. [15, 16, 22]

Tableau III.13 Résultats de spectroscopie IR des chalcones isoxazoles

Composé	Nombre d'onde cm^{-1}
i_1	2975 (N-H); 2933(C-H, Ar) 2818 (C-H, isoxazole) ; 1598 (C=N); 1550(HC=CH, isoxazole) ; 1250 (C-O) ; 1101 (C-N) ; 753 (N-H secondaire, OOP (γ)) 
i_3	3129(N-H) ;2983(C-H, Ar);2899(C-H, isoxazole);2797(C-H, ali,CH_3) ;1660 (C=N); 1595 (HC=CH, isoxazole) ; 1225 (C-O) ;1164 (C-N) ; 724 (N-H secondaire, OOP (γ)). 

i_6	3557(N-H); 3002(C-H, Ar); 2965(C-H,ali,CH_3); 2839 (C-H, isoxazole) ; 1598 (C=N); 1509 (HC=CH) ;1244(C-O, isoxazole) ; 1174 (C-O-C) ;1109 (C-N); 773 (N-H secondaire, OOP (γ)). 

V. Activité biologique

V.1. Activité antioxydante des chalcones, des pyrazoles et des isoxazoles

L'activité antioxydante des chalcones dérivés de la 4-acétylpyridine, des pyrazoles et des isoxazoles synthétisés à partir de ces chalcones n'a jamais été décrite dans la littérature, il nous a donc paru intéressant d'évaluer leur activité antioxydante.

Aucune activité antioxydante n'est observée pour les chalcones C_{1-7}, ceci est probablement dû à l'absence de substituants donneurs de radicaux libres H˙. Par contre dans le cas du composé C_8 (chalcone substituée en para par un -OH), le mécanisme principal d'action a été le piégeage du radical libre par le transfert d'un H ˙ sur le DPPH˙ subséquemment transformé en une molécule stable DPPH-H.

La Densité Optique des produits testés ainsi que la référence utilisée, Acide Ascorbique (AA), en fonction de la concentration sont représentés dans la figure III.10_{a-b} Cette représentation illustre bien que le produit **C_8** présente une activité antioxydante envers le radical DPPH. Les pyrazoles et les isoxazoles s'avèrent très actifs. Le pourcentage de capture du radical DPPH˙ (CR %) ou le pourcentage d'inhibition est calculé par l'équation (1) (voir chapitre II).

Après avoir tracé le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration (tableaux III.14-16 ; figures III.$11_{a-n)}$, nous avons calculés la valeur d'IC50 par la méthode des moindres carrés pour chaque composé, les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux III.17-19 pour le standard Acide Ascorbique (AA), les chalcones, les pyrazoles et les isoxazoles respectivement.

D'après les résultats, le composé **C_8** montre une très bonne activité antioxydante. En effet, son pourcentage d'inhibition est de 100 % pour les concentrations **10^{-1} M et 5×10^{-2} M.**

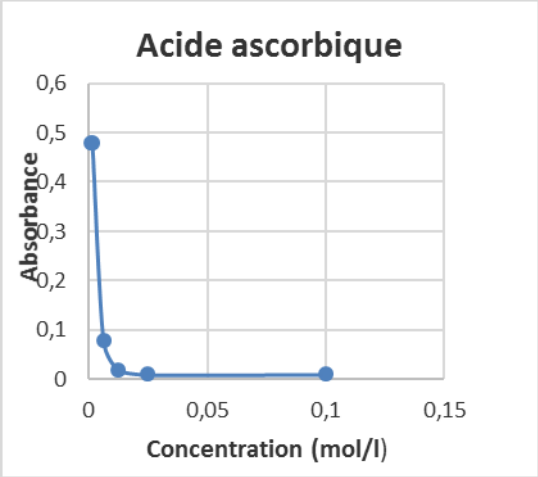


Figure 10$_a$ Densité Optique en fonction de la concentration de l'acide ascorbique

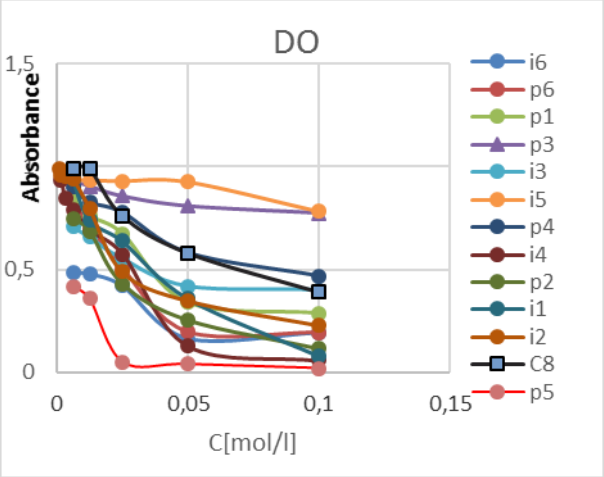


Figure 10$_b$ Densité Optique en fonction de la concentration des composés C_8, P_{1-6}, i_{1-6}

Tableau III.14 Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH du Composé C_8 et de l'acide ascorbique

pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH			
Concentration		C_8	AA
C0	0,1	100,00	100
C1	0,05	100,00	100
C2	0,025	76,00	100
C3	0,0125	58,00	99
C4	0,00625	39,00	98
C5	0,003125		95,28
C6	0,0015625		84,8

Tableau III.15 Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des Composés P_{1-6} et de l'acide ascorbique

		Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH						
Concentration		P_1	P_2	P_3	P_4	P_5	P_6	AA
C0	0,1	70,42	88,10	20,62	52,04	36	80,11	100
C1	0,05	65,09	73,90	17,07	40,37	5	79,90	100
C2	0,025	30,76	55,83	12,14	20,11	4	47,99	100
C3	0,0125	22,07	29,60	7,15	15,07	2	26,93	99
C4	0,00625	13,10	23,35	4,60	7,64		14,12	98
C5	0,00313							95,28
C6	0,00156							84,8

Tableau III.16 Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des Composés i_{1-6} et de l'acide ascorbique

		Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH						
Concentration		i_1	i_2	i_3	i_4	i_5	i_6	AA
C0	0,1	94,00	99,00	58,86	93,95	19,62	80,15	100,00
C1	0,05	64,00	96,00	57,09	86,83	5,09	80,11	100,00
C2	0,025	62,00	95,00	43,20	41,08	4,64	56,68	100,00
C3	0,0125	36,00	94,00	32,55	29,34	3,81	50,80	99,00
C4	0,00625	8,00	80,00	27,43	18,80	3,62	50,20	98,00
C5	0,003125		49,00		13,3905			95,28

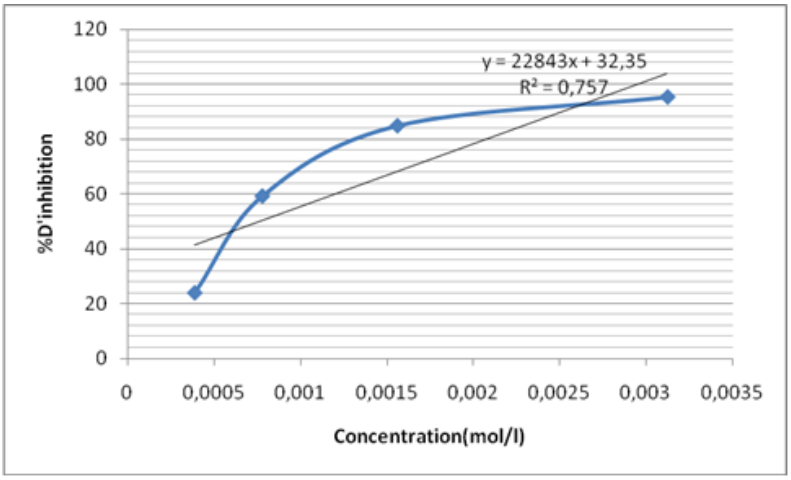


Figure III.11$_a$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH˙ de l'acide ascorbique

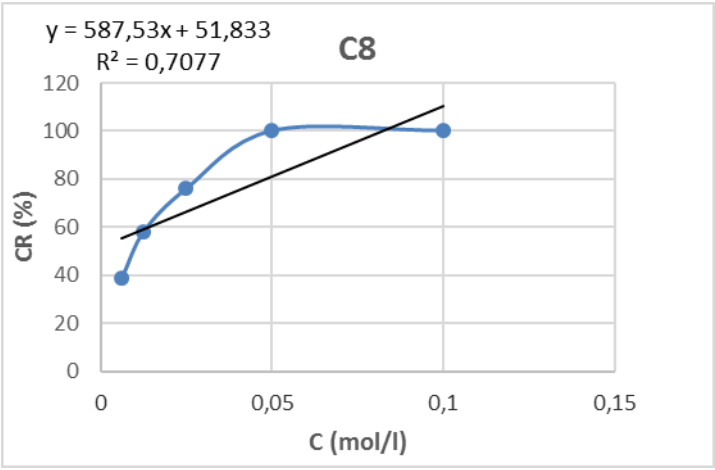


Figure III.11$_b$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH˙ du Composé C_8

Contrairement aux molécules mères (chalcones dérivées de la 4-acétylpyridine), les pyrazoles P_1, P_2 et P_6 montrent une très bonne activité antioxydante ; proche de celle de l'acide ascorbique pris comme référence à la concentration de $\mathbf{10^{-1}}$ **M**. Les pourcentages d'inhibition des composés sont illustrés dans les figures III.$11_{c\text{-}h}$ (Voir annexe). En effet leur pourcentage d'inhibition est de 88 %, 82 %, 71 % respectivement à la concentration $\mathbf{10^{-1}}$ **M** et de **75 %, 80 %, 66 %** respectivement à la concentration $\mathbf{5\times10^{-2}}$ **M**, ceci pourrait avoir un lien avec la présence d'un H sur la fonction amine (N-H) du noyau pyrazole, susceptible d'être capturé sous forme d'un H˙.

Les pourcentages d'inhibition trouvés pour les isoxazoles $\mathbf{i_1}$, $\mathbf{i_2}$, $\mathbf{i_4}$ **et** $\mathbf{i_6}$ à la concentration de $\mathbf{10^{-1}}$ **M** sont de 94 %, 99%, 93 % et 79 %, respectivement. Ces résultats montrent que ces composés présentent une très bonne activité antioxydante, et restent encore efficace à la concentration $\mathbf{5\times10^{-2}}$ **M** (96 % pour i2 et 97% pour i4) ceci est dû à la présence d'un H labile de la fonction (N-H) capturé sous forme d'un radical H˙ par le DPPH. Les % CR en fonction de la concentration des isoxazoles $\mathbf{i_{1\text{-}6}}$ sont donnés dans les figures III.$11_{i\text{-}n}$. (Voir annexe). A l'inverse, les isoxazoles $\mathbf{i_3}$ **et** $\mathbf{i_5}$ sont moins efficace, en effet leur pourcentage d'inhibition est réduit dès la concentration $\mathbf{10^{-1}}$ **M** (53 % pour i_3 et 19 % pour i5).

Tout comme les pyrazoles les composés $\mathbf{i_{1\text{-}6}}$ possèdent une activité antioxydante contrairement aux molécules mères.

V.1.2 Détermination de la CE 50 ou CI 50

Les pourcentages du DPPH ˙ résiduels en fonction des concentrations des échantillons, nous permettent d'obtenir la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration de DPPH ˙ initiale à 50%. Cette valeur est appelée la concentration efficace (**CE**) pour réduire la moitié des radicaux libres DPPH ˙, Plus la valeur de CI50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. Afin de comparer leurs pouvoirs antioxydants les résultats obtenus sont représentés dans les figures III.12-14.

