

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERI, TIZI-OUZOU

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE CHIMIE



## THÈSE DE DOCTORAT 3<sup>ème</sup> CYCLE LMD

Filière : Chimie

Spécialité: Chimie Pharmaceutique

Présentée par :

**M<sup>me</sup> Kamilia OULD LAMARA épouse HECHICHE**

Sujet :

### **Synthèse et évaluation biologique de séries de composés hétérocycliques**

Devant le jury d'examen composé de :

|                                    |             |              |                |
|------------------------------------|-------------|--------------|----------------|
| Mme. Tassadit MAZARI-HACHI         | Professeure | UMMTO        | Présidente     |
| Mme. Malika MAKHLOUFI-CHEBLI       | Professeure | UMMTO        | Rapporteur     |
| M. Jean-Bernard BEHR               | Professeur  | URCA, France | Co- Rapporteur |
| Mme. Djamila OUKACHA-HIKEM         | MCA         | UMMTO        | Examinatrice   |
| Mme. Anissa AMAR-HADDAD            | MCA         | UMMTO        | Examinatrice   |
| Mme. Yamina ABDI-AIT<br>ABDESSELAM | MCA         | ENST, Alger  | Examinatrice   |

**Année universitaire : 2021/2022**

*« L'oisiveté est pire que la rouille, elle use plus que le travail. »*

*Pat L. WOLF*

# REMERCIEMENTS

*C'est avec un réel plaisir et un grand enthousiasme que je me livre à la rédaction de cette page. Pour moi ce n'est pas le point final de rédaction, cette page représente une méditation sur une période de vie riche en évènements scientifiques et culturels.*

*Cette thèse a été effectuée au sein du laboratoire (LPMC) de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, j'aimerais via ces quelques lignes remercier les personnes qui ont contribué au bon déroulement et à l'élaboration de cette thèse.*

*D'emblée, je tiens à adresser mes sincères remerciements à madame le Professeure **CHÉBLI** épouse **MAKHLOUFI Malika** pour m'avoir proposé ce sujet et de m'avoir accueillie au sein de son équipe, ainsi que pour son encadrement durant la période de ma thèse, je lui suis très reconnaissante pour la liberté qu'elle m'a laissée dans mon travail, pour ses conseils pertinents et sa disponibilité scientifiques qui m'ont servi à bien mener cette thèse.*

*Je tiens à remercier aussi monsieur **BEHR Jean-Bernard**, Professeur à l'université de Reims d'avoir accepté de prendre aussi en charge le Co-encadrement de mes travaux de recherche, je lui adresse également ma gratitude pour l'attention, les conseils, les encouragements et surtout la patience dont il a fait preuve à mon égard tout au long de mes travaux.*

*J'exprime mes sincères remerciements à:*

*Madame MAZARI épouse HACHI Tassadit, Professeure à l'UMMTO, pour le grand honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.*

*Madame OUKACHA épouse HIKEM Djamila, maître de conférences classe A à l'UMMTO pour avoir accepté d'examiner ce travail. Merci pour vos encouragements, je ne peux oublier les qualités de vos conseils aussi bien sur le plan scientifique que psychologique.*

*Madame AMAR-HADDAD Anissa, maître de conférences classe A à l'UMMTO et Madame ABDI-AIT ABDESSELAM Yamina, maître de conférences classe A à L'ENST d'Alger qui ont accepté d'honorer par leur présence à cette soutenance, d'examiner le contenu de cette thèse et l'enrichir par leurs remarques pertinentes et constructives.*

*Je remercie également vivement, le Docteur ABDOUN Amar, pharmacien microbiologiste au CHU Nadir Mohamed de Tizi-Ouzou de m'avoir introduit à la microbiologie, pour sa grande générosité et pour ses encouragements illimités.*

*Je suis très reconnaissante envers Madame BOUAZZIZ-TERRACHET Souhila, Professeure à l'université de Boumerdès, d'avoir accepté de collaborer avec nous, pour son professionnalisme et sa grande disponibilité.*

*J'exprime aussi mes sincères remerciements envers Mme BENZAOUZ épouse TOUAMI Amina, Mr ROBERT Anthony et Mme MACHADO-RODRIGUEZ Carine pour leur implication dans l'analyse et l'interprétation de mes résultats Spectroscopiques.*

*Un clin d'œil spécial pour Monsieur MARZOUK Tahar, ingénieur au laboratoire LPCM qui, par son dynamisme, sa bonne humeur et son soutien quotidien m'a beaucoup aidé dans la réalisation de cette thèse.*

*A tous mes compagnons de l'équipe chimie organique : Djamila HIKEM, Sakina TELLAL, Lila BELMAHDI, Leïla BENNINI, Drifa BELKHIR, Nassima KHALDI et Karima Ighilahriz qui pour une raison ou une autre, se sont également lancées dans cette drôle d'aventure.*

*A tous les autres membres du LPCM, j'adresse mes remerciements les plus sincères pour leur disponibilité, leurs conseils, les discussions scientifiques ou non, et surtout pour les bons moments passés en leur compagnie.*

*Je remercie Mr HECHICHE Nacer, collègue au premier jour, ami le jour suivant et mon mari à présent pour son soutien inconditionnel.*

*Je remercie infiniment mes parents ainsi que mes deux frères : Achour et Lyes pour tout l'amour et l'affection que vous m'avez apportés. Jamais votre soutien ne m'a fait défaut. Je vous serais à jamais reconnaissante d'avoir cru en moi et de m'avoir offert tout ce dont j'avais besoin pour en arriver là. Cette thèse est le résultat de toutes ces années d'efforts que nous avons fournis conjointement.*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Ma famille*

*Mon mari*

*Ma belle famille*

## Liste des abréviations

### Unités

|           |                   |
|-----------|-------------------|
| Å         | angström          |
| °C        | degré Celsius     |
| Cm        | centimètre        |
| fs        | femtoseconde      |
| g         | gramme            |
| h         | heure             |
| Hz, MHz   | hertz, Méga hertz |
| min       | minute            |
| ml        | millilitre        |
| mol, mmol | mole, milli mole  |
| ns        | nanoseconde       |
| ps        | picoseconde       |

### Autres

|        |                                  |
|--------|----------------------------------|
| ADN    | Acide Désoxyribose Nucléique     |
| AChE   | Acétylcholinestérase             |
| ACN    | Acétonitrile                     |
| AA     | Acide Ascorbique                 |
| ATP    | Adénosine Triphosphate           |
| Asp168 | Asparagine 168                   |
| Ala51  | Alanine 51                       |
| CCM    | Chromatographie sur Couche Mince |
| d      | Doublet                          |
| dd     | Doublet de doublet               |
| DMSO   | Diméthylsulfoxyde                |
| DPPH   | 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl    |
| Éq     | équivalent                       |
| EtOH   | Ethanol                          |
| Glu71  | Acide glutamique 71              |

|                     |  |
|---------------------|--|
| His107              | Histidine 107  |
| HRMS                | High-Resolution Mass spectrometry                          |
| IC 50               | Concentration inhibitrice médiane                          |
| IR                  | Infrarouge   |
| Ile294              | Isoleucine 294   |
| <i>J</i>            | constantes de couplage                                     |
| Leu167              | Leucine 167  |
| Lys53               | Lysine 53  |
| Met109              | Méthionine 109   |
| m                   | multiplet  |
| MS-ESI <sup>+</sup> | Mass spectrometry- Electrospray ionization en mode positif |
| M.O                 | Micro-onde   |
| ORCA                | One Really Cool Application                                |
| pf                  | point de fusion  |
| Phe297              | Phénylalanine 297  |
| ppm                 | partie par million   |
| Qtté                | Quantité   |
| Rdt                 | Rendement  |
| RMN                 | Résonance Magnétique Nucléaire                             |
| RSA                 | Radical Scavenger Activity                                 |
| RMSD                | Root-Mean-Square Deviation                                 |
| s                   | singulet   |
| THF                 | Tetrahydrofuran  |
| Thr106              | Thréonine 106  |
| Tyr35               | Tyrosine 35  |
| TBAI                | Tetrabutylammonium iodide                                  |
| UV-vis              | Ultraviolet-visible  |
| Val38               | Valine 38  |
| $\delta$            | Déplacement chimique                                       |
| $\lambda_{abs}$     | Longueur d'onde d'absorption                               |

## Liste des tableaux

**PARTIE 1**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1.1 :</b> Exemples de chaque sous-type de coumarine.   | 4  |
| <b>Tableau 1.2 :</b> Lotilaner, fluralaner, sarolaner et afoxolaner à base d'isoxazoline dans les essais cliniques. | 24 |

**PARTIE 2**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 2.1:</b> Synthèse de la 6 <i>H</i> ,7 <i>H</i> -7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano [4,3- <i>b</i> ][1]benzopyran-6-one <b>4a</b> et de la 3-(2-hydroxybenzoyl)-2 <i>H</i> -chromèn-2-ones <b>5a</b> dans différentes conditions de réaction. | 41 |
| <b>Tableau 2.2:</b> Synthèse de <b>5a</b> et <b>4a</b> sous différents catalyseurs dans l'éthanol et le méthanol.   | 42 |
| <b>Tableau 2.3 :</b> Synthèse des composés <b>5a-g</b> et/ou <b>4a-g</b>  | 43 |
| <b>Tableau 2.4 :</b> Synthèse des composés <b>4a-g</b>  | 44 |
| <b>Tableau 2.5 :</b> Résultats des analyses MS-ESI <sup>+</sup> des produits <b>4</b> et <b>5</b> .   | 44 |
| <b>Tableau 2.6 :</b> Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup> H à 300,13 MHz des composés <b>4a-g</b> .   | 48 |
| <b>Tableau 2.7 :</b> Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup> H à 300,13 MHz des composés <b>5</b> .  | 51 |
| <b>Tableau 2.8 :</b> Déplacements chimiques en RMN <sup>13</sup> C des composés <b>4a-g</b> .   | 52 |
| <b>Tableau 2.9 :</b> Déplacements chimiques en RMN <sup>13</sup> C des composés <b>5a-c</b> , <b>5f-g</b> .   | 53 |
| <b>Tableau 2.10 :</b> Enthalpie de formation $\Delta H_f$ calculée des deux rotamères <b>3a</b> et <b>3b</b> .  | 55 |
| <b>Tableau 2.11 :</b> Résidus d'interaction, liaisons hydrogène et énergies de liaison des composés étudiés tels que prédits par le logiciel iGEMDOCK.  | 69 |

**PARTIE 3**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 3.1 :</b> Résultats de l'analyse RMN <sup>1</sup> H du composé <b>3a</b> . | 80 |
| <b>Tableau 3.2:</b> Résultats de l'analyse RMN <sup>13</sup> C du composé <b>3a</b> . | 81 |
| <b>Tableau 3.3 :</b> Résultats de l'analyse RMN <sup>1</sup> H du composé <b>3b</b> . | 83 |
| <b>Tableau 3.4:</b> Résultats de l'analyse RMN <sup>13</sup> C du composé <b>3b</b> . | 84 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 3.5:</b> Résultats de l'analyse RMN $^1\text{H}$ du composé <b>3c</b> .  | 85  |
| <b>Tableau 3.6:</b> Résultats de l'analyse RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>3c</b> .                                     | 86  |
| <b>Tableau 3.7 :</b> Résultats de l'analyse RMN $^1\text{H}$ du composé <b>3d</b> .                                       | 88  |
| <b>Tableau 3.8:</b> Résultats de l'analyse RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>3d</b> .                                     | 89  |
| <b>Tableau 3.9 :</b> Résultats de l'analyse RMN $^1\text{H}$ du composé <b>3e</b> .                                       | 90  |
| <b>Tableau 3.10:</b> Résultats de l'analyse RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>3e</b> .                                    | 91  |
| <b>Tableau 3.11 :</b> Résultats de l'analyse RMN $^1\text{H}$ du composé <b>3f</b> .                                      | 93  |
| <b>Tableau 3.12 :</b> Résultats de l'analyse RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>3f</b> .                                   | 94  |
| <b>Tableau 3.13 :</b> Résultats de l'analyse RMN $^1\text{H}$ du composé <b>3g</b> .                                      | 96  |
| <b>Tableau 3.14 :</b> Résultats de l'analyse RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>3g</b> .                                   | 96  |
| <b>Tableau 3.15 :</b> Résultats de l'analyse RMN $^1\text{H}$ du composé <b>3h</b> .                                      | 98  |
| <b>Tableau 3.16 :</b> Résultats de l'analyse RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>3h</b> .                                   | 99  |
| <b>Tableau 3.17 :</b> Résultats de l'analyse RMN $^1\text{H}$ du composé <b>3i</b> .                                      | 101 |
| <b>Tableau 3.18 :</b> Résultats de l'analyse RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>3i</b> .                                   | 101 |
| <b>Tableau 3.19 :</b> Résultats de l'analyse RMN $^1\text{H}$ du composé <b>3j</b> .                                      | 103 |
| <b>Tableau 3.20 :</b> Résultats de l'analyse RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>3j</b> .                                   | 104 |
| <b>Tableau 3.21 :</b> Résultats des analyses HRMS ESI <sup>+</sup> des chalcone-oximes<br>( <b>4a-c, e, h, i</b> ).       | 105 |
| <b>Tableau 3.22 :</b> Déplacements chimiques en RMN $^1\text{H}$ à 500,28 MHz des<br>composés ( <b>4a-c, e, h, i</b> ).   | 106 |
| <b>Tableau 2.23 :</b> Déplacements chimiques en RMN $^{13}\text{C}$ à 125,8 MHz des<br>composés ( <b>4a-c, e, h, i</b> ). | 111 |
| <b>Tableau 3.24 :</b> Résultats des analyses UV-visible des chalcone-oximes<br>( <b>4a-c, e, h, i</b> ).                  | 112 |
| <b>Tableau 3.25 :</b> Résultats spectroscopiques IR des composés <b>4a-c, e, h</b> .                                      | 112 |
| <b>Tableau 3.26 :</b> Déplacements chimiques en RMN $^1\text{H}$ à 500,28 MHz des<br>composés <b>5j</b> .                 | 114 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 3.27 :</b> Déplacements chimiques en RMN $^{13}\text{C}$ à 125,8 MHz<br>des composés <b>5j</b> .  | 115 |
| <b>Tableau 3.28 :</b> Diamètres des zones d'inhibition (mm) des composés<br><b>(3a-i)</b> et du médicament standard à 5,12 mg/mL.  | 129 |
| <b>Tableau 3.29:</b> Diamètres des zones d'inhibition (mm) des composés <b>(3a-j)</b><br>et du médicament standard à 5,12 mg/mL.   | 131 |
| <b>Tableau 3.30 :</b> Diamètres des zones d'inhibition (mm) des composés <b>(4, 5j)</b><br>et du médicament standard à 5,12 mg/mL.   | 132 |
| <b>Tableau 3.31 :</b> Pénétration de la <b>BHE</b> et profil de la règle de Lipinski<br>des composés étudiés.  | 139 |
| <b>Tableau 3.32 :</b> Interactions des liaisons hydrogène, résidus en interaction,<br>et énergies d'arrimage ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), calculées pour les composés<br>synthétisés avec la protéine fep-mAChE. | 141 |

## Liste des schémas

**PARTIE 1**

|  |    |
|--|----|
| <b>Schéma 1.1:</b> Schéma de synthèse des coumarines par la réaction de Perkin.  | 6  |
| <b>Schéma 1.2:</b> Schéma de synthèse des coumarines par la réaction de Pechmann.  | 6  |
| <b>Schéma 1.3:</b> Schéma de synthèse des coumarines par la réaction de Knoevenagel.   | 6  |
| <b>Schéma 1.4:</b> Schéma de synthèse des coumarines par la réaction de Wittig.  | 6  |
| <b>Schéma 1.5:</b> Schéma de synthèse des coumarines par la réaction de Reformatsky.   | 7  |
| <b>Schéma 1.6 :</b> Condensation de <i>Claisen-Schmidt</i> catalysée par la soude dans un alcool.                                  | 13 |
| <b>Schéma 1.7:</b> Synthèse de chalcone par le couplage de Heck.   | 13 |
| <b>Schéma 1.8:</b> Deux voies de synthèse des chalcones par le couplage de Suzuki.   | 14 |
| <b>Schéma 1.9:</b> Synthèse de la chalcone par le couplage de Sonogashira.   | 14 |
| <b>Schéma 1.10:</b> Exemple de la synthèse de chalcones par la réaction de Friedel et Crafts (A), synthèse de l'hétilandine B (B). | 15 |
| <b>Schéma 1.11:</b> Synthèse d'oximes substituées par le cycle D de chalcones stéroïdiennes.                                       | 18 |
| <b>Schéma 1.12:</b> Voie de synthèse de dérivés de chalcone-oxime.   | 19 |
| <b>Schéma 1.13:</b> Synthèse de nouveaux éthers d'oxime.   | 19 |

**PARTIE 2**

|   |    |
|---|----|
| <b>Schéma 2.1:</b> Synthèse des composés <b>4</b> et <b>5</b> dans les conditions opératoires adaptées.   | 37 |
| <b>Schéma 2.2:</b> Sélectivité de la réaction des o-hydroxyaldéhydes avec la 4-hydroxycoumarine.  | 39 |
| <b>Schéma 2.3:</b> Synthèse des 3-acétoacétylcoumarines <b>8</b> et du pyranyl-pyranpchromène <b>9</b> .  | 40 |
| <b>Schéma 2.4:</b> Synthèse de la 6 <i>H</i> ,7 <i>H</i> -7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3- <i>b</i> ][1]benzopyran-6-one <b>4a</b> et des 3-(2-hydroxybenzoyl)-2 <i>H</i> -chromèn-2-ones <b>5a</b> .                                  | 40 |
| <b>Schéma 2.5:</b> Proposition de mécanisme pour la synthèse de la 6 <i>H</i> ,7 <i>H</i> -7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3- <i>b</i> ][1]benzopyran-6-one <b>4a</b> et des 3-(2-hydroxybenzoyl)-2 <i>H</i> -chromèn-2-ones <b>5a</b> . | 54 |

**PARTIE 3**

|   |    |
|---|----|
| <b>Schéma 3.1 :</b> Synthèse des chalcones ( <b>3a-j</b> ). | 79 |
|---|----|

|  |     |
|--|-----|
| <b>Schéma 3.2</b> : Synthèse de la chalcone <b>3a</b> .                          | 80  |
| <b>Schéma 3.3</b> : Synthèse de la chalcone <b>3b</b> .                          | 83  |
| <b>Schéma 3.4</b> : Synthèse de la chalcone <b>3c</b> .                          | 85  |
| <b>Schéma 3.5</b> : Synthèse de la chalcone <b>3d</b> .                          | 87  |
| <b>Schéma 3.6</b> : Synthèse de la chalcone <b>3e</b> .                          | 90  |
| <b>Schéma 3.7</b> : Synthèse de la chalcone <b>3f</b> .                          | 92  |
| <b>Schéma 3.8</b> : Synthèse de la chalcone <b>3g</b> .                          | 95  |
| <b>Schéma 3.9</b> : Synthèse de la chalcone <b>3h</b> .                          | 98  |
| <b>Schéma 3.10</b> : Synthèse de la chalcone <b>3i</b> .                         | 100 |
| <b>Schéma 3.11</b> : Synthèse de la chalcone <b>3j</b> .                         | 103 |
| <b>Schéma 3.12</b> : Voie de synthèse des chalcone-oximes <b>4a-c, e, h, i</b> . | 105 |
| <b>Schéma 3.13</b> : Voie de synthèse du composé <b>5j</b> .                     | 113 |