Tableau III.17 La valeur de la CI 50 du composé C_8 et de l'acide ascorbique

Composés	CI 50 %(mol/l) x 10^{-3}	CI 50 % (mg/ml)
C_8	10	2,25
AA	0,77	0,1356

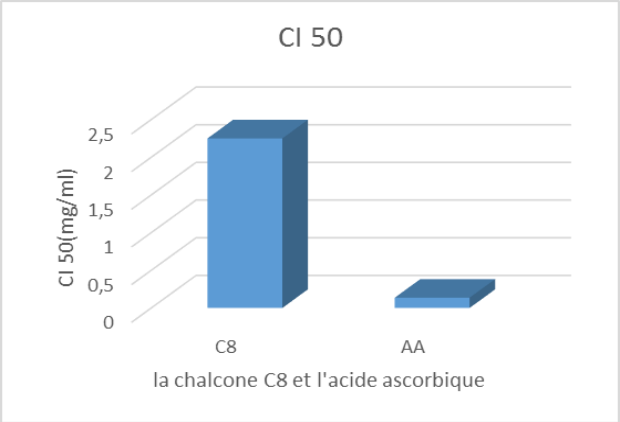


Figure III.12 Valeur de la CI50 du composé C_8 et de l'acide ascorbique (AA)

Tableau III.18 Les valeurs des CI50 des composés P_{1-6} et de l'acide ascorbique

Produits	CI 50 % (mol/L) x 10^{-3}	CI 50 % (mg/ml)
P_1	54,3	13,9590
P_2	32,5	9,4585
P_3	270	71,8613
P_4	87,7	23,5120
P_5	143,8	38,5522
P_6	39	9,8717
AA	0,77	0,1356

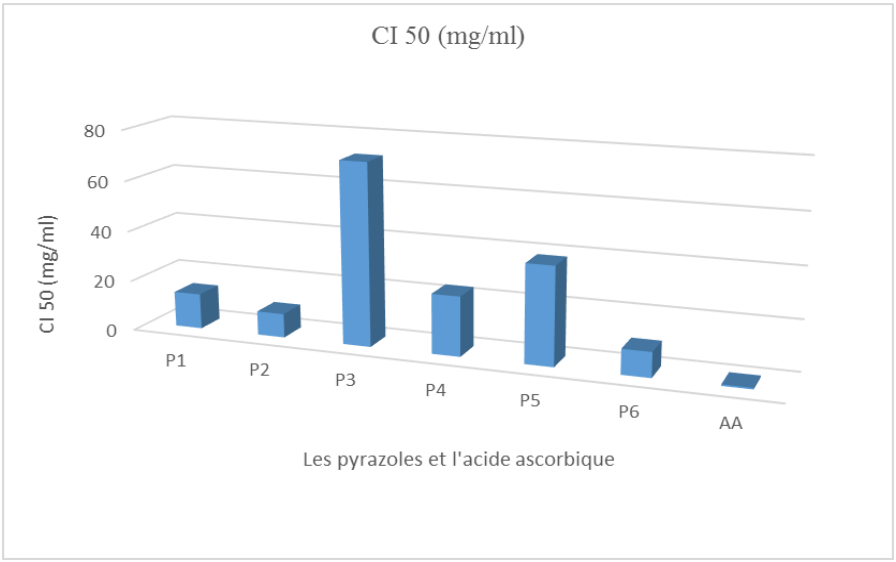


Figure III.13 Valeurs des CI 50 des composés P_{1-6} et de l'acide ascorbique (AA)

Tableau III.19 Les valeurs des CI 50 des composés i_{1-6} et de l'acide ascorbique

Produits	CI 50 % (mol/L) x10^{-3}	CI 50 % (mg/ml)
i_1	34,5	8,9029
i_2	3,42	0,9986
i_3	57,5	15,3603
i_4	38	10,2250
i_5	290	78,0332
i_6	12,5	3,1763
AA	0,77	0,1356

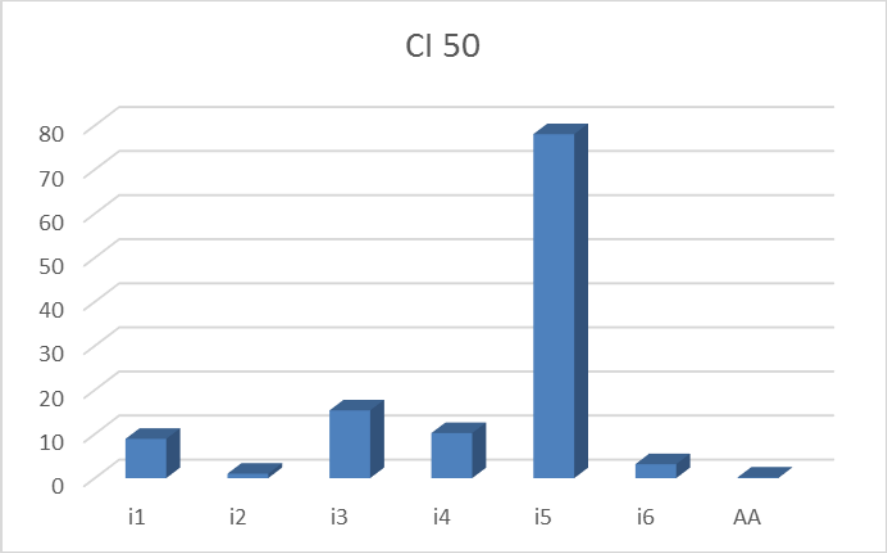


Figure III.14 Valeurs des CI 50 des composés i_{1-6} et de l'acide ascorbique (AA)

V.3 Activité antibactérienne des chalones, des pyrazoles et des isoxazoles

La lecture des antibiogrammes se fait par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques. La sensibilité aux différents produits est classée selon le diamètre des zones d'inhibition**.** Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau III.20 et illustrés dans la **Figure III.15.**

Tableau III.20 Diamètre des zones d'inhibition des chalcones

Diamètre des zones d'inhibition en mm			
Souches bactériennes Produits	*Staphylococcus aureus* (GRAM +)	*Escherichia coli* (GRAM -)	*Pseudomonas aeruginosa* (GRAM -)
C_1	27 +++	9 +	9 +
C_2	22 +++	10 +	6 -
C_3	26 +++	9 +	9 +
C_4	6 -	6 -	9 +
C_5	14 +	6 -	6 -
C_6	22 +++	6 -	6 -
C_7	13 +	6 -	6 -
C_8	6 -	6 -	6 -
ATB	Rif 5 20 +++	CAZ 30 21 +++	CL 25 30 +++

Rif 5: Rifampicine 5µg

CAZ 30: Ceftazidime 30µg

CL 25 : Colistine 25µg

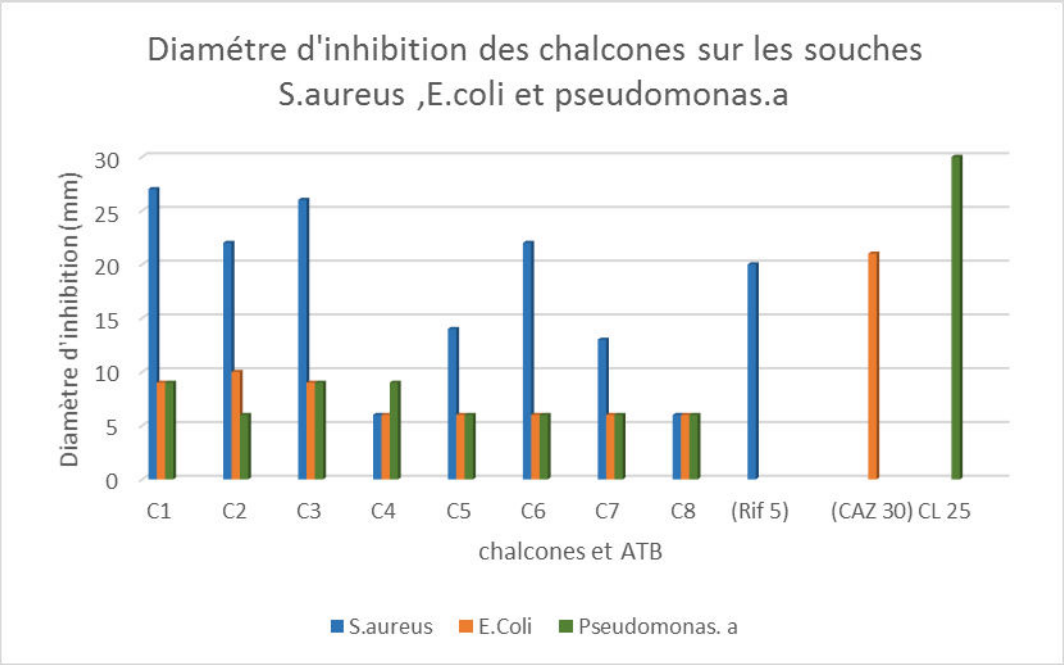


Figure III.15 Diamètre des zones d'inhibition des composés C_{1-8}

D'après les résultats de l'étude *in vitro* obtenus, les souches bactériennes se comportent différemment vis-à-vis des produits testés. A l'exception des produits C_4 et C_8 qui n'ont donné aucune activité, les chalcones dérivées de la 4-acétylpyridine présentent une très bonne activité antibactérienne vis-à-vis de la souche *staphylococcus aureus*, (supérieure à celle de l'antibiotique de référence (Rif 5) pour les composés C_{1-3} et C_6). Par contre la bactérie *Escherichia Coli* s'est avérée résistante à la majorité des produits testés mis à part **C_{1-3}** auxquels elle s'est montrée sensible.

En ce qui concerne la souche *Pseudomonas aeruginosa* les composés C_1, C_3, C_4 ont montrés une légère activité antibactérienne contrairement aux autres composés dont leur activité est négative.

Les résultats enregistrés pour les pyrazoles sont résumés dans le tableau III.18 et illustrés dans la **Figure III.16.** Toutes les pyrazoles synthétisées à l'exception des produits P_3 et P_5 présentent une excellente activité, supérieure à celle de l'antibiotique de référence (Rif5) vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus*. Par contre, la souche bactérienne *Escherichia Coli* s'est révélée résistante pour toutes les pyrazoles.

Tableau III.21 diamètre des zones d'inhibition des pyrazoles

Diamètre des zones d'inhibition en mm		
Souches bactériennes Produits	*Staphylococcus aureus* (GRAM +)	*Escherichia coli* (GRAM -)
P_1	27 +++	6 -
P_2	27 +++	6 -
P_3	6 -	6 -
P_4	27 +++	6 -
P_5	6 -	6 -
P_6	23 +++	6 -
ATB	Rif 5 20 +++	CAZ 30 21 +++

Rif 5: Rifampicine 5µg

CAZ 30: Ceftazidime 30µg

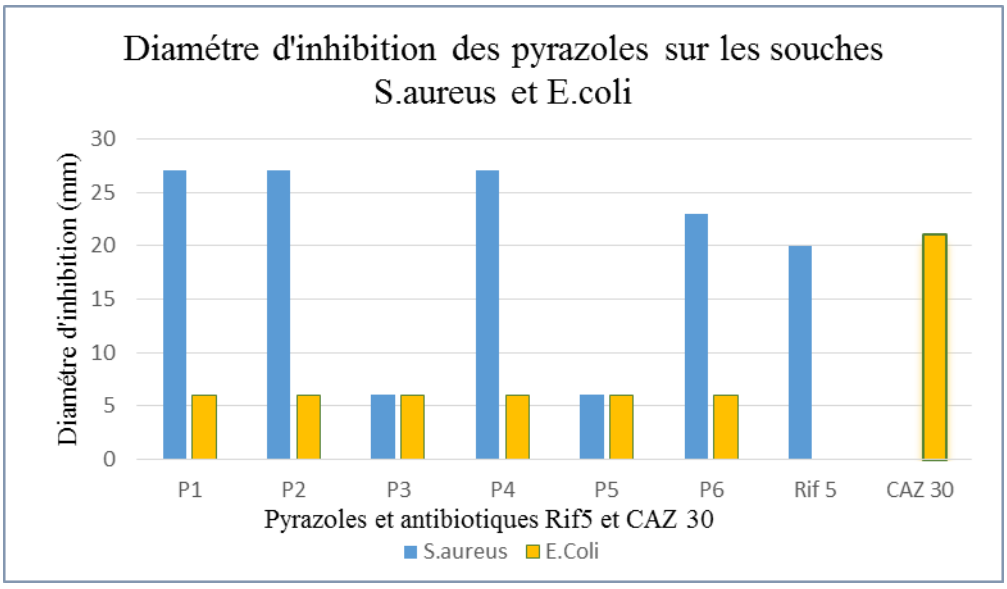


Figure III.16 Diamètre des zones d'inhibition des composés $P_{1\text{-}6}$

Dans le cas des isoxazoles, les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau III.19 et illustrés dans la figure III.17. Les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ce sont révélées résistantes pour tous les produits à l'exception du composé $\mathbf{i_2}$ qui présente une activité bactérienne similaire à celle de l'antibiotique de référence vis-à-vis du *Staphylococcus aureus.*

Tableau III.22 Diamètre des zones d'inhibition des isoxazoles

Diamètre des zones d'inhibition en mm		
Souches bactériennes Produits	*Staphylococcus aureus* (GRAM +)	*Escherichia coli* (GRAM -)
i_1	6 -	6 -
i_2	20 +++	6 -
i_3	6 -	6 -
i_4	6 -	6 -
i_5	6 -	6 -
i_6	6 -	6 -
ATB	Rif 5 20 +++	CAZ 30 21 +++

Rif 5: Rifampicine 5µg

CAZ 30: Ceftazidime 30µg

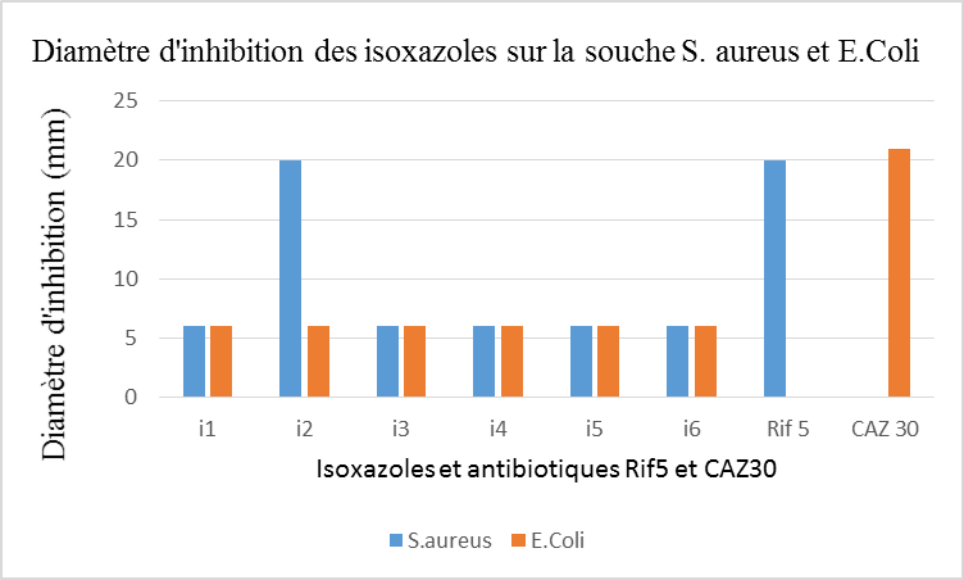


Figure III.17 Diamètre des zones d'inhibition des composés $i_{1\text{-}6}$

Conclusion

L'activité antibactérienne a été déterminée sur trois souches bactériennes pour les chalcones et sur deux souches uniquement pour les pyrazoles et les isoxazoles selon la méthode de diffusion de disques.

Les chalcones dérivés de la 4-acétyle pyridine composés **C** et les pyrazoles composés **P** possèdent une très bonne activité antimicrobienne contre les souches à GRAM positif *Staphylococcus aureus* et résistantes vis à vis des souches à GRAM négatif *Escherichia coli.* Par contre dans le cas des isoxazoles **i,** les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ce sont révélées résistantes pour tous les produits à l'exception du composé $\mathbf{i_2}$ qui présente une activité antibactérienne similaire à celle de l'antibiotique de référence vis-à-vis du *Staphylococcus aureus.*

L'activité antioxydante de ces composés évaluée par la méthode de DPPH, montrent que les chalcones ne possédant pas de groupement donneur de radical proton, cependant ne présentent aucune activité. Par contre leurs dérivés pyrazoles et isoxazoles montrent une très bonne activité.

Références bibliographiques

[1] Inamori Y, Baba K, Tsujibo H, Taniguchi M, Nakata K, Kozawa M. Antibacterial activity of two chalcones, xanthoangelol and 4-hydroxyderricin, isolated from the root of Angelica keiskei KOIDZUMI. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo); 39 (1991) 1604–1605.

[2] D.N. Dhar The Chemistry of Chalcones and Related Compounds Wiley, New York (1981) pp. 213.

[3] Bohn, B.A. Introduction to Flavonoids. Amsterdam, Harwood Academic (1998).

[4] Akihisa T, Tokuda H, Hasegawa D, Ukiya M, Kimura Y, Enjo F, Suzuki T, Nishino H. Chalcones and other compounds from the exudates of Angelica keiskei and their cancer chemopreventive effects. J. Nat. Prod.; 69 (2006) 38–42.

[5] Reem. S. Najem. Synthesis of some pyrimidine derivatives from-4- acetyl pyridine, Tikrit Journal of Pure Science 23 (3) (2018) 48-55.

[6] Zeinab H. Ismail. Reactivity of 1,3-diarylpropenones towards some nucleophilic reagents and screening of the biological activity of the products. J Am Sci 97 (2013) 465-475.

[7] Shadab Alam, Rakesh Panda , Monica Kachroo. Anti-tubercular, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity of some newly synthesized chalcones. Indian Journal of Chemistry Vol. 53B, 4 (2014) 440-443.

[8] Anu Agarwal, Kumkum Srivastava, S. K. Purib and Prem M. S. Chauhana. Synthesis of 2, 4, 6-trisubstituted pyrimidines as antimalarial agents. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 13 (2005) 4645–4650.

[9] ChemOffice 16.0, Chem Draw, Chem 3D, (2017).

[10] E. B. HUGHES, H. H. G. JELLINEK, B. **A.** AMBROSE. Pyridine ultraviolet absorption spectrum and dissociation constant.1 (1949) 410 – 414.

[11] Shadab Alam, Rakesh Panda, Monica Kachroo. Anti-tubercular, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity of some newly synthesized chalcones. Indian journal of chemistry, 4 (2014) 440-443.

[12] Monica Kachroo, Rakesh Panda,Yadavendra Yadav. Synthesis and biological activities of some new pyrimidine. Der Pharma Chemica, 6(2) (2014) 352-359

derivatives from chalcones

[13] Fernando.B, David .G. L, Luis.M. A , Ibon, A , José.E. *StructChem*. 24 (**2013**) 421-432.

[14] Sharshira, EM, et Hamada, NMM. Synthèse et évaluation antimicrobienne de certains dérivés du pyrazole. Molecules, 17 (5) (2012) 4962-4971.

[15] Padmavathi, V., B. Reddy, A. Balaiah, K. Reddy et D. Reddy. Synthèse de certains pyrazoles et isoxazoles fondus. Molecules, 5 (12) (2000) 1281-1286

[16] R. M. SILVERSTEIN, G. C. BASSLER AND T. C. MORRILL. Spectrometric identification of organic compounds (Fifth Edition). Wiley, New York, 1991.

[17] Soukaina Alaoui, Synthèse innovante d'une nouvelle famille de sulfonamideisoxazoles,1,2,3-triazoles et N-nucléosides par cycloaddition dipolaire-1,3 et des réactions tandem sous ultrasons: application en cancérologie. (2017) 154-155.

[18] Seham Y. Hassan. Synthesis, Antibacterial and Antifungal Activity of Some New Pyrazoline and Pyrazole Derivatives. Molecules 18 (2013) 2683-2711.

[19] F. Neese. “The ORCA program system" Wiley interdisciplinary Reviews - Computational Molecular Science, 2 (2012) 73–78

[20] F. Neese, Calculation of the zero-field splitting tensor on the basis of hybrid density functional and Hartree-Fock theory, J. Chem. HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979324"Phys. 127(16) (2007) 164112-164119.

[21] Carlos Bustos, Elies Molins, Juan-Guillermo Cárcamo, Marcelo N. Aguilar, Christian Sánchez, Ignacio Moreno-Villoslada, Hiroyuki Nishide, Angela Mesías-Salazar, Ximena Zarate and Eduardo Schott. New 3,4,5-trisubstituted isoxazole derivatives with potential biological properties. New Journal of Chemistry ; New J. Chem, Issue 6 **39** (2015) 4295-4307.

[22] Danemark, SE et Kallemeyn, JM. Synthèse d’isoxazoles 3,4,5-trisubstitués par des réactions de couplage croisé séquentielle [3 + 2] cycloaddition / silicium. The Journal of Organic Chemistry, 7 (2005) 2839–2842.

Conclusion générale

La réalisation du présent mémoire nous a permis de se familiariser avec les manipulations et la méthodologie de synthèse organique en général.

Au cours de ce travail nous avons synthétisé de nouveaux composés organiques de type chalcones, pyrazoles et isoxazoles.

Ce travail est initié par la préparation des chalcones à partir de la 4-acétylpyridine avec différents aldéhydes aromatiques par la condensation de Claisen Schmidt. Ces derniers sont utilisés avec l'hydrazine hydrate en présence d'une base (acétate de sodium anhydre) pour former des pyrazolines qui par oxydation se transforment en pyrazoles ou avec l'hydroxylamine hydrochloride pour donner des isoxazoles.

Le succès des essais est jugé par les bons rendements obtenus au cours des réactions et leur pureté vérifiée par CCM.

Les points de fusion, la spectroscopie UV-Visible et la spectroscopie Infrarouge nous ont permis de confirmer l'obtention de nouvelles molécules différentes de celles de départ en enregistrant les bandes d'absorption et les nombres d'ondes des groupements fonctionnels. Malgré cela, la confirmation structurale nécessite d'autres analyses telles que la spectrométrie de masse et la spectroscopie RMN ^{1}H et ^{13}C afin de bien confirmer les résultats obtenus.

L'activité antioxydante des composés $\mathbf{C_{1\text{-}8}}$, $\mathbf{P_{1\text{-}6}}$ et $\mathbf{i_{1\text{-}6}}$ a été évaluée par la méthode de DPPH et les résultats de cette dernière ont montré que les composés $\mathbf{C_8}$, $\mathbf{P_1}$,$\mathbf{P_2}$,$\mathbf{P_6}$,$\mathbf{i_2}$,$\mathbf{i_4}$ possèdent une très bonne activité antioxydante. Cela est dû à la présence de groupement -OH en position para du noyau aromatique du composé $\mathbf{C_8}$ et la présence d'un H sur la fonction amine (N-H) du noyau pyrazole et isoxazole.