## Liste des figures

### PARTIE 1

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1.1 :</b> Arbre Tonka.   | 3  |
| <b>Figure 1.2:</b> Structure chimique d'une coumarine (2H-1- benzopyrane-2-one).   | 4  |
| <b>Figure 1.3:</b> Warfarine.  | 7  |
| <b>Figure 1.4:</b> Cloricromène.   | 8  |
| <b>Figure 1.5 :</b> Umbelliférone.   | 8  |
| <b>Figure 1.6:</b> Novobiocine.  | 9  |
| <b>Figure 1.7:</b> Coumarin-3-(N-aryl) carboxamides.   | 9  |
| <b>Figure 1.8:</b> Dérivé de la 3-phénylcoumarine.   | 10 |
| <b>Figure 1.9:</b> Photophyodermatose chez un patient ayant été en contact avec des furocoumarines et s'étant exposés au soleil.   | 11 |
| <b>Figure 1.10:</b> Structure générale de la chalcone.   | 12 |
| <b>Figure 1.11:</b> Modifications biochimiques des chalcones.  | 12 |
| <b>Figure 1.12:</b> Chalcones inhibitrices de la cathepsine-K.   | 16 |
| <b>Figure 1.13 :</b> Hybrides biscoumarine-chalcones.  | 17 |
| <b>Figure 1.14:</b> Pentahydroxy-chalcone.   | 17 |
| <b>Figure 1.15:</b> Structure chimique d'une oxime.  | 18 |
| <b>Figure 1.16:</b> Structure générique des oximes de phénoxyalkylpyridinium substituées (brevet US 9,227,937) ainsi que les substitutions et la longueur de la chaîne de liaison de nouvelles oximes. | 20 |
| <b>Figure 1.17:</b> Représentation de différentes approches pour la synthèse d'isoxazolines.   | 22 |
| <b>Figure 1.18:</b> Composés bioactifs contenant de l'isoxazoline.   | 23 |

### PARTIE 2

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 2.1 :</b> Charges de Mulliken des deux formes <b>3a</b> et <b>3b</b> dans l'éthanol.  | 55 |
| <b>Figure 2.2 :</b> Structure du DPPH <sup>•</sup> et sa réduction par le composé antioxydant AH.   | 65 |
| <b>Figure 2.3 :</b> Variation de l'absorbance en fonction de la concentration des différents composés <b>4</b> , <b>5</b> et du standard ( <b>AA</b> ). | 66 |

- Figure 2.4:** Valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'activité antioxydante pour les composés **5b**, **4b** et le standard **AA**. 67
- Figure 2.5 :** Superposition des structures **A**- dockées (vert) et expérimentale (magenta) de **SB2** ; **B**- composés **4a** (magenta), **5a** (rose) et structures expérimentales (vert) de **SB2**; **C** et **D**- interactions de liaison hydrogène entre les résidus du site actif de p38 MAPK et les composés synthétisés **C**- **4a**, **D**- **5a**. Le squelette de la protéine est présenté en ruban bleu. 68
- Figure 2.6 :** Graphiques RMSD des atomes C $\alpha$  du squelette des complexes **4a**-p38 (vert), **5a**-p38 (bleu) et **SB2**-p38 (rouge). 70
- Figure 2.7 :** Graphiques RMSD des composés étudiés **4a** (vert), **5a** (bleu) et **SB2** (rouge) au cours des 10 ns de simulations de dynamique moléculaire. 71
- Figure 2.8 :** Tracés calculés de **A**- SASA de la protéine ; **B**- rayon de giration pour les trois complexes étudiés **4a**-p38 (vert), **5a**-p38 (bleu) et **SB2**-p38 (rouge) à travers les 10 ns de simulation de dynamique moléculaire. 72

### PARTIE 3

- Figure 3.1 :** Diamètres d'inhibition des composés (**3a-i**) et du médicament standard. 129
- Figure 3.2 :** Résultats de l'activité antibactérienne des chalcones (**3a-i**) testées contre *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*. 130
- Figure 3.3 :** Résultats de l'activité antifongique des chalcones (**3a-j**) synthétisées testées contre *Candida. Albicans* et *Aspergillus. Niger*. 131
- Figure 3.4 :** Résultats de l'activité antifongique des chalcone-oximes (**4a-c, e, h, i**) et de l'isoxazoline **5j** synthétisées testées contre *Candida. Albicans* et *Aspergillus. Niger*. 132
- Figure 3.5 :** CMI de la chalcone **3a** contre *Candida. Albicans*. 133

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 3.6</b> : CMI de la chalcone <b>3d</b> contre <i>Candida. Albicans</i> .  | 133 |
| <b>Figure 3.7</b> : CMI de la chalcone <b>3b</b> contre <i>Candida. Albicans</i> .  | 134 |
| <b>Figure 3.8</b> : CMI de la chalcone <b>3e</b> contre <i>Candida. Albicans</i> .  | 134 |
| <b>Figure 3.9</b> : CMI de la chalcone <b>3d</b> contre <i>Aspergillus. Niger</i> .   | 135 |
| <b>Figure 3.10</b> : CMI de la chalcone <b>3c</b> contre <i>Aspergillus. Niger</i> .  | 136 |
| <b>Figure 3.11</b> : CMI de la chalcone <b>3h</b> contre <i>Aspergillus. Niger</i> .  | 136 |
| <b>Figure 3.12</b> : CMI de la chalcone <b>4h</b> contre <i>Candida. Albicans</i> .   | 136 |
| <b>Figure 3.13</b> : Diamètres d'inhibition des composés synthétisés et de la référence<br>(agent antifongique).  | 137 |
| <b>Figure 3.14</b> : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration<br>des différents composés <b>3</b> , <b>4</b> , <b>5</b> et <b>AA</b> .   | 138 |
| <b>Figure 3.15</b> : Superposition de la conformation dockée (bâtons bleus) sur la<br>structure cristallographique du ligand HBP (bâtons rose).<br>Le squelette de la protéine est représenté par un dessin vert. | 140 |
| <b>Figure 3.16</b> : Superposition des conformations dockées des composés<br>synthétisés sur le ligand cristallographique (bâtons verts).   | 140 |
| <b>Figure 3.17</b> : Vue de la conformation dockée du composé <b>G</b> avec la protéine<br>fep-mAChE.   | 141 |
| <b>Figure 3.18</b> : Vue de la conformation dockée du composé <b>A</b> avec la protéine<br>fep-mAChE.   | 143 |
| <b>Figure 3.19</b> : Tracés RMSD des atomes C $\alpha$ du squelette des complexes composé<br><b>A</b> - fep-mAChE (bleu), composé <b>F</b> -fep-mAChE (rouge) et composé<br><b>G</b> -fep-mAChE (vert).           | 144 |
| <b>Figure 3.20</b> : Graphiques RMSD des composés étudiés <b>A</b> (bleu), <b>F</b> (rouge) et  |     |

**G** (vert) pendant les 20 ns de simulations de dynamique moléculaire. 145

**Figure 3.21 :** Tracé de l'énergie d'interaction entre fep-mAChE et les composés :

**A** (bleu), **F** (rouge) et **G** (vert) pendant les 20 ns de la simulation de  
dynamique moléculaire. 146

**Figure 3.22:** Courbes de rayon de giration prédites pour les trois complexes

étudiés : composé **A**- fep-mAChE (bleu), composé **F**- fep-mAChE  
(rouge) et composé **G**-fep-mAChE (vert). 147

# Sommaire

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

## PARTIE 1

### Chapitre 1

#### *Synthèse bibliographique.*

|  |          |
|--|----------|
| <b>I. COUMARINES.....</b>  | <b>3</b> |
| I.1. Introduction.....   | 3        |
| I.2. Structure générale et historique de la coumarine.....         | 3        |
| I.3. Classification.....   | 4        |
| I.3.1. Les coumarines simples (benzo- $\alpha$ -pyrones).....      | 4        |
| I.3.2. Les furocoumarines (furobenzo- $\alpha$ -pyrones).....      | 4        |
| I.3.3. Les pyranocoumarines (benzodipyran-2-ones.....              | 4        |
| I.3.4. Coumarines substituées au pyrone.....                       | 4        |
| I.3.5. Les phénylcoumarines (benzo-benzo-pyrones).....             | 4        |
| I.4. Différentes méthodes de synthèses des coumarines.....         | 5        |
| I.4.1. Synthèse des coumarines par la réaction de Perkin.....      | 5        |
| I.4.2. Synthèse des coumarines par la réaction de Pechmann.....    | 6        |
| I.4.3. Synthèse des coumarines par la réaction de Knoevenagel..... | 6        |
| I.4.4. Synthèse des coumarines par la réaction de Wittig.....      | 6        |
| I.4.5. Synthèse des coumarines par la réaction de Reformatsky..... | 7        |
| I.5. Propriétés biologiques des coumarines.....                    | 7        |
| I.5.1. Activité anticoagulante.....                                | 7        |
| I.5.2. Activité anti-inflammatoire et antalgique.....              | 8        |
| I.5.3. Activité antidiabétiques et antioxydante.....               | 8        |
| I.5.4. Activité antibiotique.....                                  | 8        |
| I.5.5. Activité anti-tumorale.....                                 | 9        |
| I.5.6. Activité antidépressive.....                                | 9        |
| I.5.7. Autres applications des coumarines.....                     | 10       |
| I.6. Phototoxicité des coumarines et furocoumarines.....           | 10       |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>II. CHALCONES, OXIMES, ISOXAZOLINES</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>II.1. CHALCONES</b> .....   | <b>11</b> |
| II.1.1. Introduction .....   | 11        |
| II.1.2. Origine .....  | 12        |
| II.1.3. Méthodes de synthèse des chalcones.....  | 12        |
| II.1.3.1. La condensation de Claisen-Schmidt .....                                       | 13        |
| II.1.3.2. Le couplage de Heck .....  | 13        |
| II.1.3.3. Le couplage de Suzuki-Miyaura.....   | 13        |
| II.1.3.4. Le couplage de Sonogashira .....   | 14        |
| II.1.3.5. La réaction de Friedel et Crafts .....   | 14        |
| II.1.4. Intérêt des chalcones en tant qu'intermédiaires de synthèse .....                | 15        |
| II.1.5. Propriétés biologiques des chalcones .....                                       | 15        |
| II.1.5.1 : Activité anticancéreuse.....  | 16        |
| II.1.5.2 : Activité anti-inflammatoire .....   | 16        |
| II.1.5.3. Activité antioxydante.....   | 17        |
| <b>II.2. OXIMES</b> .....  | <b>17</b> |
| II.2.1. Structure chimique d'une oxime.....  | 18        |
| II.2.2. Méthodologies de synthèse de quelques oximes .....                               | 18        |
| II.2.2.1. Synthèse d'oximes à partir de chalcones stéroïdiennes .....                    | 18        |
| II.2.2.2. Synthèse des oximes à partir de chalcones dérivées de l'acétophénone .....     | 18        |
| II.2.2.3. Synthèse de nouveaux éthers oximes .....                                       | 19        |
| II.2.3. Efficacité de nouvelles oximes comme réactivateurs de l'acétylcholinestérase ... | 19        |
| <b>II.3. ISOXAZOLINES</b> .....  | <b>21</b> |
| II.3.1. Introduction .....   | 21        |
| II.3.2. Approches synthétiques des isoxazolines.....                                     | 21        |
| II.3.3. Profil pharmacologique des dérivés de l'isoxazoline.....                         | 22        |
| II.3.4. Études des essais cliniques .....  | 23        |
| <b>III. Conclusion</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>Références bibliographiques</b> .....   | <b>26</b> |

## **PARTIE 2**

### **Chapitre 1**

*Synthèse des benzoylchromènes et des chroméno-chromènes en présence de la triéthylamine ou d'un polyoxométallate de type Keggin ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) comme catalyseur. Etude du mécanisme réactionnel mis en jeu et interprétation théorique des résultats obtenus.*

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. Introduction.....</b>   | <b>37</b> |
| II. Historique de la réaction.....  | 38        |
| III. Contrôle de la sélectivité de la réaction des 2-hydroxyarylaldehydes<br>et de la 4-hydroxycoumarine..... | 39        |
| III.1. Effet du solvant .....   | 40        |
| III.2. Effet de la nature et de la quantité du catalyseur.....  | 41        |
| III.3. Effet du substituant.....  | 42        |
| III.4. Effet du temps sur la synthèse des composés <b>4</b> et <b>5</b> .....                                 | 44        |
| IV. Caractérisations spectroscopiques des produits synthétisés <b>4</b> et <b>5</b> .....                     | 44        |
| IV.1. Etude par spectrométrie de masse électro spray (MS-ESI <sup>+</sup> ).....                              | 44        |
| IV.2. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H des composés <b>4</b> et <b>5</b> .....                      | 45        |
| IV.2.1. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4a</b> .....                                 | 46        |
| IV.2.2. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4b</b> .....                                 | 46        |
| IV.2.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4c</b> .....                                 | 47        |
| IV.2.4. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4d</b> .....                                 | 47        |
| IV.2.5. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4e</b> .....                                 | 47        |
| IV.2.6. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4f</b> .....                                 | 47        |
| IV.2.7. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4g</b> .....                                 | 48        |
| IV.2.8. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>5a</b> .....                                 | 49        |
| IV.2.9. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>5b</b> .....                                 | 49        |
| IV.2.10. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>5c</b> .....                                | 50        |
| IV.2.11. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>5f</b> .....                                | 50        |
| IV.2.12. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>5g</b> .....                                | 50        |
| IV.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C des composés <b>4</b> et <b>5</b> .....                     | 52        |
| V. Etude du mécanisme de la réaction .....  | 53        |
| <b>VI. Conclusion .....</b>   | <b>56</b> |
| Partie expérimentale.....   | 57        |

## Chapitre 2

### *Evaluation de l'activité antioxydante in-vitro, docking et étude de la dynamique moléculaire des benzoylchromènes et des chroméno-chromènes.*

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. Introduction.....</b>   | <b>64</b> |
| II. Evaluation de l'activité antioxydante des dérivées du 6 <i>H</i> ,7 <i>H</i> -7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3- <i>b</i> ][1]benzopyran-6-ones ( <b>4a-g</b> ) et 3-(2-hydroxybenzoyl)-2 <i>H</i> -chromèn-2-ones ( <b>5a-c, 5f, 5g</b> ) ..... | 64        |
| II.1. Pourcentage d'inhibition (RSA) .....  | 65        |
| II.2. Concentration Minimale Inhibitrice IC <sub>50</sub> .....   | 66        |
| III. Mise en docking moléculaire .....  | 67        |
| IV. Études de dynamique moléculaire .....   | 70        |
| <b>V. Conclusion.....</b>   | <b>73</b> |
| Partie expérimentale .....  | 74        |
| Références bibliographiques .....   | 76        |

## **PARTIE 3**

### Chapitre 1

#### *Synthèse de cétones $\alpha,\beta$ -insaturées dérivées de la 4-acétylpyridine, de nouvelles chalcone-oximes et d'une isoxazoline dérivée de l'indole.*

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. Introduction.....</b>   | <b>78</b> |
| II. Synthèse des chalcones : ( <i>E</i> )-3-aryl-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one ( <b>3a-i</b> ), (2 <i>E</i> )-3-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-on ( <b>3j</b> ) ..... | 78        |
| II.1. Synthèse du ( <i>E</i> )-1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophèn-2-yl)prop-2-èn-1-one <b>3a</b> .....  | 79        |
| II.1.1. Etude par spectroscopie de masse électrospray LC-MS (ESI (+)) .....   | 80        |
| II.1.2. Etude par spectroscopie RMN du proton <sup>1</sup> H .....  | 80        |
| II.1.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C .....   | 81        |

|   |    |
|---|----|
| II.1.4. Etude par spectroscopie UV-Visible .....  | 82 |
| II.1.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge .....   | 82 |
| II.2. Synthèse du ( <i>E</i> )-1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophèn-3-yl)prop-2-èn-1-one <b>3b</b> .....          | 82 |
| II.2.1. Etude par spectroscopie de masse électrospray LC-MS (ESI (+)) .....                               | 83 |
| II.2.2. Etude par spectroscopie RMN du proton <sup>1</sup> H .....  | 83 |
| II.2.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C .....   | 84 |
| II.2.4. Etude par spectroscopie UV-Visible .....  | 84 |
| II.2.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge .....   | 85 |
| II.3. Synthèse du (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-1-phényl-5-(pyridin-4-yl)penta-2,4-dien-1-one <b>3c</b> ..... | 85 |
| II.3.1. Etude par spectroscopie de masse électrospray LC-MS (ESI (+)) .....                               | 85 |
| II.3.2. Etude par spectroscopie RMN du proton <sup>1</sup> H .....  | 85 |
| II.3.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C .....   | 86 |
| II.3.4. Etude par spectroscopie UV-Visible .....  | 87 |
| II.3.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge .....   | 87 |
| II.4. Synthèse du ( <i>E</i> )-3-phényl-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one <b>3d</b> .....                   | 87 |
| II.4.1. Etude par spectroscopie de masse électrospray LC-MS (ESI (+)) .....                               | 87 |
| II.4.2. Etude par spectroscopie RMN du proton <sup>1</sup> H .....  | 88 |
| II.4.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C .....   | 89 |
| II.4.4. Etude par spectroscopie UV-Visible .....  | 89 |
| II.4.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge .....   | 89 |
| II.5. Synthèse du ( <i>E</i> )-3-(4-méthoxyphényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one <b>3e</b> .....        | 90 |
| II.5.1. Etude par spectroscopie de masse électrospray LC-MS (ESI (+)) .....                               | 90 |
| II.5.2. Etude par spectroscopie RMN du proton <sup>1</sup> H .....  | 90 |
| II.5.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C .....   | 91 |

|   |     |
|---|-----|
| II.5.4. Etude par spectroscopie UV-Visible .....  | 92  |
| II.5.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge .....   | 92  |
| II.6. Synthèse du ( <i>E</i> )-3-(4-nitrophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one <b>3f</b> .....      | 92  |
| II.6.1. Etude par spectroscopie de masse électrospray LC-MS (ESI (+)) .....                           | 93  |
| II.6.2. Etude par spectroscopie RMN du proton <sup>1</sup> H .....                                    | 93  |
| II.6.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C .....   | 94  |
| II.6.4. Etude par spectroscopie UV-Visible .....  | 94  |
| II.6.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge .....   | 94  |
| II.7. Synthèse du ( <i>E</i> )-3-(3-nitrophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one <b>3g</b> .....      | 95  |
| II.7.1. Etude par spectroscopie de masse haute résolution ((HRMS) (ESI <sup>+</sup> )) .....          | 95  |
| II.7.2. Etude par spectroscopie RMN du proton <sup>1</sup> H .....                                    | 95  |
| II.7.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C .....   | 96  |
| II.7.4. Etude par spectroscopie UV-Visible .....  | 97  |
| II.7.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge .....   | 97  |
| II.8. Synthèse du ( <i>E</i> )-3-(4-chlorophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one <b>3h</b> .....     | 98  |
| II.8.1. Etude par spectroscopie de masse haute résolution ((HRMS) (ESI <sup>+</sup> )) .....          | 98  |
| II.8.2. Etude par spectroscopie RMN du proton <sup>1</sup> H .....                                    | 98  |
| II.8.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C .....   | 99  |
| II.8.4. Etude par spectroscopie UV-Visible .....  | 99  |
| II.8.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge .....   | 100 |
| II.9. Synthèse du ( <i>E</i> )-3-(2,6-dichlorophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one <b>3i</b> ..... | 100 |
| II.9.1. Etude par spectroscopie de masse haute résolution ((HRMS) (ESI <sup>+</sup> )) .....          | 100 |
| II.9.2. Etude par spectroscopie RMN du proton <sup>1</sup> H .....                                    | 100 |
| II.9.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C .....   | 101 |
| II.9.4. Etude par spectroscopie UV-Visible .....  | 102 |

|  |            |
|--|------------|
| II.9.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge .....  | 102        |
| II.10. Synthèse du (2 <i>E</i> )-3-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-on <b>3j</b> .....               | 102        |
| II.10.1. Etude par spectroscopie de masse haute résolution ((HRMS) (ESI <sup>+</sup> )).....                             | 103        |
| II.10.2. Etude par spectroscopie RMN du proton <sup>1</sup> H .....  | 103        |
| II.10.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C .....   | 104        |
| II.10.4. Etude par spectroscopie UV-Visible .....  | 105        |
| III. Synthèse des chalcone-oximes ( <b>4a-c, e, h, i</b> ) .....   | 105        |
| III.1. Etude par spectroscopie de masse haute résolution ((HRMS) (ESI <sup>+</sup> )).....                               | 105        |
| III.2. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H des chalcone-oximes ( <b>4a-c, e, h, i</b> ) .....                     | 106        |
| III.2.1. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4a</b> .....   | 108        |
| III.2.2. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4b</b> .....   | 108        |
| III.2.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4c</b> .....   | 109        |
| III.2.4. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4e</b> .....   | 109        |
| III.2.5. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4h</b> .....   | 110        |
| III.2.6. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>4i</b> .....   | 110        |
| III.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C des composés ( <b>4a-c, e, h, i</b> ) .....                           | 111        |
| III.4. Etude par spectroscopie UV-Visible des chalcone-oximes ( <b>4a-c, e, h, i</b> ).....                              | 112        |
| III.5. Etude par spectroscopie IR des chalcone-oximes ( <b>4a-c, e, h</b> ).....   | 112        |
| IV. Synthèse 3-(3-(pyridin-4-yl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)-1 <i>H</i> -indole <b>5j</b> .....                            | 113        |
| IV.1. Etude par spectroscopie de masse haute résolution ((HRMS) (ESI <sup>+</sup> )) .....                               | 113        |
| IV.2. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup> H du composé <b>5j</b> .....  | 114        |
| IV.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup> C des composés <b>5j</b> .....   | 115        |
| IV.4. Etude par spectroscopie UV-Visible du composé <b>5j</b> .....  | 115        |
| IV.5. Etude par spectroscopie IR du 3-(3-(pyridin-4-yl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)-<br>1 <i>H</i> -indole <b>5j</b> ..... | 115        |
| <b>V. Conclusion</b> .....   | <b>116</b> |
| Partie expérimentale .....   | 117        |

## Chapitre 2

*Evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante in-vitro des cétones  $\alpha,\beta$ -insaturées, des chalcone-oximes et de l'isoxazoline. Docking moléculaire des nouvelles oximes comme ligands de l'acétylcholinestérase.*

|   |            |
|---|------------|
| <b>I. Introduction.....</b>   | <b>127</b> |
| II. Activité antimicrobienne .....  | 128        |
| II.1. Activité antibactérienne des chalcones ( <b>3a-i</b> ).....   | 128        |
| II.2. Activité antifongique des chalcones ( <b>3a-j</b> ), des chalcone-oximes<br>( <b>4a-c, 4e, 4h, 4i</b> ) et du composé <b>5j</b> ..... | 130        |
| III. Activité antioxydante des chalcones ( <b>3a-j</b> ), des chalcone-oximes<br>( <b>4a-c, 4e, 4h, 4i</b> ) et du composé <b>5j</b> .....  | 137        |
| IV. Prédiction en silico de la barrière hémato-encéphalique.....  | 139        |
| V. Génération des paramètres d'amarrage.....  | 139        |
| VI. Mode de liaison des composés étudiés .....  | 140        |
| VII. Simulations de dynamique moléculaire.....  | 143        |
| <b>VIII. Conclusion .....</b>   | <b>148</b> |
| Partie expérimentale.....   | 149        |
| Références bibliographiques .....   | 153        |
| <b>Conclusion générale .....</b>  | <b>158</b> |
| Annexe .....  | 159        |

# Introduction générale

## **Introduction générale**

Les composés hétérocycliques dont l'hétéroatome est un atome d'oxygène, d'azote ou de soufre sont très présents dans le squelette de nombreuses molécules naturelles. Ces hétérocycles comme les vitamines B12 et E ou les bases pyrimidiques et puriques de l'ADN, jouent un rôle vital dans le métabolisme cellulaire. Certains présentent aussi des intérêts divers pour les industries cosmétiques et agricoles.

Ces composés constituent une classe importante de molécules qui présentent divers sites actifs pour la définition de médicaments efficaces. Le développement de nouveaux composés pour diverses cibles biologiques ayant une importance thérapeutique appropriée est un défi majeur en chimie médicinale. En raison de leur immense profil biologique, ces fragments hétérocycliques, qu'ils soient seuls ou sous forme fusionnées, sont continuellement exploités par les chercheurs pour le développement de nouveaux médicaments.

Il existe dans la littérature de nombreuses méthodes permettant la synthèse de différents hétérocycles. Les problèmes de régio et stéréosélectivité de ces réactions d'hétérocyclisations intramoléculaires sont les difficultés majeures et représentent un grand challenge pour les chimistes organiciens.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail réside dans la synthèse sélective par catalyse acide/base de composés hétérocycliques présentant diverses activités biologiques. Il s'agit de composés *6H,7H*-7-(4-hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-ones, des 3-(2-hydroxybenzoyl)-*2H*-chromèn-2-ones, chalcones dérivées de la 4-acétylpyridine, des oximes et isoxazoline.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse sont représentés en trois parties :

La première partie est consacrée à des rappels bibliographiques afin de montrer l'importance des composés hétérocycliques et quelques méthodes de leur obtention, notamment les composés dérivés des coumarines, les chalcones, les oximes et les isoxazolines.

La seconde partie comporte deux chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une étude de sélectivité de la réaction de la 4-hydroxycoumarine avec une série d'*o*-hydroxyarylaldehydes, réalisée dans différentes conditions (différents solvants et catalyseurs), sous différents modes

d'activation afin de contrôler la formation des deux produits hétérocycliques possibles. L'interprétation des résultats et du mécanisme de la réaction sont de plus décrits dans ce chapitre.

- Le deuxième chapitre regroupe les résultats *in-vitro* de l'activité antioxydante et ceux du docking moléculaire réalisé afin d'évaluer le potentiel biologique des produits obtenus comme agents anti-cancéreux.

De même, la troisième partie est subdivisée en deux chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à la synthèse d'une série de chalcones par condensation de la 4-acétylpyridine sur différents aldéhydes aromatiques, ces chalcones sont utilisées comme matières premières pour obtenir une autre série de nouvelles oximes. L'interprétation des résultats et la détermination structurale des composés obtenus sont aussi rapportées dans ce chapitre.
- Le second chapitre décrit les résultats *in-vitro* de l'activité antioxydante et de l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) des deux séries synthétisées. Nous rapportons tout autant dans ce chapitre les résultats du docking moléculaire réalisé sur les oximes afin de tester leur pouvoir inhibiteur contre l'acétylcholinestérase et l'étude de la dynamique moléculaire de ces produits pour démontrer leur stabilité.

# Partie 1

# Chapitre 1

## *Synthèse bibliographique*

## I. COUMARINES

### I.1. Introduction

Les coumarines et leurs dérivés sont largement utilisés comme composants actifs dans la formulation des pesticides et des additifs dans la fabrication de produits pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques <sup>[1]</sup>. Plus de 1300 coumarines ont été identifiées, étant signalées comme ayant des activités biologiques multiples <sup>[2]</sup> ; elles ont également été utilisées comme agents d'azurage optique, colorants laser et marqueurs fluorescents pour analyser divers composés, par exemple, les alcools, les acides carboxyliques <sup>[3]</sup>. Les activités biologiques variées des coumarines fusionnées avec d'autres hétérocycles ont encouragé les chercheurs à développer de nouveaux agents dérivés de la coumarine.

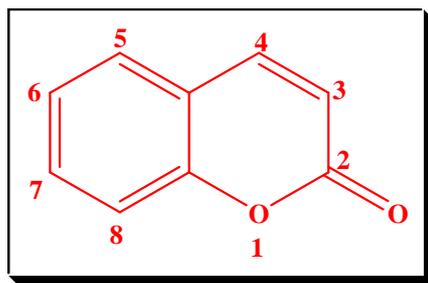
### I.2. Structure générale et historique de la coumarine

Historiquement, la coumarine tire son nom de « kumaru » d'une langue amérindienne, qui représente le nom de l'arbre « Tonka » **Fig.1.1** poussant en Amérique du sud, dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine. Cette molécule fut isolée pour la première fois en 1820 <sup>[4]</sup>.



**Figure 1.1** : Arbre Tonka.

La coumarine est classée dans la famille des composés benzopyroniques, qui consistent tous en un cycle benzénique relié à un noyau lactone (benzo- $\alpha$ -pyrone) formant alors un noyau coumarine simple **Fig.1.2** <sup>[5]</sup>.



**Figure 1.2:** Structure chimique d'une coumarine (2*H*-1-benzopyrane-2-one).

### I.3. Classification

Il existe quatre principaux sous-types de coumarines **tableau 1.1** :

**I.3.1. Les coumarines simples (benzo- $\alpha$ -pyrones) :** coumarine, 7-hydroxycoumarine et 6,7-dihydroxycoumarine, sont les dérivés hydroxylés, alcoxylés et alkylés du composé parent la coumarine, ainsi que leurs glycosides [5].

**I.3.2. Les furocoumarines (furobenzo- $\alpha$ -pyrones) :** résultent de la fusion d'un cycle furane en position 6 et 7 (furocoumarines linéaires) ou en position 7 et 8 (furocoumarines angulaires) sur un noyau coumarine simple [5].

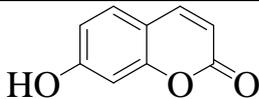
**I.3.3. Les pyranocoumarines (benzodipyran-2-ones) :** résultent de la fusion d'un cycle pyrane sur un noyau coumarine simple, formant alors aussi des pyranocoumarines linéaires et angulaires [5].

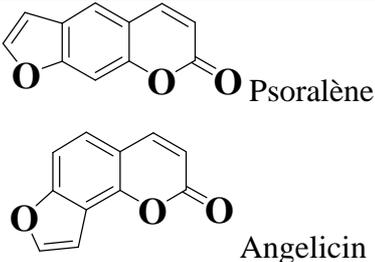
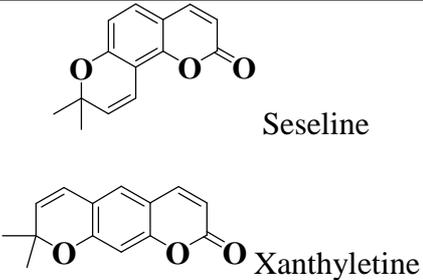
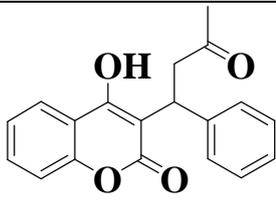
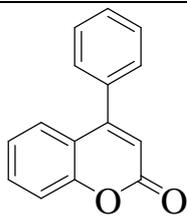
**I.3.4. Coumarines substituées au pyrone :** coumarines substituées dans la pyrone comprennent la 4-hydroxycoumarine [6].

**I.3.5. Les phénylcoumarines (benzo-benzo-pyrones) :** résultent de la fusion d'un cycle phényl sur un noyau coumarine simple et sont issues du métabolisme de l'isoflavone, contrairement aux autres coumarines qui dérivent toutes de la même voie de biosynthèse [7].

La grande diversité des coumarines résulte dans l'ajout de groupements chimiques à ces quatre structures de base, telles que des hydroxylations, des méthyloxylation, des prénylation, des géranylation ou encore des époxydation [7].

**Tableau 1.1:** Exemples de chaque sous-type de coumarine [5, 6, 7].

| Classification     | Caractéristiques   | Exemples  |
|--------------------|--|---|
| Coumarines simples | Hydroxylés, alcoxylés ou alkylés sur le cycle du benzène | <br>7-Hydroxycoumarine |

|                                  |   |  |
|----------------------------------|---|--|
| Furocoumarines                   | Cycle de furanne à 5 membres fixé au benzène. Linéaire ou angulaire | <br>Psoralène<br>Angelicin   |
| Pyranocoumarines                 | Cycle à 6 membres (pyrane) fixé au benzène. Linéaire ou angulaire   | <br>Seseline<br>Xanthyletine |
| Coumarines substituées au pyrone | Substitution sur le pyrone, souvent à des positions 3-C ou 4-C      | <br>Warfarine               |
| Phénylcoumarines                 | fusion d'un cycle phényl sur un noyau coumarine simple              | <br>4-Phénylcoumarine     |

#### I.4. Différentes méthodes de synthèses des coumarines

Vu l'importance biologique de dérivés de la coumarine et leur fort potentiel chimique, plusieurs voies de synthèses ont été décrites dans la littérature, parmi lesquelles on peut citer la réaction de Perkin <sup>[8]</sup>, Pechmann <sup>[9]</sup>, Knoevenagel <sup>[10]</sup>, Wittig <sup>[11]</sup> et Reformatsky <sup>[12]</sup>.

##### I.4.1. Synthèse des coumarines par la réaction de Perkin

Perkin a d'abord synthétisé la coumarine à partir de l'aldéhyde salicylique, en le chauffant avec l'anhydride acétique et de l'acétate de sodium anhydride. Dans cette réaction il y a formation de l'intermédiaire dérivé d'acide o-hydroxycinnamique qui passe en lactone <sup>[5]</sup>

##### Schéma 1.1.

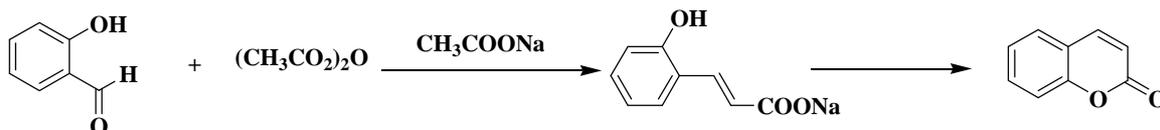


Schéma 1.1: Synthèse des coumarines par la réaction de Perkin.

#### I.4.2. Synthèse des coumarines par la réaction de Pechmann

Parmi les méthodes les plus simples et les plus utilisées pour la synthèse des coumarines, on trouve la réaction de Von Pechmann. Les coumarines sont obtenues par condensation de phénols avec des β-cétoester, en la présence de catalyseurs acides et donne de bons rendements des coumarines substituées en position 4 <sup>[9]</sup> Schéma 1.2.

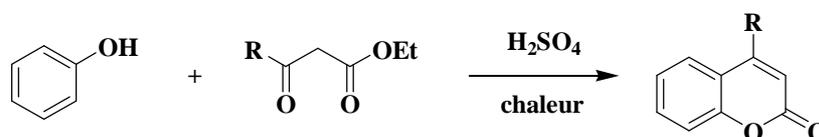


Schéma 1.2: Synthèse des coumarines par la réaction de Pechmann.

#### I.4.3. Synthèse des coumarines par la réaction de Knoevenagel

Knoevenagel a développé une méthode pour la synthèse des dérivés de la coumarine à partir de l'o-hydroxyarylaldehyde en les condensant avec les malonate d'éthyle, acétoacétate d'éthyle, cyanoacétate d'éthyle, en présence de la pipéridine, pyridine, et autres bases organiques <sup>[10]</sup> Schéma 1.3.

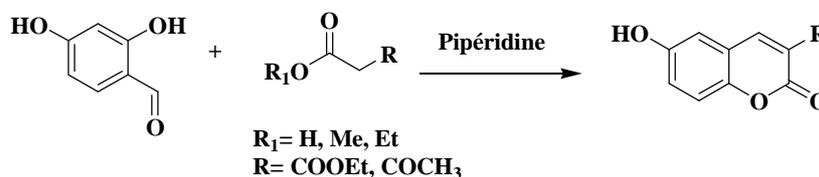


Schéma 1.3: Synthèse des coumarines par la réaction de Knoevenagel.

#### I.4.4. Synthèse des coumarines par la réaction de Wittig

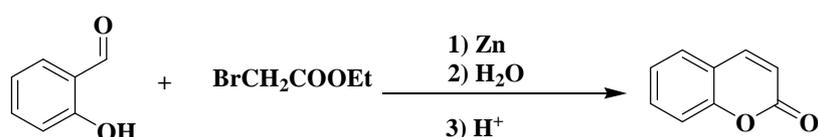
Dans cette réaction, le réactif de Wittig qui est le ylure de phosphore (appelé aussi phosphorane) agit par addition sur un composé carbonyle pour former des composés éthyléniques. Cette réaction fut développée par Bare et ces collaborateurs, en faisant réagir l'aldéhyde salicylique avec l'éthoxycarbonyl méthylène triphénylphosphorane dans le but de synthétiser les coumarines <sup>[11]</sup> Schéma 1.4.



Schéma 1.4: Synthèse des coumarines par la réaction de Wittig.

### I.4.5. Synthèse des coumarines par la réaction de Reformatsky

C'est une réaction qui se déroule entre un composé carbonylé tel qu'un aldéhyde, une cétone ou un ester et un alpha-halogénoïde, en présence de zinc elle représente une extension des réactions des composés carbonylés avec un zinc dialkyle ou un halogénure de zinc allylique <sup>[12]</sup> **Schéma 1.5.**



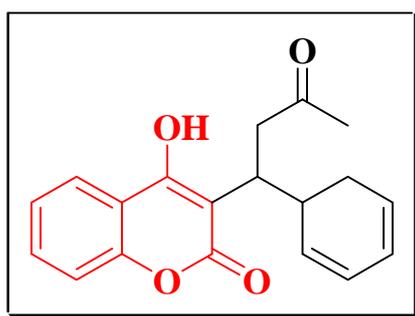
**Schéma 1.5:** Synthèse des coumarines par la réaction de Reformatsky.

## I.5. Propriétés biologiques des coumarines

Les coumarines possèdent plusieurs propriétés très intéressantes pour l'homme et sont parfois valorisées par les industries pharmaceutiques. L'activité de ces molécules dépend de la structure et de la nature des substituants <sup>[13]</sup>. Par exemple, elles sont bien connues pour leurs activités : anticoagulante <sup>[14]</sup>, anti-inflammatoire, antalgique <sup>[15,16]</sup>, antidiabétique, antioxydante <sup>[17]</sup>, antibiotique <sup>[18]</sup>, antitumorale <sup>[19]</sup> et antidépressive <sup>[20]</sup>.

### I.5.1. Activité anticoagulante

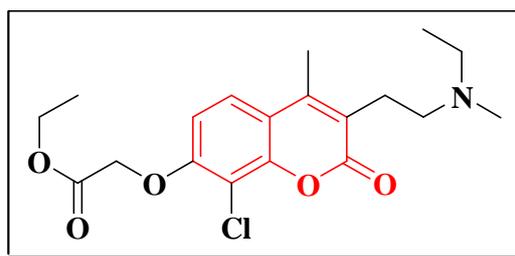
Aujourd'hui, la warfarine **Fig.1.3**, aussi appelée coumaphène, est une des molécules les plus utilisées en tant qu'anticoagulant oral. De façon générale, les médicaments coumariniques sont utilisés dans le but de prévenir la formation de caillots sanguins ou d'empêcher leur développement.