L'activité antibactérienne vis-à-vis de germes pathologiques pour l'homme, a été évaluée *in vitro* pour les 20 produits et comparée à celle des antibiotiques. Elle a été déterminée sur trois souches bactériennes pour les chalcones (*Escherichia coli*, *staphylococcus aureus et Pseudomonas Aeruginosa*) et deux souches pour les pyrazoles et isoxazoles (*Escherichia coli* et *staphylococcus aureus*) par la méthode de diffusion de disques. Les produits $\mathbf{C_{1\text{-}3}}$, $\mathbf{C_6}$, $\mathbf{P_{1\text{-}2}}$, $\mathbf{P_4}$, $\mathbf{P_6}$, $\mathbf{i_2}$ ont révélés une très bonne activité antibactérienne vis-à-vis de *staphylococcus aureus* qui est supérieur ou égale à l'antibiotique de référence. Entre temps les deux autres souches se sont révélées résistantes vis-à-vis de tous les composés testés sauf $\mathbf{C_{1\text{-}3}}$ pour *E. coli* et $\mathbf{C_1}$, $\mathbf{C_3}$, $\mathbf{C_4}$ pour *Pseudomonas Aeruginosa* avec une légère activité antibactérienne.

Perspectives

En perspective de ce Mémoire, nous envisageons de compléter les techniques spectroscopiques en spectrométrie de masse et en RMN du proton et du carbone-13 et réaliser d'autres activités biologiques sur les nouvelles molécules synthétisées ; chalcones, pyrazoles et isoxazoles. En outre, d'autres modifications structurales sont actuellement en cours pour élargir ces chimiothèques et améliorer leurs activités biologiques.

Et pour valoriser les produits préparés, il est très intéressant de faire une optimisation des conditions de travail, étudier l'efficacité des produits comme agent inhibiteur ou de les soumettre à d'autres applications.