**Figure 1.3:** Warfarine.

### I.5.2. Activité anti-inflammatoire et antalgique

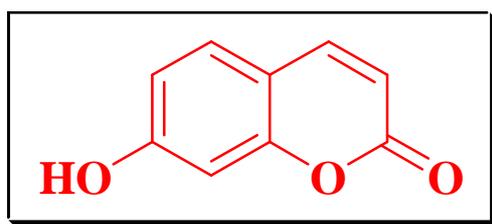
Certaines coumarines présentent aussi des propriétés anti-inflammatoires comme c'est le cas de celles présentes dans des extraits de *Murraya alata*, dont l'effet est comparable à celui de l'indométacine, un anti-inflammatoire couramment utilisé [12]. Ces coumarines agissent en inhibant la production de monoxyde d'azote, une molécule signal impliquée dans les processus inflammatoires. Des recherches faites par S. Han et ces collaborateurs ont montré que certains analogues des coumarines telles que le Cloricromène **Fig.1.4** possèdent une activité anti-inflammatoire et analgésique [13].



**Figure 1.4:** Cloricromène.

### I.5.3. Activité antidiabétique et antioxydante

Ramesh et Pugalendi ont montré que l'umbelliférone (7-hydroxycoumarine) **Fig.1.5** est une molécule hypoglycémiant qui permet de revenir à des taux normaux de glucose dans le sang (certainement via une augmentation du taux d'insuline sanguine) chez des rats rendus diabétiques. Dans cette même étude, il a été mis en évidence que l'umbelliférone possède également un pouvoir antioxydant chez ces rats.



**Figure 1.5 :** Umbelliférone.

### I.5.4. Activité antibiotique

Le Novobiocine **Fig.1.6**, est un antibiotique à base de coumarine. Il présente un large spectre d'activité contre les bactéries Gram positif, contrairement à la méthiciline qui résiste aux souches de type staphylocoque.

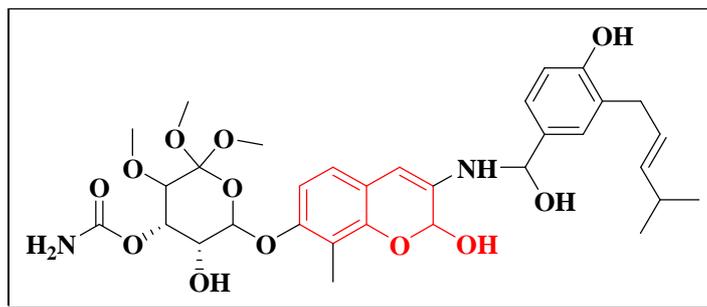


Figure 1.6: Novobiocine.

### I.5.5. Activité anti-tumorale

Les coumarines ont un potentiel cytotoxique pouvant s'avérer intéressant dans le cas d'un traitement anti-tumoral. Elles ont été classées parmi les molécules potentiellement cytotoxiques. Cette cytotoxicité est dépendante de la cellule ciblée. N. S. Reddy et *al.* [19] ont décrit les propriétés inhibitrices des cellules tumorales par des coumarin-3-(N-aryl) carboxamides **Fig.1.7**.

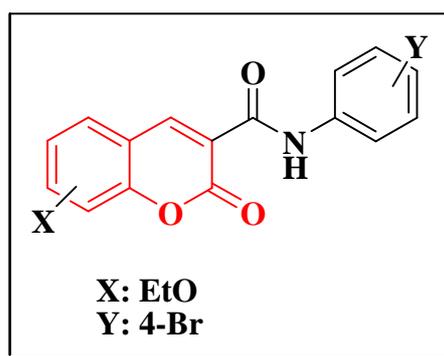
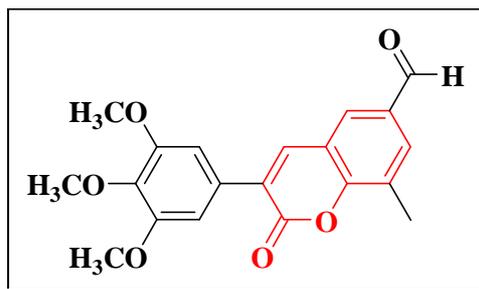


Figure 1.7: Coumarin-3-(N-aryl) carboxamides.

### I.5.6. Activité antidépressive

Plus récemment, une étude effectuée sur des souris en condition de nage forcée a montré que le temps d'immobilité, représentant une résignation de l'animal associée à un comportement dépressif était réduit chez les souris ayant reçu une dose optimale de coumarines **Fig.1.8**.



**Figure 1.8:** Dérivé de la 3-phénylcoumarine.

### I.5.7. Autres applications des coumarines

Les propriétés fluorescentes inhérentes de plusieurs coumarines sont un facteur clé dans de nombreuses applications. Les domaines dans lesquels les coumarines sont largement utilisées comprennent l'estimation de l'activité enzymatique (dérivés de la 7-hydroxycoumarine en tant que substrats d'enzymes fluorogènes) [21], le marquage des protéines, des anticorps, de l'ADN et des lipides (anticorps de marquage fluorescent à l'acide aminométhylcoumarine acétique et lectines pour la coloration). Elles sont également employées comme agents de dérivation en chromatographie, colorants pour le réglage des lasers dans l'analyse des ions (7-amino-4-méthylcoumarine, 4-méthylumbelliférone), indicateurs d'ions intracellulaires et pour la détection du pH et des gaz. La 3,4-dichloroisocoumarine est un marqueur commercial, relativement inhibiteur non toxique, qui présente une bonne réactivité avec un grand nombre de sérine-protéases [22].

La coumarine a une grande variété d'utilisations dans l'industrie, principalement en raison de sa forte odeur parfumée [21]. Ses utilisations comprennent celle d'un édulcorant et fixateur de parfums (3,4-dihydrocoumarine).

### I.6. Phototoxicité des coumarines et furocoumarines

Plusieurs espèces d'agrumes ont causé des dermatites chez les humains. Les limes (*Citrus aurantifolia*) contiennent des coumarines, des furocoumarines (psoralènes) et des pyranocoumarines. Les psoralènes photosensibilisants ont été signalés, ils génèrent des photodermatites chez l'homme [23]. Malgré que le phénomène de photocycloaddition des furocoumarines sur l'ADN est détourné dans le cadre de la P-UVA thérapie pour traiter les maladies de peau, il se révèle aussi problématique chez des personnes saines exposées à des furocoumarines et aux UV. Cependant, une telle exposition peut causer dans les 24 heures des dermatites **Fig.1.9**, parfois graves, telles que des brûlures, des gonflements, une

hyperpigmentation de la peau ou encore des cloques [24]. Ces phénomènes de phototoxicité peuvent aussi bien se produire suite à un contact cutané [25], que suite à l'ingestion de furocoumarines présentes dans des plantes, comme les chénopodes parfois cuisinés et mangés frais [26].



**Figure 1.9:** Photophytophotodermatose chez un patient ayant été en contact avec des furocoumarines et s'étant exposé au soleil.

## II. CHALCONES, OXIMES ET ISOXAZOLINES

### II.1. CHALCONES

#### II.1.1. Introduction

Les chalcones (1,3-diarylprop-2-èn-1-one) sont des flavonoïdes naturels ou synthétiques présentant un éventail impressionnant de propriétés biologiques **Fig.1.10** [27]. Elles sont constituées d'un système conjugué contenant l'entité prop-2-èn-1-one lié à chaque extrémité un groupe aryle [28]. Les chalcones peuvent exister sous forme de deux stéréo-isomères (*Z*) et (*E*) en fonction de la disposition des substituants autour de la double liaison centrale. La configuration de la double liaison est généralement *E* dans les chalcones naturelles. Ces composés sont rarement substitués sur le cycle b.

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 [29]. 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 [30,31]. Ces dérivés sont caractérisés par des groupes différents et actifs comme le : chlore, méthoxy, hydroxy, nitro (Cl, OMe, OH, NO<sub>2</sub>) dans les cycles aromatiques [32]. Ils sont également considérés comme d'importants intermédiaires de synthèse pour la préparation de flavonoïdes et les isoflavonoïdes, qui sont largement présents dans les plantes non comestibles [29]. Les

chalcones sont présentes dans de nombreuses plantes, il est néanmoins possible de les mettre au point en laboratoire.

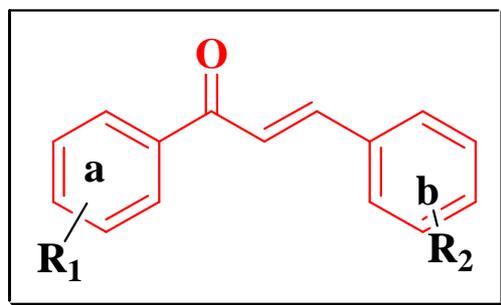


Figure 1.10: Structure générale de la chalcone.

### II.1.2. Origine

Chalcones ou benzylidèneacétophénonnes sont des constituants importants de sources naturelles. Elles ont été isolées d'abord à partir de réglisse chinoise (*Glycyrrhizae inflata*) [33]. 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 chalcone ne peut être isolée en raison de la présence de l'enzyme chalcone synthétase (CSH) qui convertit immédiatement la chalcone en flavanones [34] **Fig.1.11**.

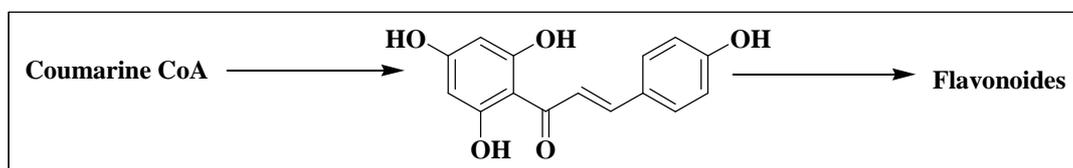


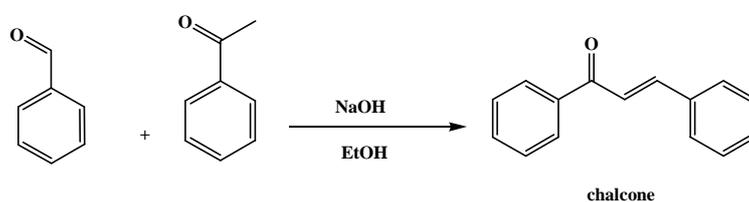
Figure 1.11: Modifications biochimiques des chalcones.

### II.1.3. Méthodes de synthèse des chalcones

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune. Cette voie de biosynthèse passe d'abord par l'élaboration des chalcones pour ensuite conduire aux autres classes de flavonoïdes [35]. S'il n'y a qu'une seule voie de biosynthèse pour les chalcones, il y a en revanche une plus grande diversité quant à leur mode de synthèse; en voici quelques exemples.

### II.1.3.1. Condensation de Claisen-Schmidt

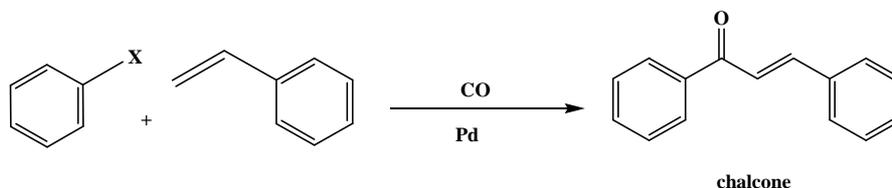
La condensation de *Claisen-Schmidt* est la méthode la plus simple et la plus couramment utilisée pour la synthèse des chalcones [36]. Il s'agit d'une réaction d'aldolisation-crotonisation, entre une acétophénone et un benzaldéhyde, qui peut être catalysée par une base ou un acide, dans un solvant polaire à température ambiante [35,37] **Schéma 1.6**. Un large panel de chalcones substituées peut être obtenu facilement grâce à la présence de plusieurs dérivés d'acétophénone et de benzaldéhydes dans le commerce. Les rendements de ce type de réaction varient selon les substitutions présentes sur les réactifs de départ (20-90%) **Schéma 1.6**.



**Schéma 1.6 :** Condensation de *Claisen-Schmidt* catalysée par la soude dans un alcool.

### II.1.3.2 Couplage de Heck

Dans le cadre du couplage de Heck, la réaction catalysée au palladium se produit entre un halogénure d'aryle et un styrène en présence de monoxyde de carbone (**Schéma 1.7**).



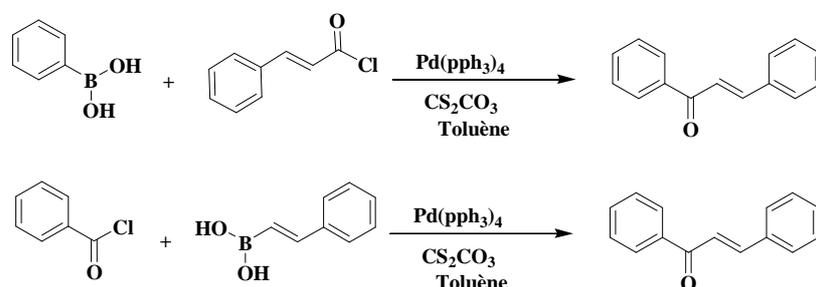
**Schéma 1.7:** Synthèse de chalcone par le couplage de Heck.

Cette réaction est notamment décrite dans les travaux de Wu et *al.* où elle est employée pour la synthèse d'une trentaine de chalcones [38]. Le catalyseur au palladium utilisé est le [(Cinnamyl)PdCl]<sub>2</sub> couplé à un ligand de type imidazolylphosphine. Les rendements oscillent entre 41 et 90% selon la nature des substituants présents sur les réactifs de départ.

### II.1.3.3. Couplage de Suzuki-Miyaura

La synthèse de chalcones par le couplage Suzuki-Miyaura est notamment rapportée par Selepe *et al.* [39]. Le couplage est une réaction catalysée par le palladium, entre un dérivé d'acide boronique et un dérivé chloré, en présence de base dans le toluène anhydre. En

présence d'un acide aryl-boronique et le chlorure de cinnamoyl ou inversement le chlorure de benzoyl et l'acide styryl-boronique **Schéma 1.8**.

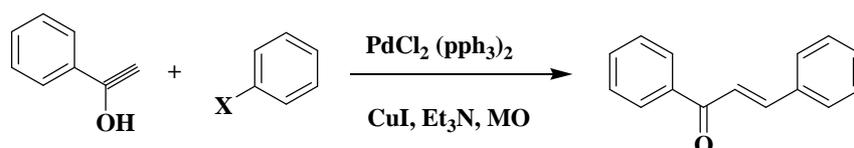


**Schéma 1.8:** Deux voies de synthèse des chalcones par le couplage de Suzuki.

Dans les travaux d'Eddarir *et al.*, la première voie de synthèse décrite au **Schéma 1.8** conduit à des rendements compris entre 41 et 51 %, cette variation dépend de la nature des substituants présents sur les cycles aromatiques. La deuxième voie de synthèse permet d'augmenter largement les rendements puisqu'ils sont compris entre 68 et 93% [40]. Cette seconde méthode est très utilisée pour synthétiser des chalcones méthoxylées d'origine naturelle.

#### II.1.3.4. Couplage de Sonogashira

Les travaux de Schramm *et al.* décrivent la synthèse de chalcones via le couplage de Sonogashira. La réaction s'effectue entre un halogénure d'aryle et un alcool propargylique (1-phénylprop-2-yn-1-ol). La réaction est catalysée par le palladium et activée par irradiations microondes, en présence de la triéthylamine et d'iodure de cuivre (I) [41] **Schéma 1.9**.



**Schéma 1.9:** Synthèse de la chalcone par le couplage de Sonogashira.

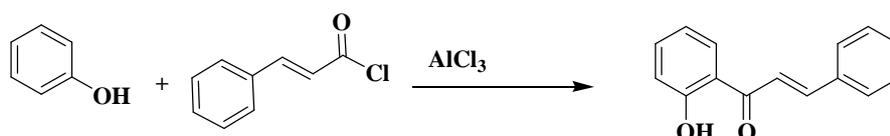
Les temps d'activation varient entre 15 et 30 minutes et les rendements de cette réaction sont entre 62 et 96% selon les substituants présents sur le cycle B. Des dérivés de chalcones tels que les pyridylchalcones ou les pyrimidylchalcones peuvent être également synthétisés avec cette méthode, les rendements sont de 78 et 84% respectivement.

#### II.1.3.5. Réaction de Friedel et Crafts

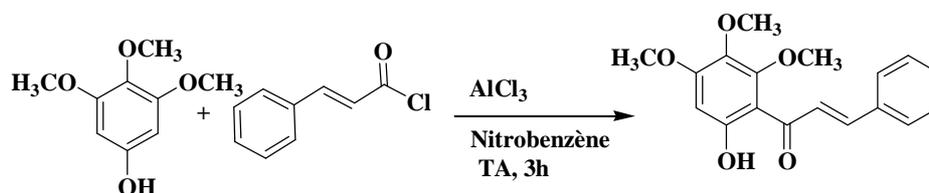
Les chalcones peuvent aussi être obtenues grâce à l'acylation d'un dérivé phénolique selon la réaction de Friedel et Crafts [42]. En générale, la réaction a lieu entre le phénol et le chlorure de cinnamoyl. L'acylation se fait en position *ortho* ou *para* dans le cas d'une

réaction sur le phénol suite à l'effet mésomère donneur de l'hydroxyle et peut donc conduire à deux chalcones différentes **Schéma 1.10 A**. La présence de d'autres substituants sur le dérivé phénolique détermine le site d'acylation. Un bon exemple d'utilisation de cette méthode est la synthèse de l'hélilandine B **Schéma 1.10 B**, décrite par Ichino *et al.*; celle-ci utilise le chlorure de cinnamoyl et le 3,4,5-triméthoxyphénol dans le nitrobenzène anhydre. Elle est catalysée par le chlorure d'aluminium et menée à température ambiante pendant 3h. La chalcone est alors obtenue avec un rendement de 22% [43].

A)



B)



**Schéma 1.10:** Exemple de la synthèse de chalcones par la réaction de Friedel et Crafts (A), synthèse de l'hélilandine B (B).

#### II.1.4. Intérêt des chalcones en tant qu'intermédiaires de synthèse

La relative facilitée de préparation, la diversité des voies de synthèse et la grande réactivité de certaines chalcones est un point de départ prometteur pour la préparation d'un grand nombre de composés ayant une grande importance sur le plan médical [44]. La présence du motif carbonyle  $\alpha$ - $\beta$  insaturé procure à ces molécules une grande réactivité, ce qui permet de synthétiser des composés hétérocycliques tels que des cyanopyridines [45], des iso-oxazoles [46], des pyrazolines [47], pyrazoles [48] ou des pyrimidines [49].

#### II.1.5. Propriétés biologiques des chalcones

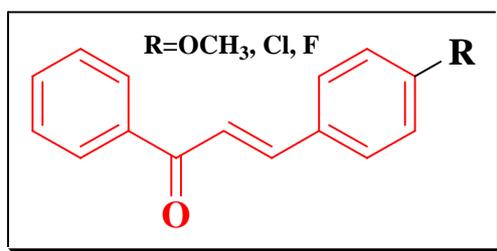
Les chalcones et leurs dérivés ont suscité un intérêt particulier au cours des dernières décennies en raison de leur utilisation dans de nombreux domaines. La présence de la fonctionnalité (double liaison en conjugaison avec le carbonyle) est responsable des activités biologiques des chalcones [50], sa suppression l'a rend inactive. Grâce à la grande diversité des méthodes de synthèse et la présence de nombreux réactifs de départ, il existe une grande variété de chalcones synthétisées. Les chalcones sont donc très largement décrites dans la

littérature et montrent des potentiels pharmacologiques multiples. Nous pouvons ainsi citer des effets sur différents systèmes de l'organisme qui sont mentionnés ci-dessous :

- Effets sur le système nerveux central : activités hypnotique <sup>[51]</sup>, anxiolytique <sup>[52]</sup> et anti-nociceptive <sup>[53]</sup>.
- Effets sur le système cardiovasculaire : activités anti-hypertensive <sup>[54]</sup>, anti-arythmique <sup>[55]</sup> et antiplaquettaire <sup>[56]</sup>.
- Effets métaboliques : activités antidiabétique <sup>[57]</sup> et hypolipémique <sup>[58]</sup>.