ANNEXE

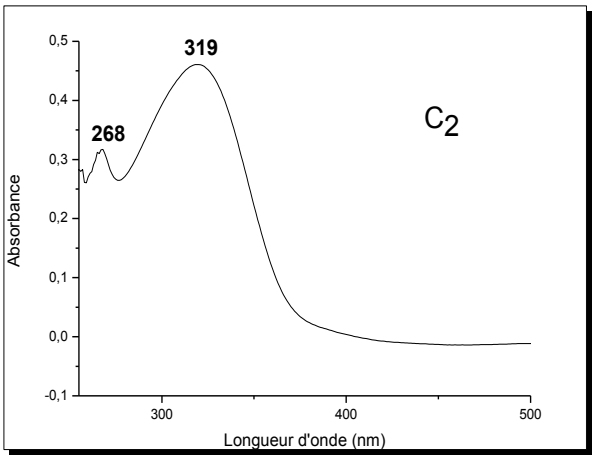


Figure III.1$_b$ Spectre UV-visible du composé C_2 dans le DMSO

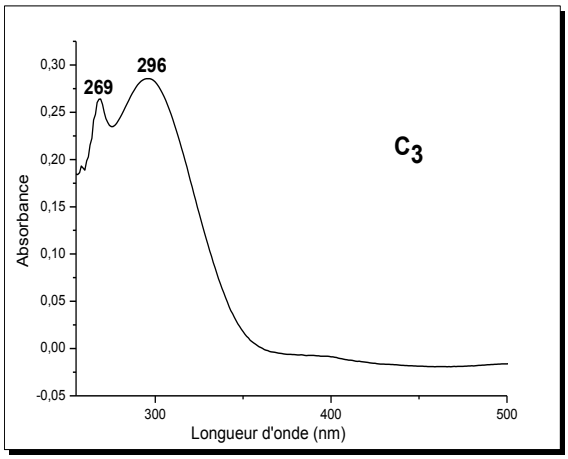


Figure III.1$_c$ Spectre UV-visible du composé C_3 dans le DMSO

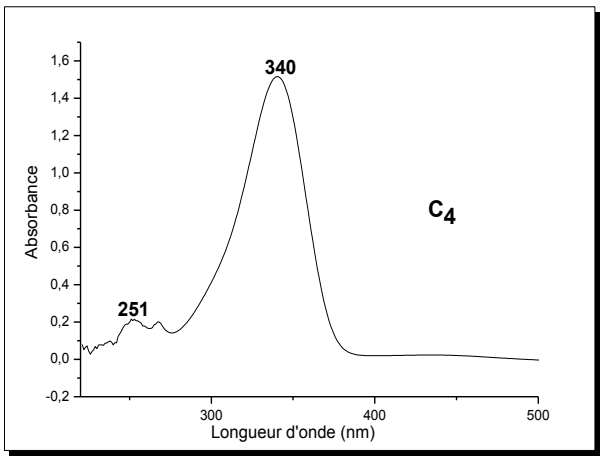


Figure III.1$_d$ Spectre UV-visible du composé C_4 dans le DMSO

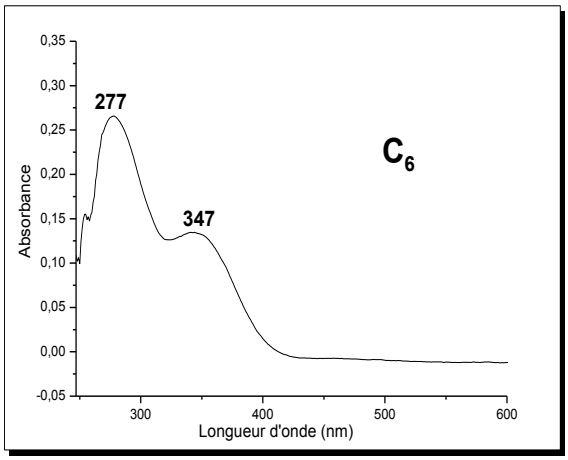


Figure III.1$_e$ Spectre UV-visible du composé C_6 dans le DMSO

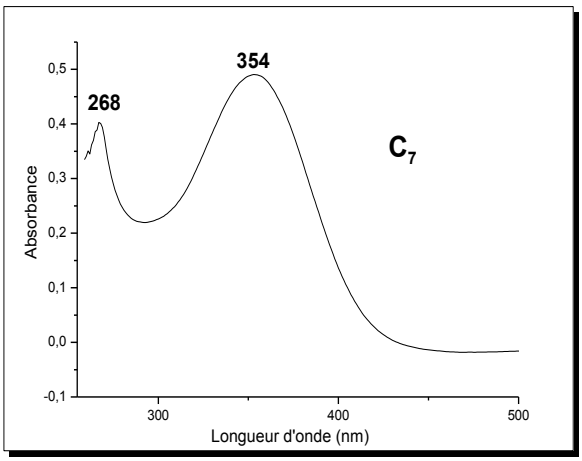


Figure III.1$_f$ Spectre UV-visible du composé C_7 dans le DMSO

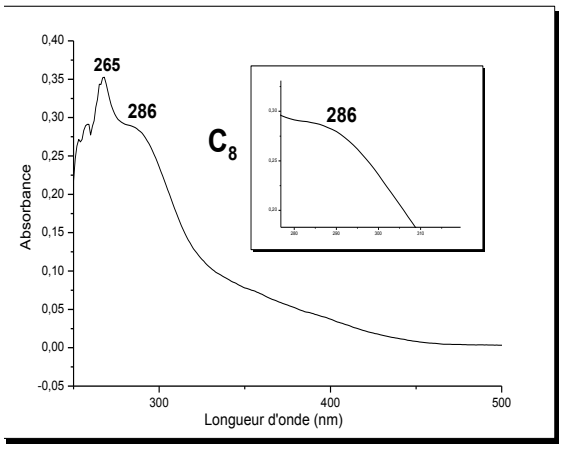


Figure III.1$_g$ Spectre UV-visible du composé C_8 dans le DMSO

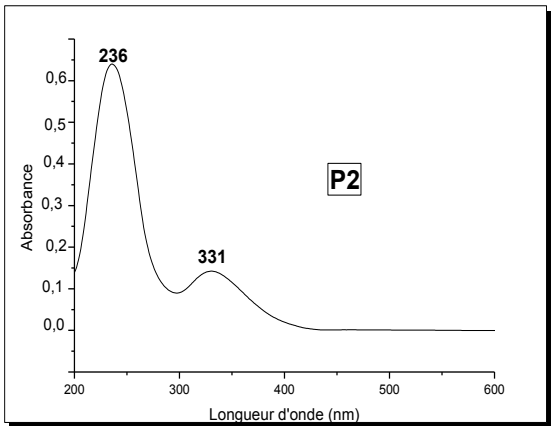


Figure III.4$_b$ Spectre UV-visible du composé P_2 dans le DMSO