#### II.1.5.1. Activité anticancéreuse

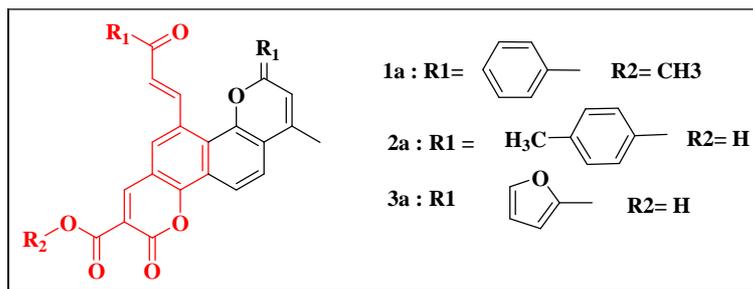
Plusieurs études ont démontré que les chalcones peuvent être considérées comme des inhibiteurs de la prolifération cellulaire. Elles vont inhiber plus précisément l'action d'entités particulières impliquées dans le développement cellulaire cancéreux. De nombreuses cibles biologiques sont concernées, nous prenons l'exemple de l'inhibition de la cathepsine-K qui est principalement connue pour être sécrétée par les ostéoclastes et pour son rôle dans le remodelage et/ou dégradation osseuse <sup>[59]</sup>. Une étude immunohistochimique a montré qu'elle intervient également dans certains cancers du sein où elle contribue à la propagation métastatique <sup>[60]</sup>. Les relations structure-activité (RSA) qui en découlent suggèrent que les chalcones monosubstituées en position 4 sur le noyau B par un substituant électro-donneur (OMe, Cl ou F) **Fig.1.12** sont les plus actives pour l'inhibition de la cathepsine-K <sup>[61]</sup>.



**Figure 1.12:** Chalcones inhibitrices de la cathepsine-K.

#### II.1.5.2. Activité anti-inflammatoire

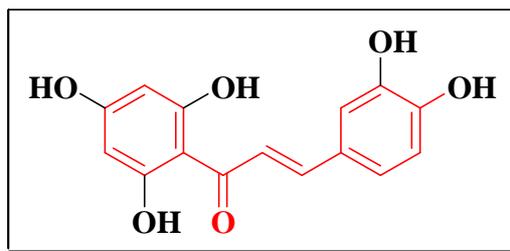
Plusieurs expériences ont été réalisées par V. K. Sashidhara et *al.* visant à étudier l'activité anti-inflammatoire des hybrides biscoumarine-chalcone **Fig.1.13** dans la patte induite par la carragénine œdème chez les rats albinos. Il a été montré au cours de ces expériences que ces molécules hybrides présentaient une bonne activité anti-inflammatoire, sans aucune toxicité <sup>[62]</sup>.



**Figure 1.13** : Hybrides biscoumarine-chalcones.

### II.1.5.3. Activité antioxydante

Plusieurs études ont été menées sur le pouvoir antioxydant des chalcones (synthétiques ou naturelles) [63]. L'étude menée par A. Detsi et *al.*, a montré que l'interaction des chalcones testées avec la DPPH· s'est avérée dépendre du temps et de la concentration du composé testé. 2', 3, 4,4', 6' -pentahydroxy-chalcone **Fig.1.14** présente une activité supérieure à celle du composé de référence, l'acide nordihydroguaiaretique (NDGA) [64].



**Figure 1.14**: Pentahydroxy-chalcone.

Les chalcones démontrent aussi de nombreuses autres propriétés : antivirale [65] (anti HIV-1 [66]), antituberculeuse [67], antifongique [68], antibactérienne [69], immunosuppressive [70].

## II.2. OXIMES

Les oximes et leurs dérivés sont des intermédiaires importants dans la synthèse organique, leurs oxydations conduisent à l'obtention des hétérocycles oxygénés tels que les isoxazolines [71]. Ces composés sont également intéressants en tant que composés biologiquement actifs. Bien qu'un certain nombre de revues [71] soient parues sur les oximes, peu de revues générales sur les avancées récentes dans la chimie des chalcone-oximes ont été publiées. Nous allons décrire dans cette partie quelques méthodologies modernes de synthèse des oximes et leurs applications dans le domaine thérapeutique.

## II.2.1. Structure chimique d'une oxime

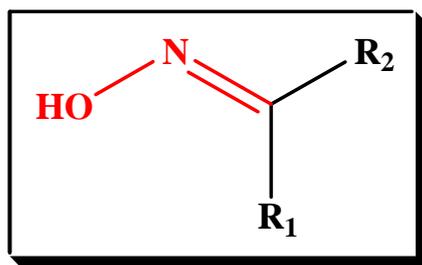


Figure 1.15: Structure chimique d'une oxime.

## II.2.2. Méthodologies de synthèse de quelques oximes

### II.2.2.1. Synthèse d'oximes à partir de chalcones stéroïdiennes

H. Lone et *al.* [72] ont rapporté la synthèse de nouvelles oximes dérivées de chalcones de 20-cétoprégnénolone. Les composés cibles ont été obtenus par une réaction en deux étapes. La prégnénolone a été convertie en chalcone correspondante avec différents aldéhydes. Dans la deuxième étape, les chalcones réagissent avec le chlorhydrate d'hydroxylamine et ont été transformées en oximes correspondantes. Ces oximes sont ensuite isolées à partir d'acétate d'éthyle. La préparation de ces dernières implique l'approche synthétique suivante **Schéma 1.11**.

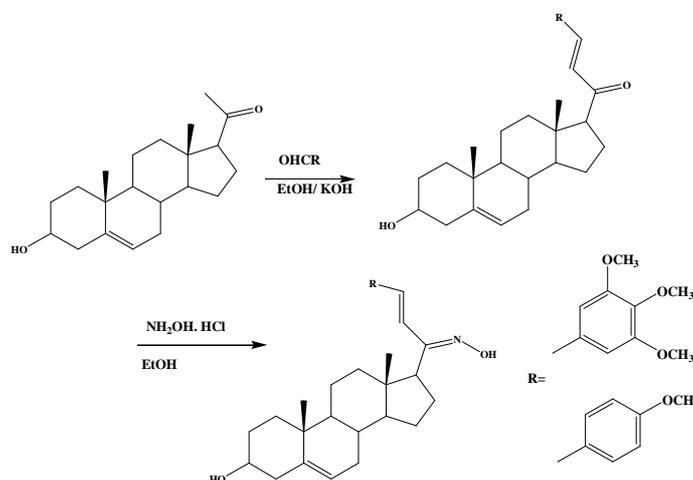
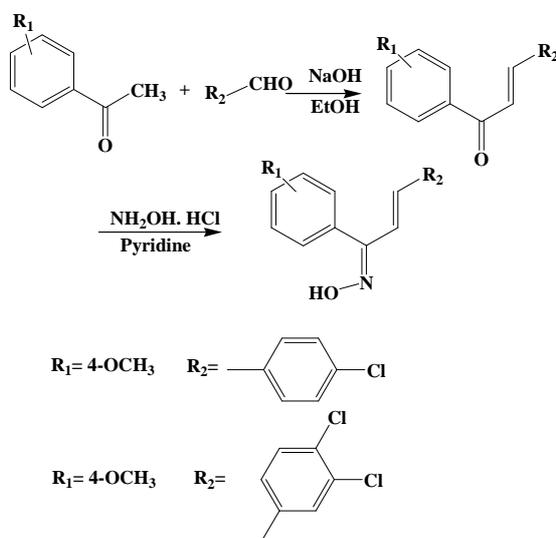


Schéma 1.11: Synthèse d'oximes substituées par le cycle D de chalcones stéroïdiennes.

### II.2.2.2. Synthèse des oximes à partir de chalcones dérivées de l'acétophénone

Y. Luo et *al.* [73] ont décrit la synthèse d'oximes dérivées des chalcones de l'acétophénone. La première étape est consacrée à la synthèse de chalcones selon les conditions de *Claisen-Schmidt*, les oximes ont été obtenues dans la seconde étape en présence

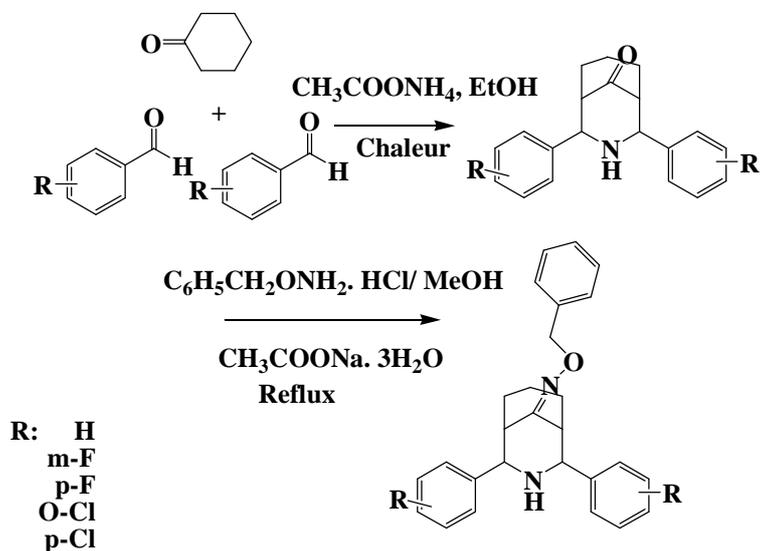
de l'hydroxylamine hydrochloré et de la pyridine comme catalyseur. La voie de synthèse de ces produits est rapportée dans le **schéma 1.12**.



**Schéma 1.12:** Voie de synthèse de dérivés de chalcone-oxime.

### II.2.2.3. Synthèse de nouveaux éthers oximes

P. Parthiban et *al.* [74] ont rapporté la synthèse de nouveaux éthers d'oxime à partir du cyclohexanone et d'aldéhydes aromatiques. Le **schéma 1.13** représente les étapes de synthèse de ces molécules.



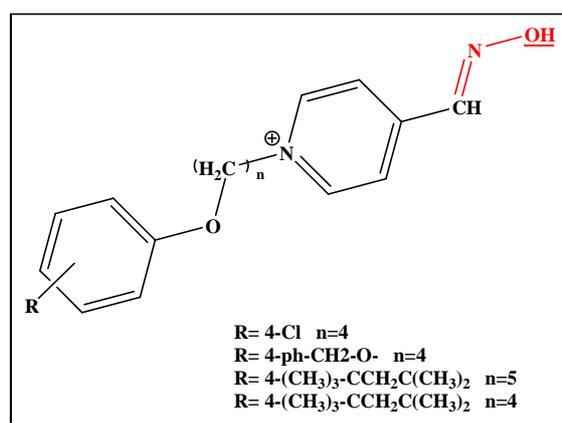
**Schéma 1.13:** Synthèse de nouveaux éthers d'oxime.

## II.2.3. Efficacité de nouvelles oximes comme réactivateurs de l'acétylcholinestérase

La majorité des travaux rapportés dans la littérature sur les oximes décrivent le pouvoir de ces molécules à inhiber l'acétylcholinestérase [75-78]. Le traitement par l'atropine, un

antagoniste des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine et par des réactivateurs de l'AChE de type oxime peut préserver la vie en s'opposant à l'activité hypercholinergique et en rétablissant la fonction catalytique de l'AChE [79].

J. E. Chambers et *al.* ont procédé à la synthèse de plus de 100 nouvelles oximes, dont 5 ont montré la plus grande promesse expérimentale. La molécule est basée sur la fraction pyridinium oxime en raison de son efficacité dans la réactivation de l'AChE. La stratégie de synthèse de la molécule de base a été l'ajout d'une chaîne de liaison alkyle de 3 à 12 atomes de carbone entre l'anneau de pyridinium et le groupe phénoxy substitué. La chaîne alkyle de liaison est attachée à la position 4 du cycle pyridinium. Cette plate-forme de nouvelles oximes présente une grande variété de substitutions sur le groupe phénoxy. La structure de base est présentée à la **figure. 1.16**, tout comme les structures des oximes les plus prometteuses [80]. La lipophilie accrue de ces nouvelles oximes conférées par la chaîne alkyle a été démontrée théoriquement et a aidé à contrebalancer la charge positive de l'ammonium quaternaire du pyridinium, par rapport aux autres oximes pyridinium et d'améliorer leur capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique et d'obtenir une concentration thérapeutique dans le cerveau. Les molécules les plus efficaces de cette plateforme possèdent des chaînes de liaison alkyles de 4 ou 5 carbones et elles sont maintenant brevetées par l'université d'état du Mississippi (brevet américain 9,227,937, brevets également délivrés en Allemagne, au Royaume-Uni, en France et en Italie) et sous licence de Defender Pharmaceuticals [80].



**Figure 1.16:** Structure générique des oximes de phénoxyalkylpyridinium substituées (brevet US 9,227,937).

Bien que les oximes sont connues pour leur pouvoir inhibiteur de l'acétylcholinestérase, ces molécules présentent plusieurs d'autres activités, telles que l'activité antimicrobienne

[72,74], antioxydante [72], ils peuvent être de potentiels agents immunosuppresseurs [73] ou inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline [81].

## II.3. ISOXAZOLINES

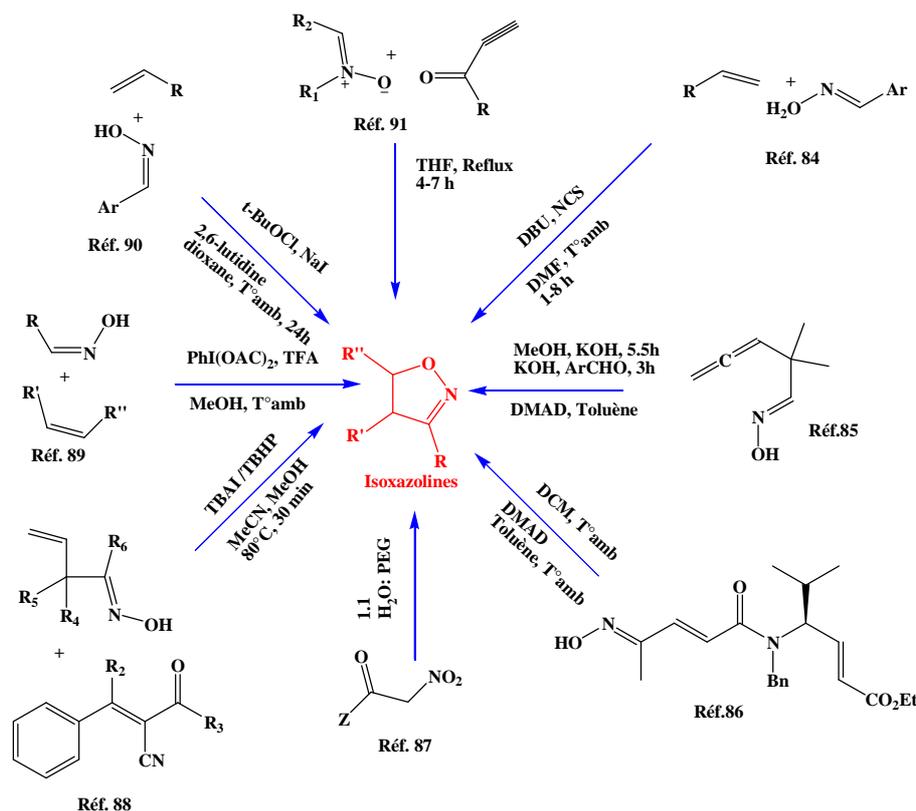
### II.3.1. Introduction

Les isoxazolines sont des échafaudages hétérocycliques classiques à cinq chaînons contenant de l'azote et de l'oxygène. Ils sont des intermédiaires importants pour la synthèse de diverses molécules organiques fascinantes qui sont largement utilisées dans la synthèse organique de base et les industries des sciences de la vie [82,83]. Plusieurs travaux ont été publiés sur les méthodes de synthèse des isoxazolines et sur leurs applications dans divers domaines et plus particulièrement dans le domaine pharmaceutique, nous avons rapporté dans cette partie quelques chemins de synthèse de ces molécules ainsi que leurs différentes applications dans le domaine thérapeutique.

### II.3.2. Approches synthétiques des isoxazolines

S. Mohammed et *al.* ont conçu une synthèse efficace d'isoxazoline sans métal en un seul pot, qui a permis d'obtenir des isoxazolines 3,5-disubstituées régiosélectives à partir d'aldoximes via une cycloaddition 1,3-dipolaire en tandem [84]. De plus, une transformation one-pot catalysée par une base a été réalisée par Buchlovic et *al.* pour la synthèse de nitrones cycliques à cinq chaînons qui ont ensuite été convertis en isoxazoline correspondante par cycloaddition 1,3-dipolaire [85]. François et *al.* ont conçu la synthèse en deux étapes de l'isoxazoline, la première étape est réservée à l'introduction d'une partie nitrone par cycloaddition intramoléculaire [4+2] en utilisant des oximes  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturées et avec l'aide du diméthyl acétylènedicarboxylate (DMAD), l'isoxazoline désirée a été formée selon la voie de réaction de cycloaddition [3+2] [86]. Une première approche verte vers la synthèse des isoxazolines a été rapportée par le groupe de Pal qui a réalisé une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre le nitrométhane de benzoyle/le 2-nitroacétate d'éthyle avec des alcènes terminaux, conduisant à des isoxazolines dans un mélange équimolaire d'eau et de polyéthylène glycol (PEG). Cette réaction s'est avérée être une voie importante vers la synthèse de l'isoxazoline, car elle utilise un environnement biocompatible et hydrophile [87]. Une cyclisation utilisant des vinyl avec des cétoximes  $\beta$ ,  $\gamma$ -insaturées pour la synthèse d'isoquinoléines à fonction isoxazoline a été explorée par Xu et *al.* par mécanisme radicalaire. La réaction est facilitée par les micro-ondes via le  $n\text{-Bu}_4\text{NI}$  (TBAI) comme initiateur

radicalaire [88]. Le groupe de Ciufolini a rapporté que le diacétate d'iodobenzène ( $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ ) oxyde efficacement les aldoximes en oxydes de nitrile dans le méthanol et les oxydes de nitrile piégés *in situ* conduisent à un produit de cycloaddition de l'isoxazoline [89]. L'hypiodite de tert-butyle (t-BuOI) est un autre réactif puissant rapporté par Minakata et *al.* préparé *in situ* à partir de t-BuOCl et de NaI en utilisant une réaction de cycloaddition. Les schémas synthétiques sont présentés dans la **figure 1.17** [90].



**Figure 1.17:** Représentation de différentes approches pour la synthèse d'isoxazolines.

### II.3.3. Profil pharmacologique des dérivés de l'isoxazoline

L'isoxazoline est apparue comme l'une des molécules les plus importantes pour la fabrication d'importants médicaments tels que le lotilaner, le fluralaner, le sarolaner et l'afoxolaner compte tenu de leur efficacité et leur utilisation clinique pour traiter divers troubles [83]. La molécule isoxazoline a été associée à une large gamme d'activités comme les anti-inflammatoires [92], anticancéreuses [93], antifongiques [94], antibactériennes [95], antioxydante [96], anti-tuberculose [97] et bien d'autres encore **Fig.1.18**. Il y a une grande possibilité d'améliorer le profil biologique des produits naturels par le biais d'une modification synthétique de ce pharmacophore qui peut conduire à de nouvelles molécules efficaces [83].

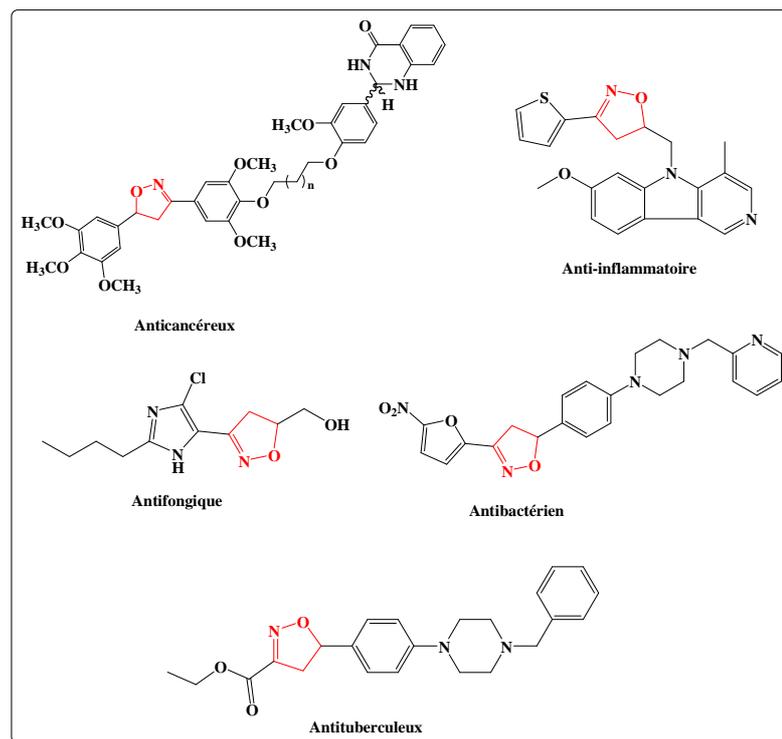
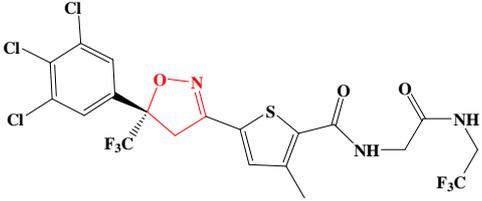
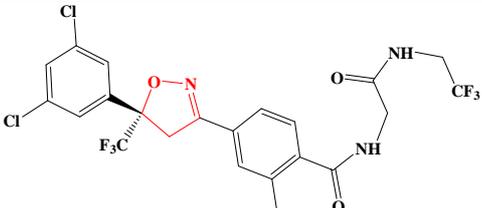
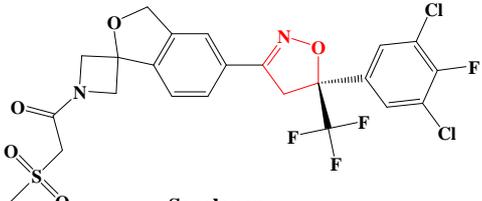
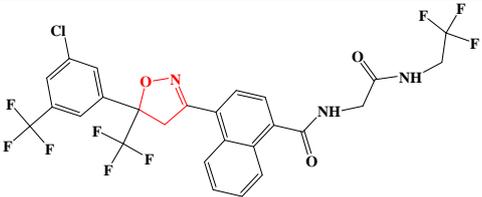


Figure 1.18: Composés bioactifs contenant de l'isoxazoline.

### II.3.4. Études des essais cliniques

Les composés dérivés de l'isoxazoline qui sont en cours d'évaluation dans les essais cliniques ont joué un rôle essentiel dans la découverte de médicaments. Des recherches substantielles ont été consacrées pour éclairer les rôles des composés à base d'isoxazoline afin de démontrer leur potentiel en tant que nouveau médicament. Dans ce contexte, lotilaner un composé à base d'isoxazoline, s'est avéré être un nouvel ectoparasiticide oral découvert pour le traitement des infestations causées par les puces et les tiques chez les chiens. Les études cliniques ont révélé que le lotilaner était facilement absorbé et que le niveau thérapeutique était atteint en 2 heures. Des études *in-vitro* sur un autre composé à base d'isoxazoline, le sarolaner ont confirmé une  $CL_{80}$  (activité larvicide) = 0,3  $\mu\text{g/mL}$  envers *Chlamydomphila felis* ainsi qu'une  $LC_{100}$  = 0,3  $\mu\text{g/mL}$  contre *Ornithodoros turicata* [98]. Dans une étude concomitante, il a été constaté que le sarolaner améliorait les signes cliniques de la dermatite allergique aux puces en raison de la destruction rapide des parasites [99]. Deux groupes de recherche indépendants au Japon et aux États-Unis ont testé cliniquement une isoxazoline structurellement unique, fluralaner et afoxolaner pour leur action parasitaire contre les puces du chat et les tiques du chien en comparaison avec le fipronil, un ectoparasiticide standard **tableau 1.2**. De façon intéressante, le fluralaner et l'afoxolaner inhibent la liaison définitive du canal du récepteur de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) [100].

**Tableau 1.2 :** Lotilaner, fluralaner, sarolaner et afoxolaner à base d'isoxazoline dans les essais cliniques.

| N° | Composé   | Nom générique  | Étude clinique et domaine de la maladie   |
|----|---|--|---|
| 1  |  <p style="text-align: center;">Lotilaner</p>    | Crédélio™  | Infestations de puces sur chiens, puces sur les chats, efficacité soutenue contre les tiques affectant les chiens.<br>[101, 102-109]                                |
| 2  |  <p style="text-align: center;">Fluralaner</p>   | Bravecto™  | Les tiques <i>Ixodes ricinus</i> sur les chiens, chiens infestés de puces et de tiques. <sup>[110-116]</sup>  |
| 3  |  <p style="text-align: center;">Sarolaner</p>  | Simparica™<br><br>Simparica™,<br>Zoetis<br>Stronghold®<br>, Zoetis | L'allergie aux puces dermatite.<br><br>Infestations<br><i>d'amblyomma cajennense</i> &<br><i>Haemaphysalis longicornis</i> sur des chiens. <sup>[99, 117-122]</sup> |
| 4  |  <p style="text-align: center;">Afoxolaner</p> | NexGard®   | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ,<br><i>Ctenocephalides felis</i><br>[113, 114, 123]  |

### **III. Conclusion**

Nous avons démontré à travers ce chapitre l'intérêt que suscite les hétérocycles azotés, oxygénés et leur grande importance dans le domaine thérapeutique. Nous avons également mis en évidence le rôle primordial que jouent certaines molécules telles que, les chalcones et les oximes qui peuvent être obtenues par des voies de synthèses faciles, économiques et écologiques comme intermédiaires réactionnels dans la synthèse de différents hétérocycles à divers intérêts. La diversité et le grand potentiel de ces molécules ont suscité notre curiosité ainsi qu'une grande motivation de notre part afin de revisiter certaines réactions dans le but de les améliorer ou à explorer de nouveaux chemins de synthèse qui peuvent nous conduire à l'obtention de nouvelles molécules à intérêts biologiques.

# **Références bibliographiques**

- [<sup>1</sup>] G. P. Romanelli, D. Bennardi, D. M. Ruiz, G. Baronetti, H. J. Thomas, J. C. Autino, A solvent-free synthesis of coumarins using a Wells–Dawson heteropolyacid as catalyst, *Tetra. Lett.*, 45 (2004) 8935–8939. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.09.183>
- [<sup>2</sup>] D. Deng, H. Pei, T. Lan, J. Zhu, M. Tang, L. Xue, Z. Yang, S. Zheng, H. Ye, L. Chen, Synthesis and discovery of new compounds bearing coumarin scaffold for the treatment of pulmonary fibrosis, *Eur. J. of Med. Chem.*, 185 (2019) 1-53. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111790>
- [<sup>3</sup>] A. Takadate, T. Tahara, H. Fujino, S. Goya, Synthesis and Properties of 4-Diazomethyl-7-methoxycoumarin as a New Fluorescent Labeling Reagent for Alcohols and Carboxylic Acids, *Chem. Pharm. Bull.*, 30 (1982) 4120–4125. <https://doi.org/10.1248/cpb.30.4120>
- [<sup>4</sup>] J. Bruneton. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Second Edition, Hampshire UK, Intercept Ltd 1999, 263-277.
- [<sup>5</sup>] A. Lacy and R. O’Kennedy, Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer, *Curr. Pharm. Design.*, 10 (2004) 3797-3811. <https://doi.org/10.2174/1381612043382693>
- [<sup>6</sup>] R. O’Kennedy, R. D. Thornes, Coumarins: Biology, Applications, and Mode of Action, Chichester (UK): Wiley, (1997).
- [<sup>7</sup>] A. dugrand-judek, Contribution à l’étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d’agrumes du genre *Citrus*, thèse de doctorat, université de Lorraine, France, 2015.
- [<sup>8</sup>] K. aslam, M. kaleem khosa, N. jahan, S. nosheen, synthesis and applications of Coumarin, *Pak. J. Pharm. Sci.*, 23 (2010) 449-454.
- [<sup>9</sup>] H. V. Pechmann, Neue Bildungsweise der Cumarine. Synthese des Daphnetins. I, *Chem. Eur. Soc. Pub.*, 17 (1884) 929-936. <https://doi.org/10.1002/cber.188401701248>
- [<sup>10</sup>] A. Shaabani, R. Ghadari, A. Rahmati, A. H. Rezayan, Coumarin Synthesis via Knoevenagel Condensation Reaction in 1,1,3,3-N,N,N',N'- Tetramethylguanidinium Trifluoroacetate Ionic Liquid, *J. Iran. Chem. Soc.*, 6 (2009) 710-714. <https://doi.org/10.1007/BF03246160>
- [<sup>11</sup>] F. Nowrouzi, The synthetic utility of allylic trifluoroborate salts: reactions of ketones and indoles using montmorillonite, indium and lewis acid, these de doctorat, University de Toronto, Toronto, 2011.
- [<sup>12</sup>] L. N. Dutta, M. Bhattacharyya, A. K. Sarkar, a study of the reformatsky reaction on formylcoumarins, *Can. J. Chern.*, 73 (1995) 1556-1562. <https://doi.org/10.1139/v95-193>
- [<sup>13</sup>] K. C. Fylaktakidou, D. J. Hadjipavlou-Litinab, K. E. Litinasc, D. N. Nicolaidesc, Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory/ Antioxidant Activities, *Current Pharma. Design.*, 10 (2004) 3813-3833. <https://doi.org/10.2174/1381612043382710>

- [14] G. Cravotto, G. M. Nano, G. Palmisano, S. Tagliapietra, An asymmetric approach to coumarin anticoagulants via hetero-Diels–Alder cycloaddition, *Tetrahedron: Asymmet.*, 12 (2001) 707–709. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(01\)00124-0](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(01)00124-0)
- [15] H. N. Lv, S. Wang, K. W. Zeng, J. Li, X. Y. Guo, D. Ferreira, J. K. Zjawiony, P. F. Tu, Y. Jiang, Anti-inflammatory Coumarin and Benzocoumarin Derivatives from *Murraya alata*, *J. Nat. Prod.*, 78 2 (2015) 279-285. <https://doi.org/10.1021/np500861u>
- [16] S. Han, V. Zhou, S. Pan, Y. Liu, M. Hornsby, D. McMullan, H. E. Klock, J. Haugen, S. A. Lesley, N. Gray, J. Caldwell, X.J Gu, Identification of coumarin derivatives as a novel class of allosteric MEK1 inhibitors, *Bioog. & Med.Chem. Lett.*, 15 (2005) 5467–5473. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.08.097>
- [17] B. Ramesh, K.V. Pugalendi, Impact of Umbelliferone on Erythrocyte Redox Status in STZ-diabetic Rats, *Yale J Biol Med.*, 78 (2005) 131-138.
- [18] M. E. gombert, T. M. aulicino, Susceptibility of Multiply Antibiotic-Resistant Pneumococci to the New Quinoline Antibiotics, Nalidixic Acid, Coumermycin, and Novobiocin, *antimi. Agen. And. Chemo.*, 26 6 (1984) 933-934.
- [19] N. S. Reddy, K. Gumireddy, M. R. Mallireddigari, S. C. Cosenza, Padmavathi Venkatapuram, S. C. Bell, E. P. Reddy, M. V. Ramana Reddy, Novel coumarin-3-(N-aryl)carboxamides arrest breast cancer cell growth by inhibiting ErbB-2 and ERK1, *Bioorg. & Med. Chem.*, 13 (2005) 3141–3147. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.02.051>
- [20] K. V. Sashidhara, A. Kumar, M. Chatterjee, K. B. Rao, S. Singh , A. K. Verma , G. Palit, Discovery and synthesis of novel 3-phenylcoumarin derivatives as antidepressant agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21 (2011) 1937–1941. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.02.040>
- [21] D. Egan, R. O'kenedy, E. Moran, D. Cox, E. Prosser, D. Thornes, The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds, *Drug. Met. Rev.*, 22 5 (1990) 503-529. <https://doi.org/10.3109/03602539008991449>
- [22] M. Asif, Pharmacological activities and phytochemistry of various plant containing Coumarin, *Curr. Scie. Pers.*, 1 3 (2015) 77-90.
- [23] H. N. nigg, H. E. nordby, R. C. beier, A. dillman, C. macia, R. C. hansen, phototoxic coumarins in limes, *Fd Chem. Toxic.*, 31 5 (1993) 331-335. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(93\)90187-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(93)90187-4)
- [24] A. I. Abramowitz, K.S, Resnik, K. R. Cohen, Margarita photodermatitis. *N. Engl. J. Me.*, 328 12 (1993) 891.
- [25] M. Robl, R. Robl, L.P. Marinoni , K.T. Abagge, V.O. Carvalho, Assemble the puzzle: bizarre-looking lesions, *Arch. Child.*, 98 (2013) 915. <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2013-304407>

- [26] O. Calka, N. Akdeniz, A. Metin, L. Behçet, Phototoxic dermatitis due to *Chenopodium album* in a mother and son, *Cont. Derm.*, 53 (2005) 58–60. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.0456e.x>
- [27] K. L. Lahtchev, D. I. Batovska, St.P. Parushev, V.M. Ubiyvovk, A. A. Sibirny, Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains, *Eur. J. of Med. Chem.*, 43 (2008) 2220-2228. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.12.027>
- [28] M. L. Go, X. Wu, X.L. Liu, Chalcones: An Update on Cytotoxic and Chemoprotective Properties, *Cur. Med. Chem.*, 12 (2005) 483-499. <https://doi.org/10.2174/0929867053363153>
- [29] I. Jioui, K. Danoun, A. Solhy, M. Jouiad, M. Zahouily, B. Essaid, C. Len, A. Fihri, Modified fluorapatite as highly efficient catalyst for the synthesis of chalcones via Claisen–Schmidt condensation reaction, *J. of Ind. And. Eng. Chem.*, 39 (2016) 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.06.003>
- [30] R. Lamelas, A. Fernández-Lodeiro, R. Bastida, E. Labisbal, A. Macías, C. Núñez, C. Lodeiro, M. Yáñezd, Novel di-substituted hexaaza-macrocyclic ligands bearing hydrazine and/or indole arms: synthesis, sensor properties and catalytic activity, *Inorg. Chim. Acta.*, 456 (2016) 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.10.047>
- [31] A. A. Ibrahim, H. Khaledi, H. Mohd Ali, A multiprotic indole-based thiocarbohydrazone in the formation of mono-, di- and hexa-nuclear metal complexes, *Polyhedron.*, 81 (2014) 457-464. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2014.06.057>
- [32] Li. Ronghi, G.L. Kenyon, *In Vitro* Antimalarial Activity of Chalcones and Their Derivatives, *J. Med. Chem.*, 38 (1995) 5031 – 5037. <https://doi.org/10.1021/jm00026a010>
- [33] Y. K. Rao, S.H. Fangb, Y.M. Tzeng, Differential effects of synthesized 20 -oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution, *Bioorg. Med. Chem.*, 12 (2004) 2679–2686. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.014>
- [34] S. Mandge, H. P. Singh, S. D.Gupta, N.S. H. N. Moorthy, Synthesis and Characterization of Some Chalcone Derivatives, *Tren. In. App. Sci.s Resea.*, 2 1 (2007) 52-56.
- [35] B. Rioux, Synthèse et vectorisation de biomolécules de type chalcones en vue d'une application anti-cancéreuse, thèse de doctorat, université de Limoges, France, 2016, p 55.
- [36] Wang Z., *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, volume 2, 145, 2010, 660-664.
- [37] C. Zhuang, W. Zhang, C. Sheng, W. Zhang, C. Xing, Z. Mia, Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry, *Chem. Rev.*, 117 12 (2017) 7762-7810. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00020>
- [38] Xiao-Feng Wu, Helfried Neumann, Anke Spannenberg, Thomas Schulz, Haijun Jiao, and Matthias Beller, Development of a General Palladium-Catalyzed Carbonylative Heck Reaction of Aryl Halides, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 41 (2010) 14596-14602. <https://doi.org/10.1021/ja1059922>
- [39] M. A. Selepe, F. R. V. Heerden, Application of the Suzuki-Miyaura Reaction in the Synthesis of Flavonoids, *Molecules.*, 18 4 (2013) 4739-4765. <https://doi.org/10.3390/molecules18044739>

- [40] S. Eddarir, N. Cotelle, Y. Bakkoura, C. Rolandoa, An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction, *Tetra. Lett.*, 44 (2003), 5359–5363. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(03\)01140-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)01140-7)
- [41] O. G. Schramm, Multi-component Heterocycle Syntheses Based upon Sonogashira Coupling Isomerization (Dissertation), Thèse de doctorat, Université de Ruprecht-Karls, Heidelberg, Germany, 2006, p3.
- [42] S. N. A. Bukhari, M. Jasamai, I. Jantan, Synthesis and Biological Evaluation of Chalcone Derivatives (Mini Review), *Mi-Rev. in. Med. Chem.*, 12 (2012) 1394-1403. <https://doi.org/10.2174/138955712804586648>
- [43] K. Ichino, H. Tanaka, K. Ito, T. Tanaka, M. Mizuno, *Journal of Natural Products*, 51 5 (1988) 906-914. <https://doi.org/10.1021/np50059a015>
- [44] E. Rohrmann, R. G. Jones, H. A. Shonl, the use of chalcones in the synthesis of medicinal intermediates, *J. Am. Chem. Soc.*, 66 11 (1944) 1856-1857. <https://doi.org/10.1021/ja01239a012>
- [45] M. D. Bowman, M. M. Jacobson, H. E. Blackwell, discovery of fluorescent cyanopyridine and deazalumazine dyes using small molecule macroarrays, *Org. Lett.*, 8 8 (2006) 1645-1648. <https://doi.org/10.1021/ol0602708>
- [46] A. Shaik, R. R. Bhandare, K. Palleepati, S. Nissankararao, V. Kancharlapalli, S. Shaik, antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities of some novel isoxazole ring containing chalcone and dihydropyrazole derivatives, *Molecules.*, 25 (2020) 1047. <https://doi.org/10.3390/molecules25051047>
- [47] M. Asada, M. N. Arshada, S. A. Khana, M. Ovesc, M. Khalidd, A. M. Asiria, A. A. C. Braga, cyclization of chalcones into N-propionyl pyrazolines for their single crystal X-ray, computational and antibacterial studies, *J. Mol. Struct.*, 1201 (2020) 127-186. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127186>
- [48] B. P. Bandgar, S. S. Gawande, R.G. Bodade, N. M. Gawande, C. N. Khobragade, Synthesis and biological evaluation of a novel series of pyrazole chalcones as anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial agents, *Bioorg. & Med. Chem.*, 17 (2009) 8168–8173. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.035>
- [49] M. Sharma, V. Chaturvedi, Y. K. Manju, S. Bhatnagar, K. Srivastava, S.K. Puri, P. M.S. Chauhan, Substituted quinolinyl chalcones and quinolinyl pyrimidines as a new class of anti-infective agents, *Eur.J. Med. Chem.*, 44 (2009) 2081–2091. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.10.011>
- [50] R. N. Mistry, K. R. Desai, Studies on synthesis of some novel heterocyclic chalcone, pyrazoline, pyrimidine - 2 - one, pyrimidine - 2 - thione, para-acetanilide sulphonyl and benzoyl derivatives and their antimicrobial activity, *E-J. of. Chem.*, 2 1 (2005) 30-41. <https://doi.org/10.1155/2005/953107>
- [51] S. Cho, S. Kim, Z. Jin, H. Yang, D. Han, N. Baek, J. Jo, C. W. Cho, J. H. Park, M. Shimizu, Y. H. Jin, Isoliquiritigenin a chalcone compound is a positive allosteric modulator of GABAA receptors and shows hypnotic effects, *Biochem. and Biophys. Res. Commu.*, 413 (2011) 637–642. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.026>