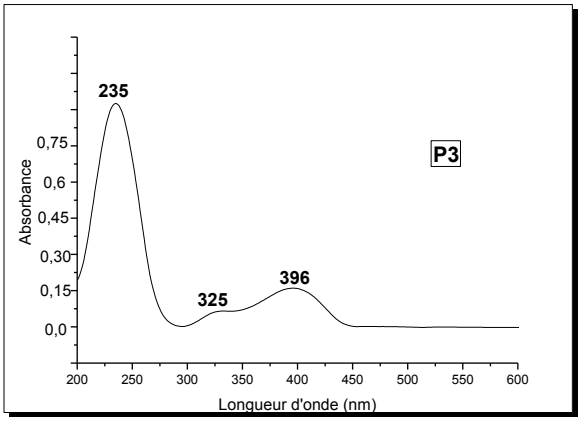


Figure III.4$_c$ Spectre UV-visible du composé P_3 dans le DMSO

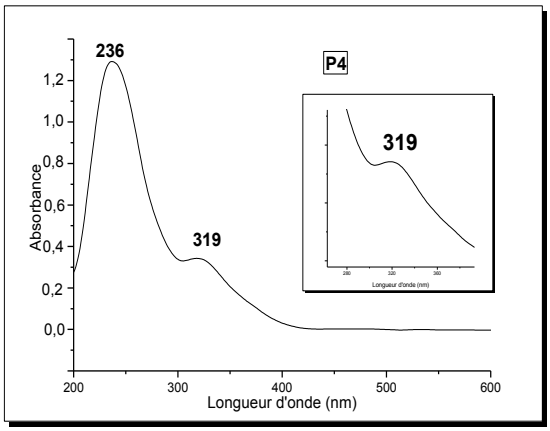


Figure III.4$_d$ Spectre UV-visible du composé P_4 dans le DMSO

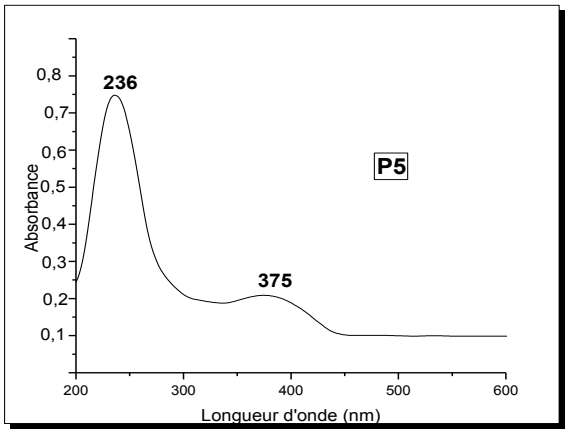


Figure III.4$_e$ Spectre UV-visible du composé P_5 dans le DMSO

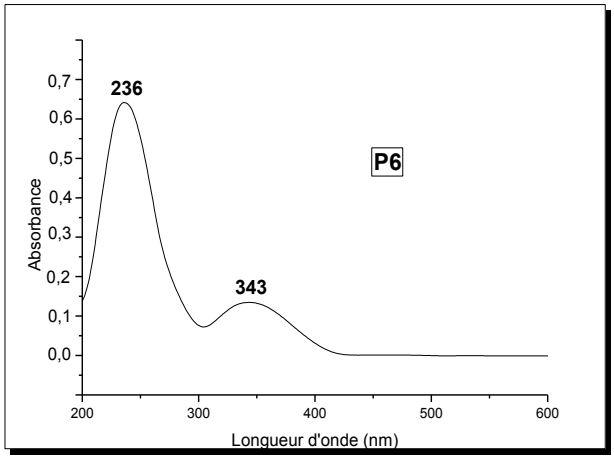


Figure III.4$_f$ Spectre UV-visible du composé P_6 dans le DMSO

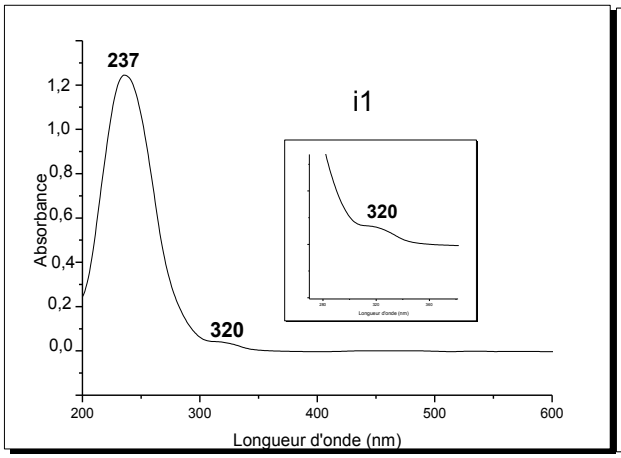


Figure III.8$_a$ Spectre UV-visible du composé i_1 dans le DMSO

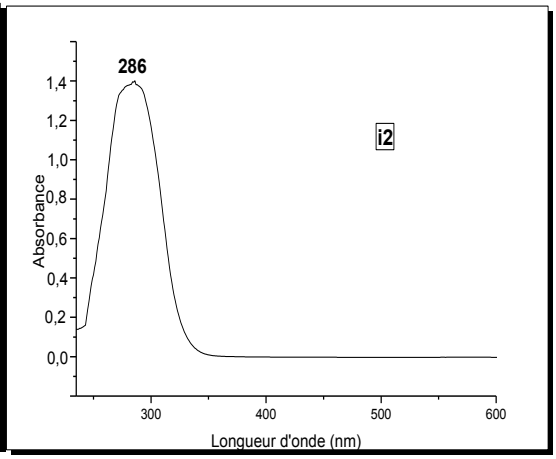


Figure III.8$_b$ Spectre UV-visible du composé i_2 dans le DMSO

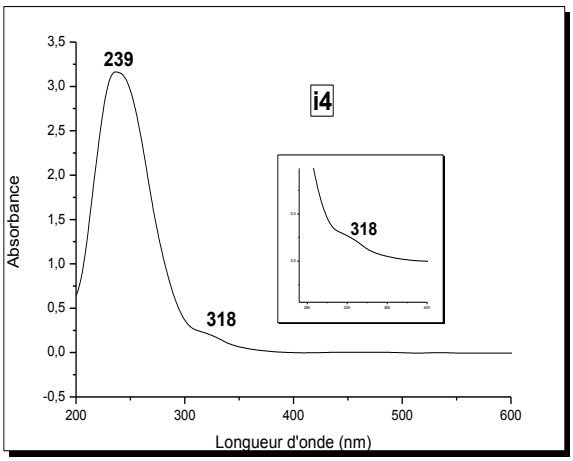


Figure III.8$_d$ Spectre UV-visible du composé i_4 dans le DMSO

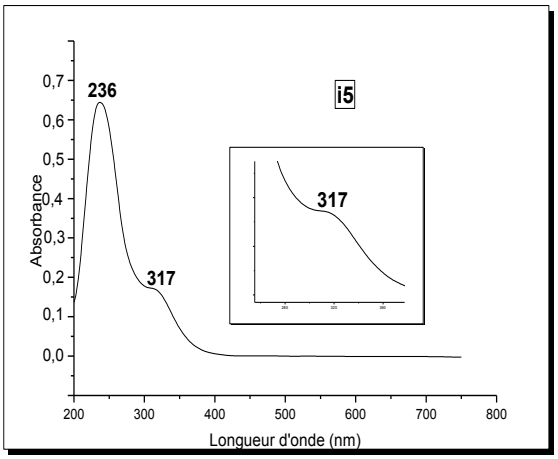