- [52] H. Jamala, W. H. Ansaria, S. J. Rizvi, Evaluation of chalcones – a flavonoid subclass for their anxiolytic effects in rats using elevated plus maze and open field behaviour tests, *Fund. & Clini. Pharma.*, 22 (2008) 673–681. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2008.00639.x>
- [53] F. de Campos-Buzzi, P. Padaratz, A. V. Meira, R. Corrêa, R. J. Nunes, V. Cechinel-Filho, 4'-Acetamidochalcone Derivatives as Potential Antinociceptive Agents, *Molecules.*, 12 (2007) 896-906. <https://doi.org/10.3390/12040896>
- [54] S. Kantevari, D. Addla, P. K. Bagul, B. Sridha, S. K. Banerjee, Synthesis and evaluation of novel 2-butyl-4-chloro-1-methylimidazole embedded chalcones and pyrazoles as angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, 19 (2011) 4772–4781. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.06.085>
- [55] O. V. Yarishkin, H.W. Ryu, J.Y. Park, M. S. Yang, S.G. Hongb, K. H. Park, Sulfonate chalcone as new class voltage-dependent K<sup>+</sup> channel blocker, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 18 (2008) 137–140. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.114>
- [56] L. M. Zhao, H. S. Jin, L.P. Sun, H. R. Piao, Z.S.n Quan, Synthesis and evaluation of antiplatelet activity of trihydroxychalcone derivatives, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 15 (2005) 5027–5029. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.08.039>
- [57] D. K. Mahapatra, V. Asati, S. K.r Bharti, Chalcones and their therapeutic targets for the management of diabetes: Structural and pharmacological perspectives, *Eur. J. Med. Chem.*, 92 (2015) 839-865. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.01.051>
- [58] K. V. Sashidhara, G. R. Palnati, R. Sonkar, S. R. A., C. Awasthi, G. Bhatia, Coumarin chalcone fibrates: a new structural class of lipid lowering agents, *Eur.J. Med. Chem.*, 64 (2013) 422-431. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.026>
- [59] Troen B. R, The Role of Cathepsin K in Normal Bone Resorption, *Drug. News. & Perspectives.*, 17 (1) (2004) 19-28. <https://10.1358/dnp.2004.17.1.829022>
- [60] C. LeGall, A. Bellahcène, E. Bonnelye, J.A. Gasser, V.Castronovo, J. Green, J. Zimmermann, P. Clézardin, A Cathepsin K Inhibitor Reduces Breast Cancer–Induced Osteolysis and Skeletal Tumor Burden, *Cancer. Res.*, 67 20 (2007) 9894-9902. <https://10.1158/0008-5472.CAN-06-3940>
- [61] S. D. Ramalho, A. Bernades, G. Demetrius, C. Noda-Perez, P. C. Vieira, C. Y. d. Santos, J. Almada da Silva, M. O. de Moraes, K. C. Mousinho, Synthetic Chalcone Derivatives as Inhibitors of Cathepsins K and B, and Their Cytotoxic Evaluation, *chem. & biodi.*, 10 (2013) 1999-2006. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200344>
- [62] K. V. Sashidhara, M. Kumar, R. K. Modukuri, R. Sonkar, G. Bhatia, A. K. Khanna, S. Rai, R. Shukla, Synthesis and anti-inflammatory activity of novel biscoumarin–chalcone hybrids, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21 (2011) 4480–4484. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.06.002>
- [63] T. Narsinghani, M. C. Sharma, S. Bhargav, Synthesis, docking studies and antioxidant activity of some chalcone and aurone derivatives, *Med. Chem. Res.*, 22 (2013) 4059–4068. <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0413-3>
- [64] A. Detsi, M. Majdalani, C. A. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, P. Kefalas, Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation

- of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity, *Bioorg. Med. Chem.*, 17 (2009) 8073–8085. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.002>.
- [65] D. Elkhalfa, I. Al-Hashimi, A-E. Al Moustafa, A. Khalil, A comprehensive review on the antiviral activities of chalcones, *J. Drug. Tar.*, 29 4 (2020) 403-419. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1853759>.
- [66] J. Deng, T. Sanchez, L. Q. Al-Mawsawi, R. Dayam, R. A. Yunes, A. Garofalo, M. B. Bolgerd, N. Neamati, Discovery of structurally diverse HIV-1 integrase inhibitors based on a chalcone pharmacophore, *Bioorg. Med. Chem.*, 15 (2007) 4985–5002. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.04.041>.
- [67] M. N. Gomes, R. C. Braga, E. M. Grzelak, B. J. Neves, E. Muratov, R. M. , L. L. Klein, S. Cho, G. R. Oliveira, S. G. Franzblau, C. H. Andrade, QSAR-driven Design, Synthesis and Discovery of Potent Chalcone Derivatives with Antitubercular Activity, *Eur. J. of Med. Chem.*, 137 (2017) 126-138. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.026>.
- [68] S. Bag, S. Ramar, M. S. Degani, Synthesis and biological evaluation of a, b-unsaturated ketone as potential antifungal agents, *Med. Chem. Res.*, 18 (2009) 309–316. <https://doi.org/10.1007/s00044-008-9128-x>.
- [69] T. M. Osório, F. D. Monache, L. D. Chiaradia, A. Mascarello, T. R. Stumpf, C. R. Zanetti, D. B. Silveira, C. R. M. Barardi, E. de F. A. Smânia, A. Viancelli, L. A. Totaro Garcia, R. A. Yunes, R. J. Nunes, A. S. Jr, Antibacterial activity of chalcones, hydrazones and oxadiazoles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22 (2012) 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.11.059>.
- [70] L. Arshed, I. Jantan, S. N. A. Bukhari, Md. A. Haque, Immunosuppressive Effects of Natural  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl-Based Compounds, and their Analogs and Derivative, on Immune Cells: A review, *Front. Pharmacol.*, 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00022>.
- [71] E. Ābele, E. Lukevics, Recent advances in the chemistry of oximes, *Org. Prepa. and Proc. Int.*, 32 3 (2000) 237-264. <https://doi.org/10.1080/00304940009355921>.
- [72] I. H. Lone, K. Z. Khan, B. I. Fozdar, F. Hussain, Synthesis antimicrobial and antioxidant studies of new oximes of steroidal chalcones, *Steroids*, 78 (2013) 945–950.
- [73] Y. Luo, R. Song, Y. Li, S. Zhang, Z.-J. Liu, J. Fu, H.-L. Zhu, Design, synthesis, and biological evaluation of chalcone oxime derivatives as potential immunosuppressive agents, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 22 (2012) 3039–3043.
- [74] P. Parthiban, G. Aridoss, P. Rathika, V. Ramkumar, S. Kabilan, Synthesis, stereochemistry and antimicrobial studies of novel oxime ethers of aza/diazabicycles, *Bioor. & Med. Chem. Lett.*, 19 (2009) 6981–6985.
- [75] J. M. Oh, T. M. Rangarajan, R. Chaudhary, R. P. Singh, M. Singh, R. P. Singh, A. R. Tondo, N. Gambacorta, O. Nicolotti, B. Mathew, H. Kim, Novel Class of chalcone oxime ethers as potent monoamine oxidase-B and acetylcholinesterase Inhibitors, *Molecules*, 25 (2020) 2356.
- [76] N. Vanova, A. Hojna, J. Pejchal, D. Herman, D. Malinak, E. Prchalova, K. Musilek, J. Z. Karasova, Determination of K869, a Novel Oxime Reactivator of Acetylcholinesterase, in Rat

- Body Fluids and Tissues by Liquid-Chromatography Methods: Pharmacokinetic Study, *J. of Pharma. Sci.*, 110 4 (2021) 1842-1852. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.01.031>
- [77] J. M. Garcia, E. C. Meek, J. E. Chambers, Novel pyridinium oximes enhance 24-h survivability against a lethal dose of nerve agent surrogate in adult female rats, *Toxicology*, 446 15 (2020) 152626. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152626>
- [78] M. S. Katagi, S. Mamledesai, G. Bolakatti, J. Fernandes, S. ML, P. Tari, Design, synthesis, and characterization of novel class of 2-quinolon-3-oxime reactivators for acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds, *Chem. Data. Collec.*, 30 (2020) 100560. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100560>
- [79] M. Eddleston, F. Chowdhury, Pharmacological treatment of organophosphorus insecticide poisoning: the old and the (possible) new, *Br. J. Clin. Pharma.*, 81 3 (2015) 462–470. <https://doi.org/10.1111/bcp.12784>
- [80] J. E. Chambers, E. C. Meek, Novel centrally active oxime reactivators of acetylcholinesterase inhibited by surrogates of sarin and VX, *Neur. of Dis.*, 133 (2020) 104487. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104487>
- [81] Y-T. Wang, Y-J. Qin, Y-L. Zhang, Y-J Li, B. Rao, Y-Q Zhang, M-R Yang, A-Q Jiang, J-L Qi, H-Li Zhu, Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of novel chalcone oxime derivatives as potential tubulin polymerization inhibitors, *RSC Adv.*, 4 (2014) 32263-32275. <https://doi.org/10.1039/C4RA03803G>
- [82] J. Liao, L. Ouyang, Q. Jin, Jian Zhang, R. Luo, Recent Advances in Oximes-participated Synthesis of Isoxazoles, *Org. Biomol. Chem.*, 18 (2020) 4709-4716. <https://doi.org/10.1039/D0OB00963F>
- [83] G. Kumar, R. Shankar, 2-Isoxazoles: A synthetic and medicinal overview, *Chem. Med. Chem.*, 16 3 (2021) 430-447. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000575>
- [84] S. Mohammed, R. A. Vishwakarma, S. B. Bharate, Metal-free DBU promoted regioselective synthesis of isoxazoles and isoxazolines, *RSC. Adv.*, 5 (2015) 3470-3473. <https://doi.org/10.1039/C4RA14694H>
- [85] M. Buchlovič, S. Man, K. Kislitson, C. Mathot, M. Potáček, One-pot, three-component synthesis of five-membered cyclic nitrones by addition/cyclization/condensation domino reaction, *Tetrahedron.*, 66 10 (2010) 1821-1826. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.01.040>
- [86] D. Francois, A. Maden, W. V. Murray, Interesting Behavior of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Oximes in Intramolecular [4 + 2] Cycloaddition Reactions, *Org. Lett.*, 6 (2004) 1931-1934. <https://doi.org/10.1021/ol049640n>
- [87] R. G. Chary, G. R. Reddy, Y. Ganesh, K. Vara Prasad, A. Raghunadh, T. Krishna, S. Mukherjee, M. Pal, Effect of Aqueous Polyethylene Glycol on 1,3-Dipolar Cycloaddition of Benzoylnitromethane/Ethyl 2-Nitroacetate with Dipolarophiles: Green Synthesis of Isoxazoles and Isoxazolines, *Adv. Synth. Catal.*, 356 1 (2014) 160-164. <https://doi.org/10.1002/adsc.201300712>

- <sup>[88]</sup> Y. Xu, H. Chen, W. Li, Q. Xie, L. Yu, L. Shao, Synthetic access to isoxazoline-functionalized isoquinolines via microwave-assisted iminoxyl radical-participated cascade cyclization of vinyl isocyanides, *Org. Biomol. Chem.*, (2018) 4996- 5005. <https://doi.org/10.1039/C8OB01229F>
- <sup>[89]</sup> B. A. Mendelsohn, S. Lee, S. Kim, F. Teyssier, V. S. Aulakh, M. A. Ciufolini, Oxidation of Oximes to Nitrile Oxides with Hypervalent Iodine Reagents, *Org. Lett.*, 11 (2009) 1539-1542. <https://doi.org/10.1021/ol900194v>
- <sup>[90]</sup> S. Minakata, S. Okumura, T. Nagamachi, Y. Takeda, Generation of Nitrile Oxides from Oximes Using *t*-BuOI and Their Cycloaddition, *Org. Lett.*, 13 11 (2011) 2966-2969. <https://doi.org/10.1021/ol2010616>
- <sup>[91]</sup> A. Libuori, R. Ottana, G. Romeo, G. Sindona, N. Uccella, Regioselective formation of 4-isoxazolines from *n*-aryl nitrones and alkynes, *Tetrahedron*, 44 (1988) 1247-1253. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)85905-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)85905-6)
- <sup>[92]</sup> I. Filali, J. Bouajila, M. Znati, F. Bousejra-El Garah, H. Ben Jannet, Synthesis of new isoxazoline derivatives from harmine and evaluation of their anti-Alzheimer, anti-cancer and anti-inflammatory activities, *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, 30 (2015) 371-376. <https://doi.org/10.3109/14756366.2014.940932>
- <sup>[93]</sup> A. Kamal, E. V. Bharathi, J. S. Reddy, M. J. Ramaiah, D. Dastagiri, M. K. Reddy, A. Viswanath, T. L. Reddy, T. B. Shaik, S. Pushpavalli, Synthesis and biological evaluation of 3,5-diaryl isoxazoline/isoxazole linked 2,3-dihydroquinazolinone hybrids as anticancer agents, *Eur. J. Med. Chem.*, 46 (2011) 691-703. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.12.004>
- <sup>[94]</sup> M. S. Kumar, S. N. Swamy, M. Mahendra, J. S. Prasad, B. S. Viswanath, K.S. Rangappa, Novel  $\delta^2$ -isoxazolines as group II phospholipase A2 inhibitors, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 14 (2004) 3679–3681. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.05.012>
- <sup>[95]</sup> P. Picconi, P. Prabakaran, J. L. Auer, S. Sandiford, F. Cascio, M. Chowdhury, C. Hind, M. E. Wand, J. M. Sutton, K. M. Rahman, Novel pyridyl nitrofuranyl isoxazolines show antibacterial activity against multiple drug resistant *Staphylococcus* species, *Bioorg. Med. Chem.*, 25 (2017) 3971- 3979. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.037>
- <sup>[96]</sup> R. Kalirajan, M. H. M. Rafick, S. Sankar, S. Jubie, Docking Studies, Synthesis, Characterization and Evaluation of Their Antioxidant and Cytotoxic Activities of Some Novel Isoxazole-Substituted 9-Anilinoacridine Derivatives, *The. Sci. World. J.*, (2012) 1-6. <https://doi.org/10.1100/2012/165258>
- <sup>[97]</sup> R. P. Tangallapally, D. Sun, N. Budha, R. E. Lee, A. J. Lenaerts, B. Meibohm, R. E. Lee, Discovery of novel isoxazolines as anti-tuberculosis agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17 (2007) 6638-6642. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.09.048>
- <sup>[98]</sup> T. L. McTier, N. Chubb, M. P. Curtis, L. Hedges, G. A. Inskeep, C. S. Knauer, S.

- Menon, B. Mills, A. Pullins, E. Zinser, D. J. Woods, P. Meeus, Discovery of sarolaner: A novel, orally administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs, *Vet. Parasitol.*, 222 (2016) 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.019>
- [99] C. Becskei, F. De Bock, J. Illambas, S. P. Mahabir, R. Farkas, R. H. Six, Efficacy and safety of a novel oral isoxazoline, sarolaner (Simparica™) in the treatment of naturally occurring flea and tick infestations in dogs presented as veterinary patients in Europe, *Vet. Parasitol.*, 222 (2016) 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.007>
- [100] Y. Ozoe, M. Asahi, F. Ozoe, K. Nakahira, T. Mita, The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391 (2010) 744-749. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.131>
- [101] D. Cavalleri, M. Murphy, W. Seewald, S. Nanchen, A randomized, controlled field study to assess the efficacy and safety of lotilaner (Credelio™) in controlling fleas in client-owned cats in Europe, *Parasit. Vect.*, 11 (2018) 410. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2971-9>
- [102] D. Cavalleri, M. Murphy, W. Seewald, J. Drake, S. Nanchen, Assessment of the onset of lotilaner (Credelio™) speed of kill of fleas on dogs, *Parasit. Vect.*, 10 (2017) 1-5. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2474-0>
- [103] D. Cavalleri, M. Murphy, W. Seewald, J. Drake, S. Nanchen, Assessment of the speed of flea kill of lotilaner (Credelio™) throughout the month following oral administration to dogs, *Parasit. Vect.*, 10 (2017) 529. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2466-0>
- [104] E. A. Kuntz, S. Kammanadiminti, Safety evaluation of lotilaner in dogs after oral administration as flavoured chewable tablets (Credelio™), *Parasit. Vect.*, 10 (2017) 1-6. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2468-y>
- [105] D. Karadzovska, K. Chappell, S. Coble, M. Murphy, D. Cavalleri, S. Wiseman, J. Drake, S. Nanchen, A randomized, controlled field study to assess the efficacy and safety of lotilaner flavored chewable tablets (Credelio™) in eliminating fleas in client-owned dogs in the USA, *Parasit. Vect.*, 10 (2017) 528. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2469-x>
- [106] D. Cavalleri, M. Murphy, W. Seewald, J. Drake, S. Nanchen, A randomised, blinded, controlled field study to assess the efficacy and safety of lotilaner tablets (Credelio™) in controlling fleas in client-owned dogs in European countries, *Parasit. Vect.*, 10 (2017) 1-8.
- [107] D. Cavalleri, M. Murphy, R. L. Gorbea, W. Seewald, J. Drake, S. Nanchen, Laboratory evaluations of the immediate and sustained effectiveness of lotilaner (Credelio™) against three common species of ticks affecting dogs in Europe, *Parasit. Vect.*, 10 (2017) 527. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2477-x>
- [108] M. Murphy, D. Cavalleri, W. Seewald, J. Drake, S. Nanchen, Laboratory evaluation of the speed of kill of lotilaner (Credelio™) against *Ixodes ricinus* ticks on dogs, *Parasit. Vect.*, 10 (2017) 541. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2467-z>
- [109] M. Murphy, R. Garcia, D. Karadzovska, D. Cavalleri, D. Snyder, W. Seewald, T. Real, J. Drake, S. Wiseman, S. Nanchen, Laboratory evaluations of the immediate and sustained