Figure III.8$_e$ Spectre UV-visible du composé i_5 dans le DMSO

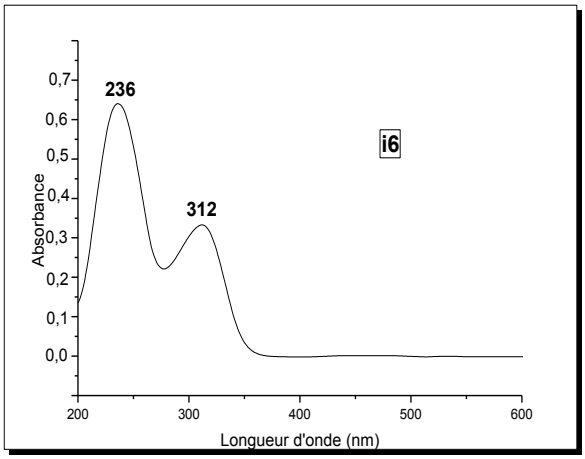


Figure III.8$_f$ Spectre UV-visible du composé i_6 dans le DMSO

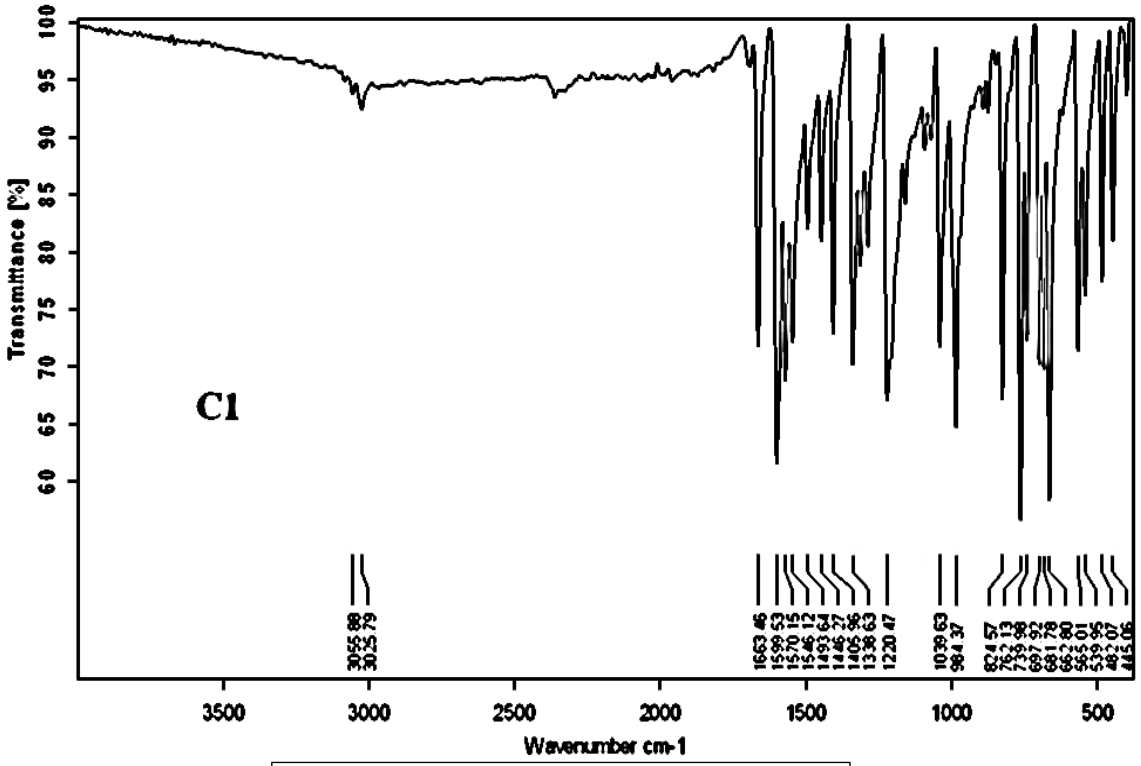


Figure III.2$_a$ Spectre IR du composé C_1

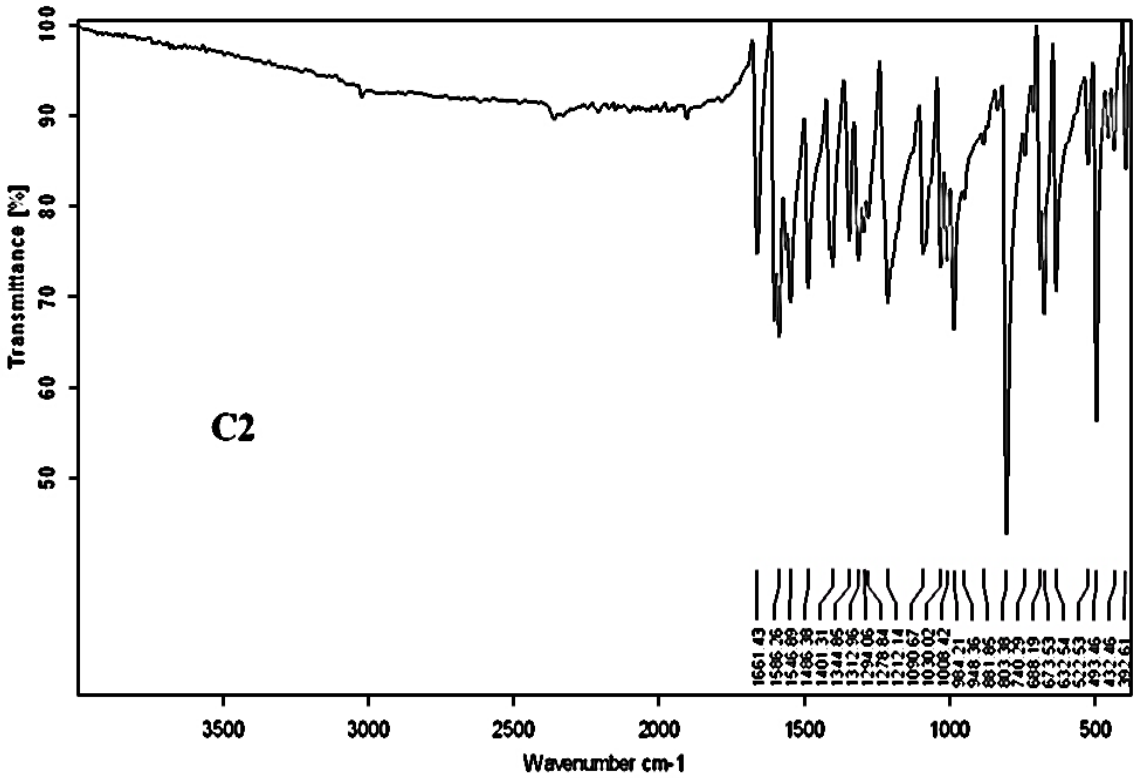


Figure III.2$_b$ Spectre IR du composé C_2

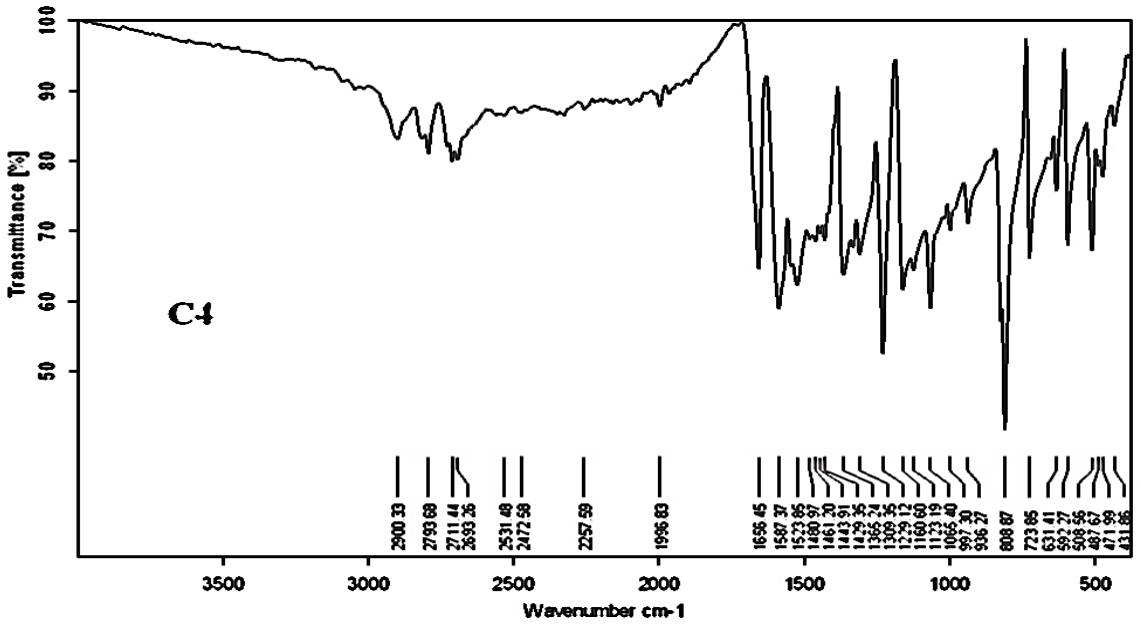


Figure III.2$_c$ Spectre IR du composé C_4

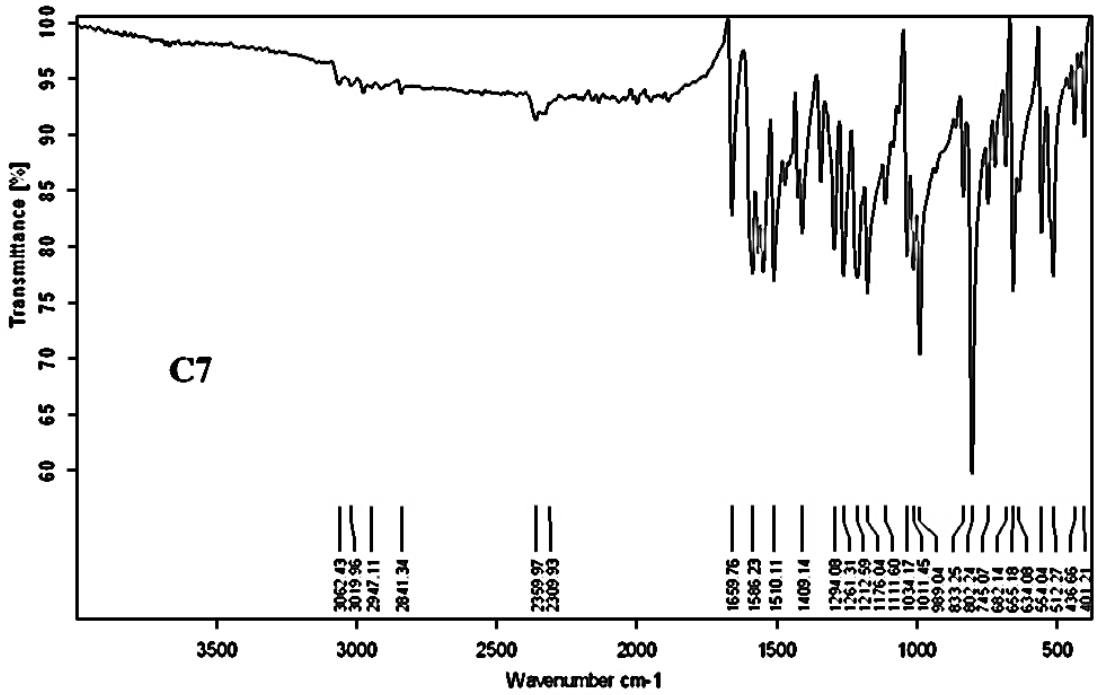


Figure III.2$_d$ Spectre IR du composé C_7

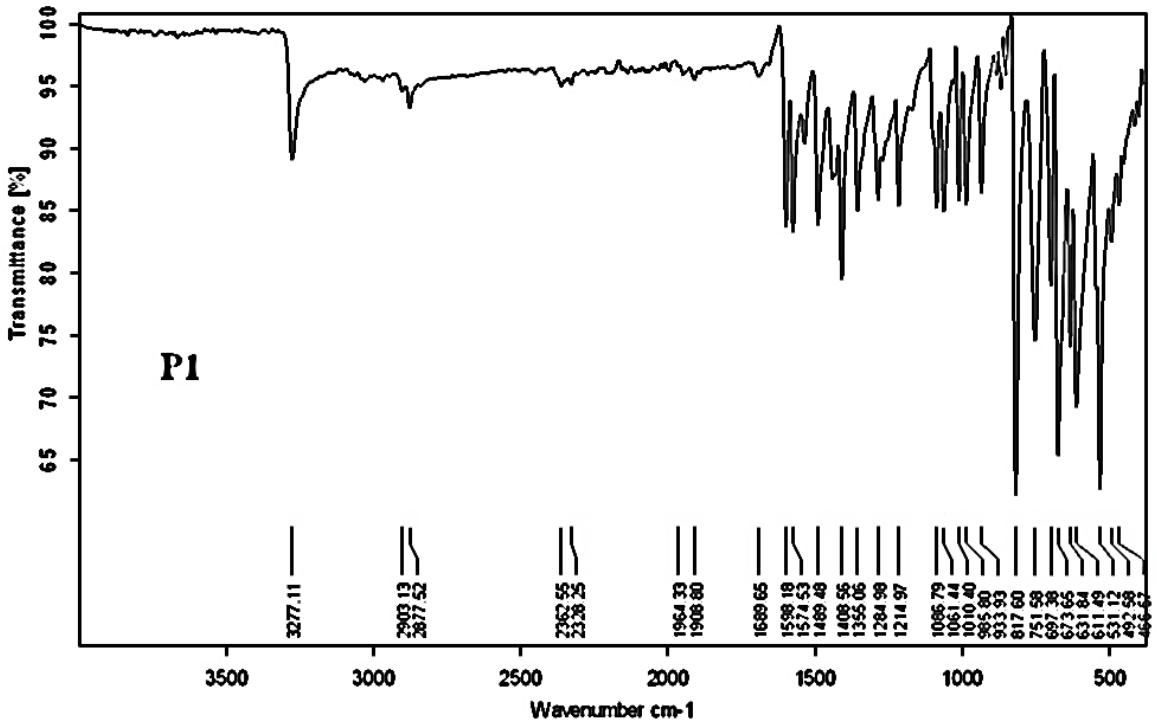


Figure III.5$_a$ Spectre IR du composé P_1

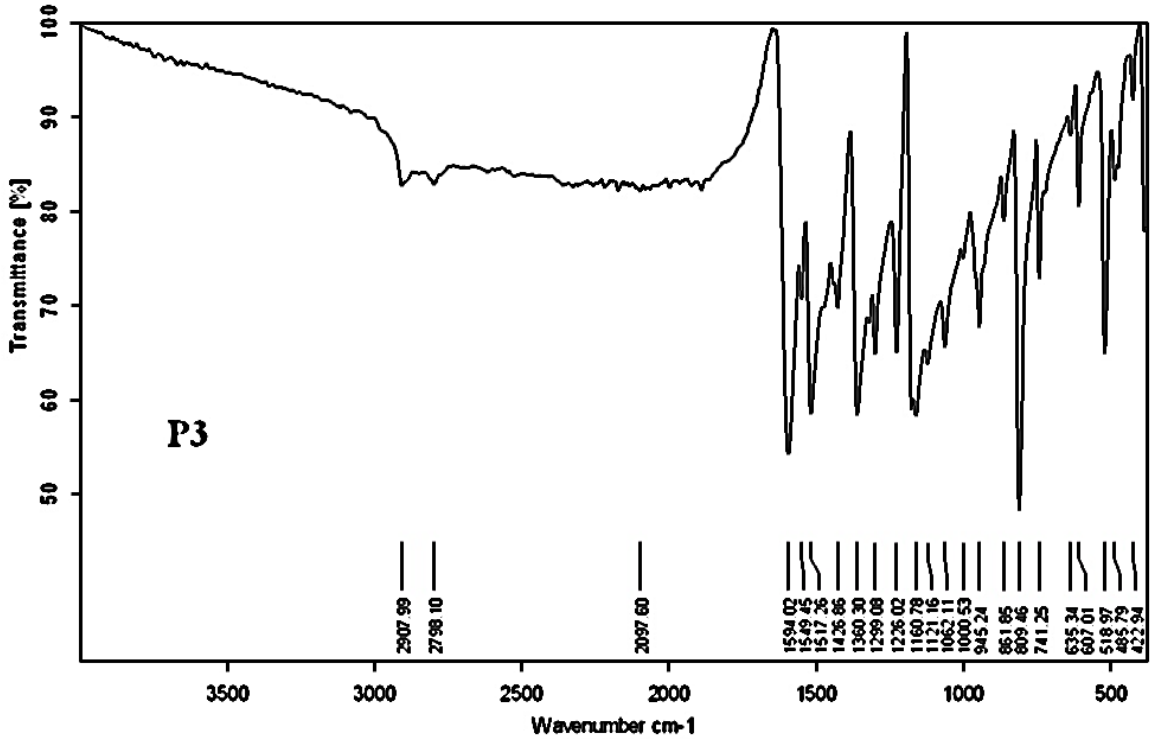


Figure III.5$_b$ Spectre IR du composé P_3

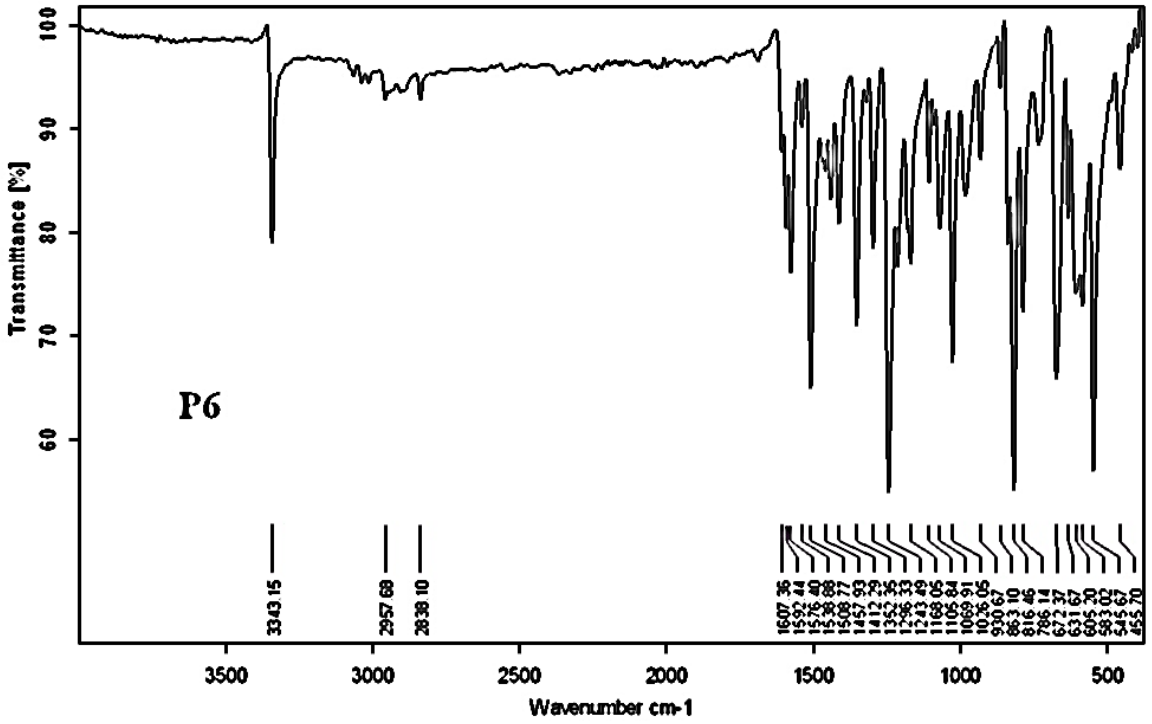
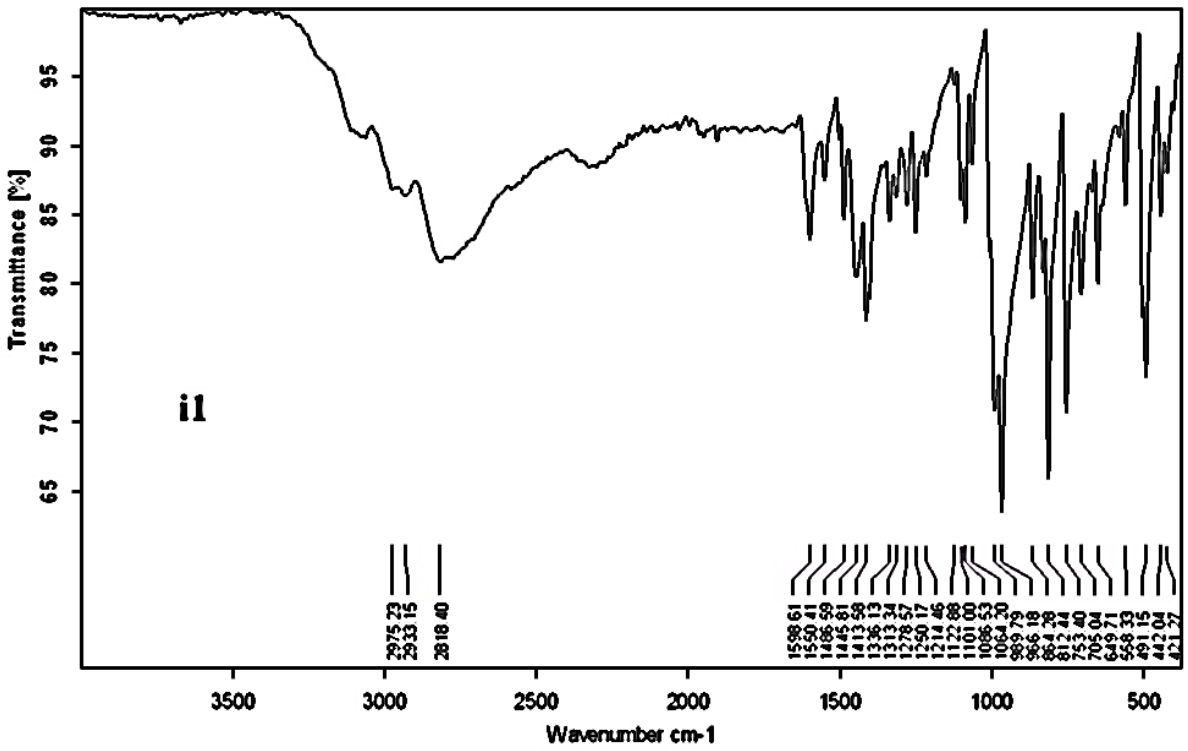


Figure III.5$_c$ Spectre IR du composé P_6



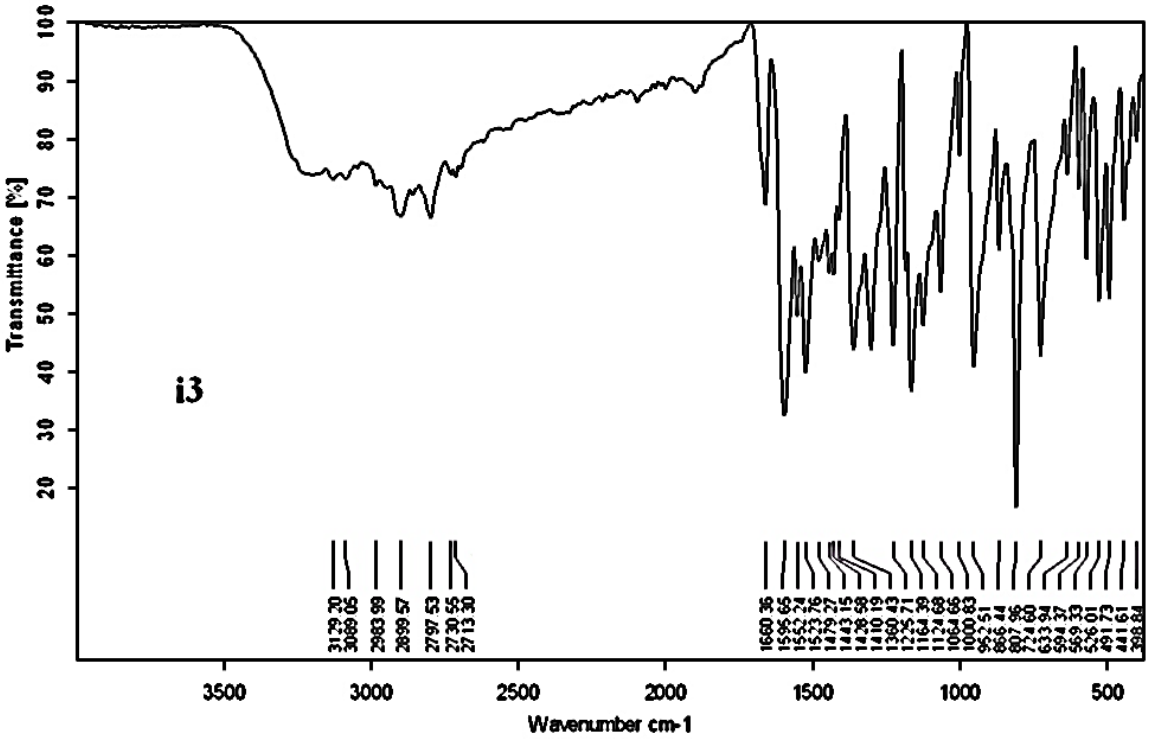


Figure III.9$_b$ Spectre IR du composé i_3

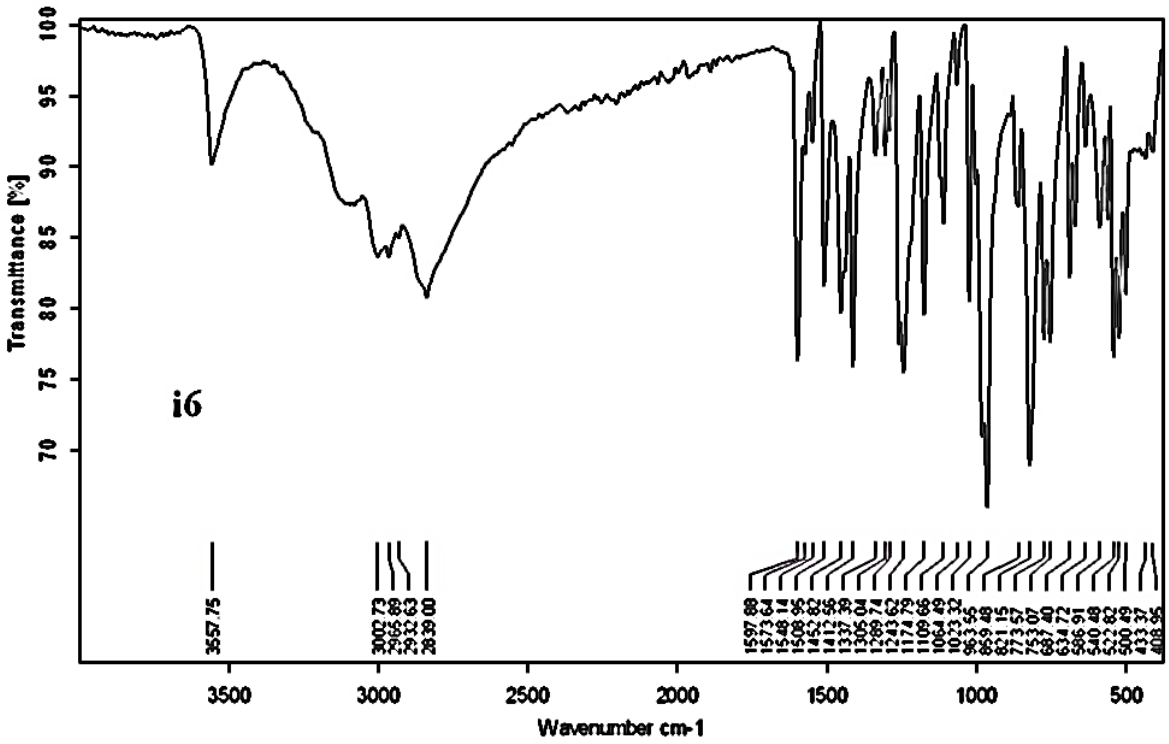


Figure III.9$_c$ Spectre IR du composé i_6

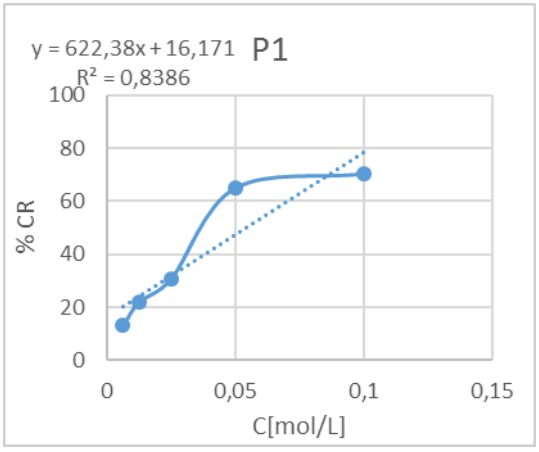


Figure. III.11$_c$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé P_1

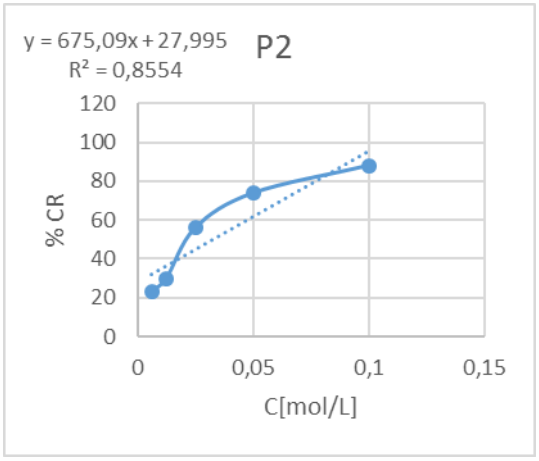


Figure.III.11$_d$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé P_2

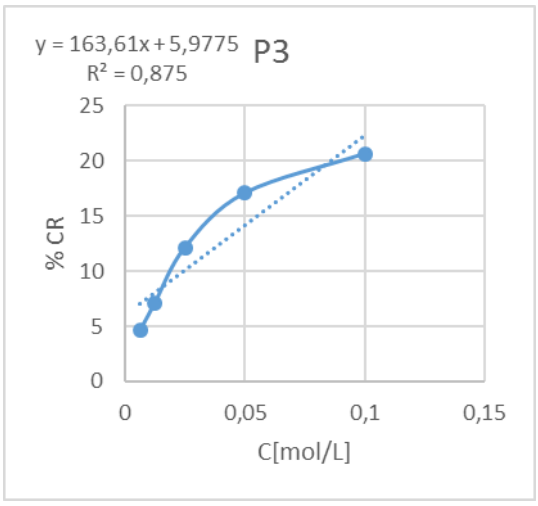


Figure.III.11$_e$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé P_3

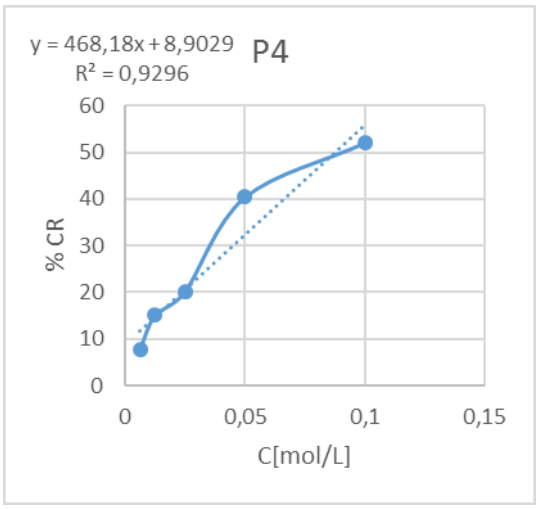


Figure.III.11$_f$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé P_4

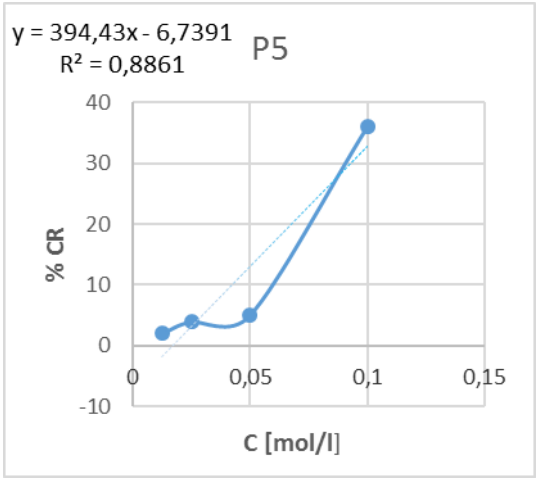


Figure.III.11$_g$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé P_5

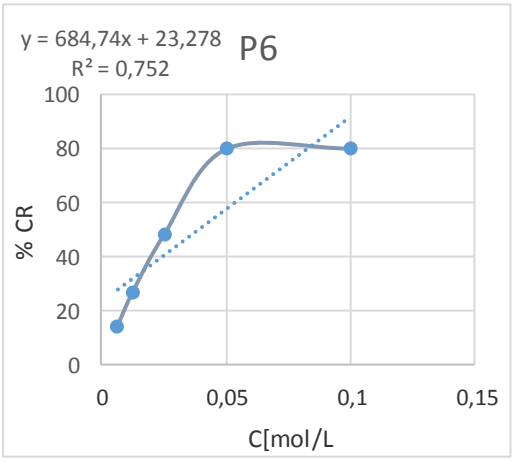


Figure.III.11$_h$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH$^{\cdot}$ du Composé P_6

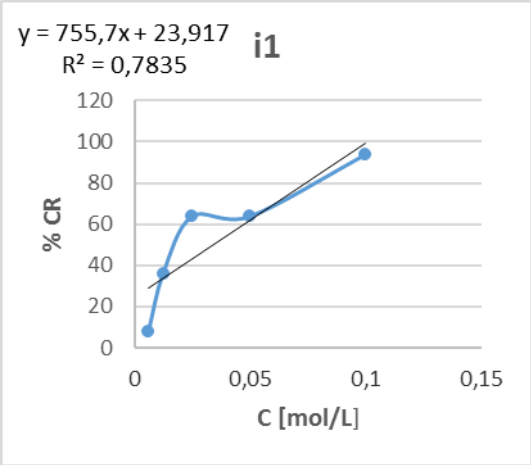


Figure.III.11$_i$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH˙ du Composé i_1

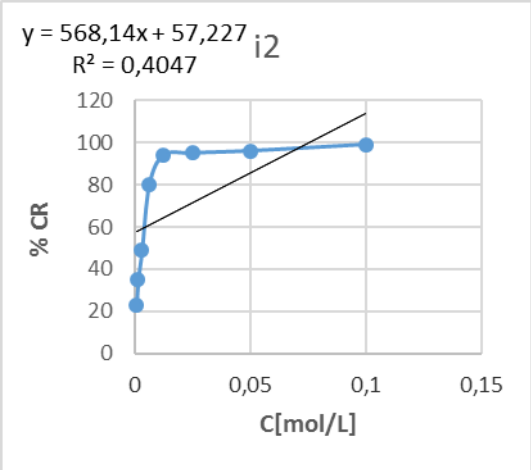


Figure.III.11$_j$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH˙ du Composé i_2

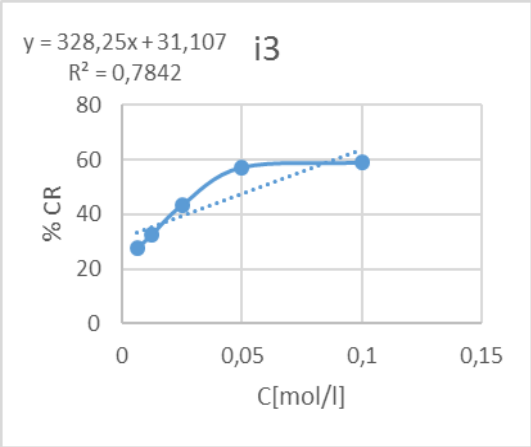


Figure.III.11$_k$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH˙ du Composé i_3

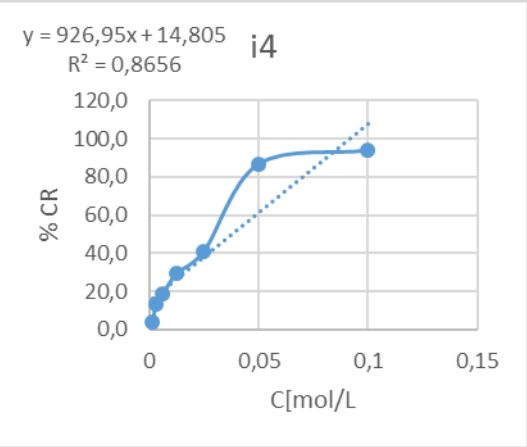


Figure.III.11$_L$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH˙ du Composé i_4

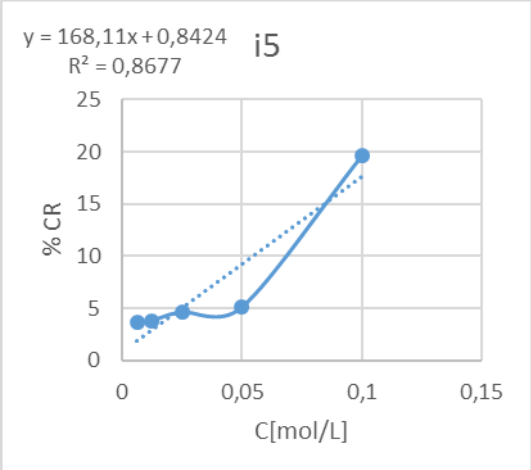


Figure.III.11$_m$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH˙ du Composé i_5

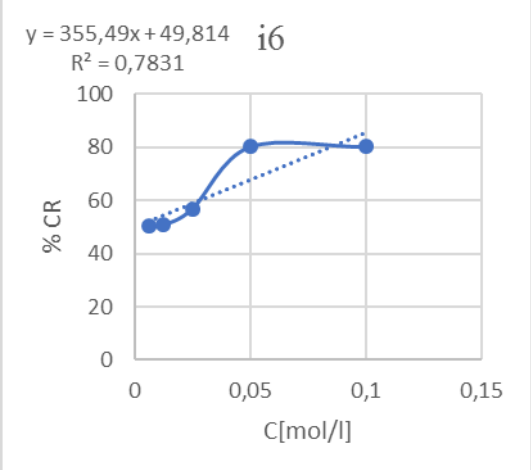


Figure.III.11$_n$ Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH˙ du Composé i_6

Résumé

Le présent travail porte dans un premier temps sur la synthèse et la réactivité de nouveaux dérivés cétones α,β-insaturés à savoir les chalcones avec la 4-acétylpyridine obtenus par la condensation de Claisen Schmidt en faisant varier les aldéhydes aromatiques et dans un second temps sur la réactivité des chalcones vis-à-vis de deux composés binucléophiles qui sont l'hydrazine hydrate et l'hydroxylamine hydrochloride. Cette étude nous a permet de mettre en évidence la synthèse des hétérocycles de type pyrazole à partir de l'hydrazine hydrate et isoxazole à partir de l'hydroxylamine hydrochloride via une cyclocondensation sur les chalcones. La caractérisation des produits est réalisée par plusieurs techniques spectroscopiques (UV-Visible, IR). L'évaluation de leurs activités biologiques antioxydante et antimicrobienne est aussi accomplie.

Mots clés : Chalcone, condensation de Claisen-Schmidt, pyrazole, isoxazole, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

The present work deals initially with the synthesis and reactivity of new α, β-unsaturated ketone derivatives, namely the chalcones with 4-acetylpyridine obtained by the Claisen Schmidt condensation by varying the aromatic aldehydes and in a second step on the reactivity of chalcones vis-à-vis two binucleophile compounds which are hydrazine hydrate and hydroxylamine hydrochloride. This study allowed us to highlight the synthesis of pyrazole heterocycles from hydrazine hydrate and isoxazole from hydroxylamine hydrochloride via a cyclocondensation on chalcones. The products are characterized by several spectroscopic techniques (UV-Visible, IR). The evaluation of their biological antioxidant and antimicrobial activities is also accomplished.

Key words: Chalcone, Claisen-Schmidt condensation, pyrazole, isoxazole, antioxidant activity, antimicrobial activity.