- efficacy of lotilaner (Credelio™) against four common species of ticks affecting dogs in North America *Parasit. Vect.*, 10 (2017) 523. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2476-y>
- [110] C. Wengenmayer, H. Williams, E. Zschiesche, A. Moritz, J. Langenstein, R. K. Roepke, A. R. Heckerth, The speed of kill of fluralaner (Bravecto™) against *Ixodes ricinus* ticks on dogs, *Parasit. Vect.*, 7 (2014) 525. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0525-3>
- [111] N. Rohdich, R. K.A. Roepke, E. Zschiesche, A randomized, blinded, controlled and multi-centered field study comparing the efficacy and safety of Bravecto™ (fluralaner) against Frontline™ (fipronil) in flea- and tick-infested dogs, *Parasit. Vect.*, 7 (2014) 83. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-83>
- [112] D. Gopinath, L. Meyer, J. Smith, R. Armstrong, Topical or oral fluralaner efficacy against flea (*Ctenocephalides felis*) transmission of *Dipylidium caninum* infection to dogs, *Parasit. Vect.*, 11 (2018) 557. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3140-x>
- [113] F. Beugnet, J. Liebenberg, L. Halos, Comparative efficacy of two oral treatments for dogs containing either afoxolaner or fluralaner against *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and *Dermacentor reticulatus*, *Vet. Parasit.*, 209 (2015) 142-145. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.002>
- [114] F. Beugnet, J. Liebenberg, L. Halos, Comparative speed of efficacy against *Ctenocephalides felis* of two oral treatments for dogs containing either afoxolaner or fluralaner, *Vet. Parasit.*, 207 (2015) 297-301. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.007>
- [115] H. Williams, D. R. Young, T. Qureshi, H. Zoller, A. R. Heckerth, Fluralaner, a novel isoxazoline, prevents flea (*Ctenocephalides felis*) reproduction *in vitro* and in a simulated home environment, *Parasit. Vect.*, 7 (2014) 275. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-275>
- [116] C. Meadows, F. Guerino, F. Sun, A randomized, blinded, controlled USA field study to assess the use of fluralaner tablets in controlling canine flea infestations, *Parasit. Vect.*, 7 (2014) 375. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-375>
- [117] C. Becskei, D. Fias, S. P. Mahabir, R. Farkas, Efficacy of a novel oral chewable tablet containing sarolaner, moxidectin and pyrantel (Simparica Trio™) against natural flea and tick infestations on dogs presented as veterinary patients in Europe, *Parasit. Vect.*, 13 (2020) 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3946-1>
- [118] J. A. Cherni, S. P. Mahabir, R. H. Six, Efficacy and safety of sarolaner (Simparica™) against fleas on dogs presented as veterinary patients in the United States, *Vet. Parasit.*, 222 (2016) 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.022>
- [119] K. Oda, W. Yonetake, T. Fujii, A. Hodge, R. H. Six, S. Maeder, D. Rugg, Current review of isoxazoline ectoparasiticides used in veterinary medicine, *Parasit. Vect.*, 12 (2019) 1-5. <https://doi.org/10.1111/jvp.12959>
- [120] R. H. Six, D. R. Young, M. R. Myers, S. P. Mahabir, Comparative speed of kill of sarolaner (Simparica™ Chewables) and fluralaner (Bravecto®) against induced infestations

of *Amblyomma americanum* on dogs, *Parasit. Vect.*, 9 (2016) 399. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1684-1>

[121] N. A. Honsberger, R. H. Six, T. J. Heinz, A. Weber, S. P. Mahabir, T. C. Berg, Efficacy of sarolaner in the prevention of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* transmission from infected *Ixodes scapularis* to dogs, *Vet. Parasit.*, 222 (2016) 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.010>

[122] T. Geurden, C. Becskei, R. Farkas, D. Lin, D. Rugg, Efficacy and safety of a new spot-on formulation of selamectin plus sarolaner in the treatment of naturally occurring flea and tick infestations in cats presented as veterinary patients in Europe, *Vet. Parasitol.*, 238 (2017) 12-17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.008>

[123] F. Beugnet, L. Meyer, J. Fourie, D. Larsen, Preventive efficacy of NexGard Spectra® against *dipylidium caninum* infection in dogs using a natural flea (*Ctenocephalides felis*) infection model, *Parasite (Paris, France)*, 24 (2017) 16. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017017>

# Partie 2

# Chapitre 1

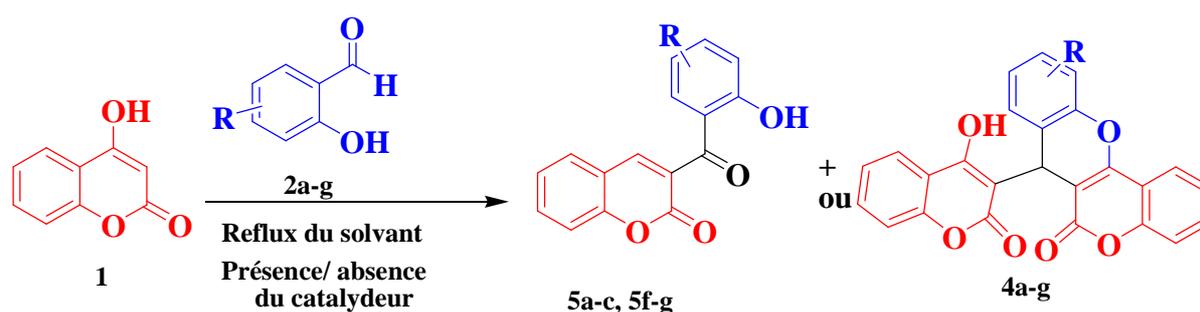
*Synthèse des benzoylchromènes et des chroméno-chromènes en présence de la triéthylamine ou d'un polyoxométallate de type Keggin ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) comme catalyseur. Etude du mécanisme réactionnel mis en jeu et interprétation théorique des résultats obtenus.*

## I. Introduction

L'application de catalyseurs acides hétérogènes à la place de catalyseurs acides homogènes dans la synthèse organique est un domaine de recherche intéressant, tant en laboratoire que dans le contexte industriel. Les avantages des catalyseurs hétérogènes par rapport aux catalyseurs homogènes sont notamment la stabilité (vis-à-vis de l'air et de l'humidité), l'absence de corrosion, la facilité de manipulation, de récupération et de régénération [1]. Les hétéropolyacides (HPA), en particulier ceux de la série de Keggin, sont largement utilisés dans le cadre d'une approche à la fois homogène et hétérogène comme catalyseurs pour la synthèse de produits chimiques fins et spéciaux [2].

L'un des objectifs les plus importants de la chimie organique est d'obtenir les produits souhaités de manière chimio et régiosélective. Ainsi, de nombreux paramètres de processus différents tels que la température, la pression, le solvant, le catalyseur, entre autres peuvent être utilisés pour moduler la sélectivité des transformations synthétiques. Nous avons vu dans la première partie l'importance des composés contenant le noyau coumarine (2*H*-1-benzopyran-2-one) dans différents domaines (pharmaceutique, cosmétique et alimentaire).

Nous rapportons dans ce chapitre, une étude sur la réaction de la 4-hydroxycoumarine avec une série d'*o*-hydroxyarylaldehydes, réalisée dans différentes conditions de solvant, de catalyseur et dans différents modes d'activation afin de contrôler la formation des deux produits poly-hétérocycliques possibles. Les produits qui en résultent donnent deux séries différentes de composés hétérocycliques **4a-g**, **5a-c**, **e-f**. La séquence réactionnelle est représentée dans le **Schéma 2.1**.



a: H, b: 3-OH, c: 4-OH, d: 5-OH, e: 5-NO<sub>2</sub>, f: 5-I, g: benzo [*f*].

**Schéma 2.1** : Synthèse des composés **4** et **5** dans les conditions opératoires adaptées.

## II. Historique de la réaction

De nombreuses méthodes ont été conçues pour la fonctionnalisation de la coumarine, parmi lesquelles la réaction avec les 2-hydroxybenzaldéhydes qui semble être d'une grande polyvalence.

Un très petit nombre de recherches ont été effectuées sur la réactivité de la 4-hydroxycoumarine **1** vis-à-vis des ortho-hydroxyarylaldehydes **2**, le résultat de la réaction semblait particulièrement dépendant des conditions opératoires. Dans leur travail pionnier de 1943, W. R. Sullivan et ses collègues <sup>[3]</sup> ont rapporté la condensation de la 4-hydroxycoumarine avec l'o-hydroxybenzaldéhyde dans l'éthanol au reflux, donnant deux produits auxquels ils ont attribué les structures du produit d'addition 1:1 **3a** et du produit d'addition 2:1 **4**, comme le montre le **Schéma 2.2**. Cependant, la structure chimique de **3a** a été corrigée sans ambiguïté en 1984 pour donner son régioisomère **5**. La formation de **5** peut être expliquée par une translactonisation intramoléculaire ultérieure à partir de l'intermédiaire instable **3a**, qui se produit spontanément en l'absence de tout catalyseur. Cette translactonisation a déjà été revisitée et décrite dans notre laboratoire par M. Makhloufi et *al* <sup>[4]</sup>. Les auteurs ont utilisé un milieu apolaire (toluène) en présence de triéthylamine (NEt<sub>3</sub>) ou de KF-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10%) pour initier la transformation.

Des années plus tard, Xiang-Shan Wang et ses collaborateurs <sup>[5]</sup> ont expérimenté la condensation d'o-hydroxyarylaldehydes avec un excès de 4-hydroxycoumarine (2:1) dans l'éthanol, en utilisant KF-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> comme catalyseur. De manière surprenante, dans ces conditions le produit **6** a été obtenu presque exclusivement sans aucune trace du produit attendu **4**. Alors que le produit **4** résulte d'une addition/élimination intramoléculaire entre le groupe -OH du salicylaldehyde et le groupe C=O du coumarinyle, une réaction identique entre les deux groupes coumarinyle explique la formation du produit **6**. Le résultat obtenu en milieu aqueux est encore plus surprenant lorsque le chlorure de triéthylbenzylammonium hydraté (TEBAC-H<sub>2</sub>O) est utilisé comme catalyseur. Dans ce cas, le stéréo-isomère E de **3a**, a été obtenu comme produit stable avec un bon rendement (84%). D'après ces résultats, la réaction des o-hydroxyaldéhydes avec la 4-hydroxycoumarine apparaît comme une option très versatile pour préparer de nouvelles séries de conjugués à base de coumarine. La variété des produits auxquels on peut accéder dans diverses conditions justifie l'idée de revisiter cette réaction afin de sonder la chimio et la régio-sélectivité <sup>[6, 7]</sup>.

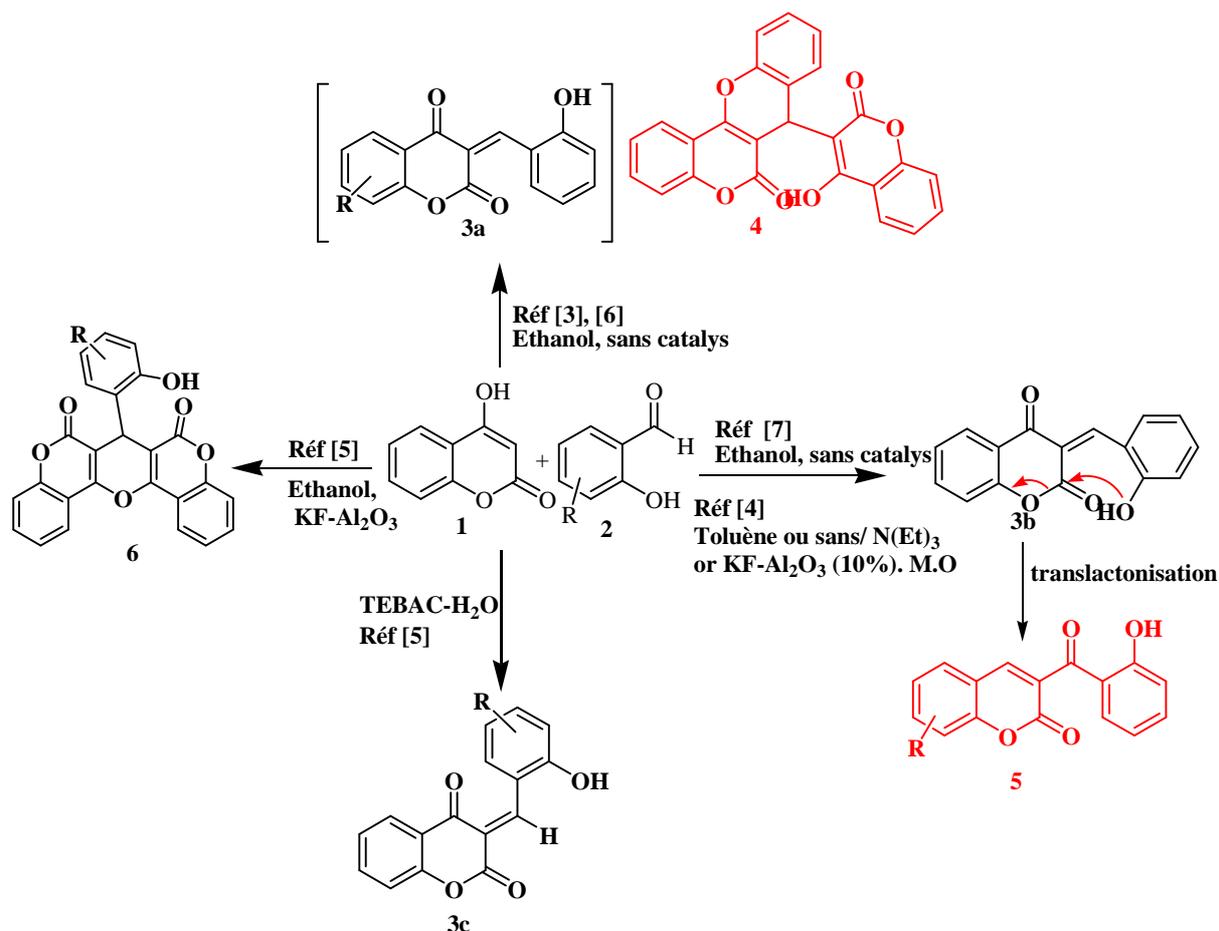


Schéma 2.2 : Sélectivité de la réaction des o-hydroxyaldéhydes avec la 4-hydroxycoumarine.

### III. Contrôle de la sélectivité de la réaction des 2-hydroxyaryldéhydes et de la 4-hydroxycoumarine

Dans nos études précédentes, nous avons montré que la condensation de la 4-hydroxy-6-méthyl-2*H*-pyran-2-one (TAL) **7** avec des dérivés de salicylaldéhyde **2a**, dans une gamme de différents solvants au reflux et en présence de différents catalyseurs ont donné des 3-acétoacétylcoumarines **8** en milieu basique <sup>[8]</sup> et des 10-(4-Hydroxy-6-méthyl-2-oxo-2*H*-pyran-3-yl)-3-méthyl-1*H*,10*H*-pyrano[4,3-*b*]chromen-1-ones **9** en présence d'hétéropolyacides (HPA) <sup>[9]</sup> schéma 2.3. La 4-hydroxycoumarine (ou 4-hydroxybenzopyran-2-one) pourrait réagir de la même manière que la 4-hydroxy-6-méthyl-2*H*-pyran-2-one (TAL) via le carbone fortement nucléophile en position C-3. Pour étudier la réactivité de la 4-hydroxycoumarine dans une condensation de Knoevenagel avec les o-hydroxyaryldéhydes, une première série d'expériences a été consacrée à l'étude de l'influence du solvant et d'un catalyseur sur le résultat de la réaction.

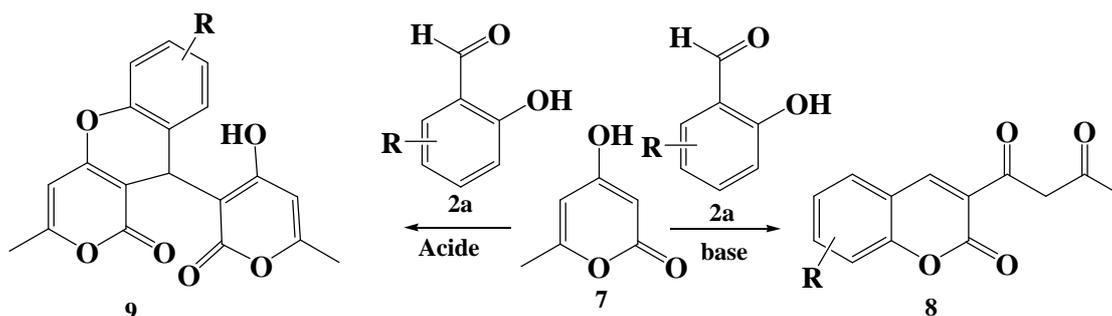


Schéma 2.3 : Synthèse des 3-acétoacétylcoumarines **8** [8] et du pyranyl-pyranpchromène **9** [9].

### III.1. Effet du solvant

Nous avons commencé notre travail en revisitant la condensation de quantités équimolaires de 4-hydroxycoumarine **1** et de salicylaldéhyde **2a** dans de l'éthanol au reflux, pendant 90 minutes en l'absence de tout catalyseur. Cette réaction a conduit principalement à la formation d'un solide jaunâtre après refroidissement et recristallisation à partir du méthanol, avec un rendement cependant modéré (**entrée 1 du tableau 2.1**). Les analyses MS ( $m/z$  267,1  $[M+H]^+$ ) et  $^1H$  RMN [10,69 ppm (L, s, 1H, -OH phénolique), 8,34 ppm (s, 1H, H-4), 6,90-7,86 ppm (8H, H-Ar)] étaient cohérentes avec la formation du composé **5a**. On peut expliquer la formation de ce composé par une condensation de Knoevenagel de la 4-hydroxycoumarine avec le salicylaldéhyde conduisant au composé **5a** après translactonisation intramoléculaire ultérieure **Schéma 2.4**.

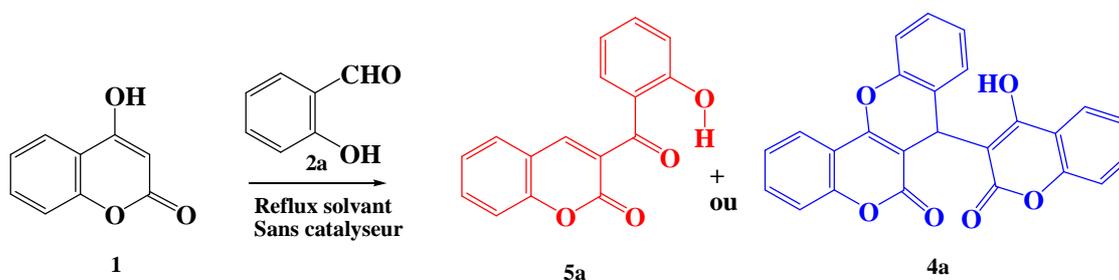


Schéma 2.4 : Synthèse de la 6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one **4a** et des 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromén-2-ones **5a**.

La réaction du salicylaldéhyde **2a** avec la 4-hydroxycoumarine **1** a été utilisée comme modèle et a été étudiée dans différents solvants (méthanol, propanol, isopropanol, butan-2-ol, isobutanol, acétonitrile, THF et toluène) sans aucun catalyseur. Dans ces conditions, la réaction a donné un mélange de dicoumarol **4a** et de produit translactonisé **5a**, qui a pu être séparé par simple recristallisation dans du méthanol chaud. Un rendement optimisé de 40 % a été obtenu en présence d'éthanol (**tableau 2.1, entrée 1**). Les solvants protiques apparaissent

comme les plus adaptés à cette transformation. Dans tous ces essais, le composé **5a** translactonisé a été obtenu comme produit majeur et a même été formé de manière exclusive dans l'isopropanol ou le 2-butanol.

**Tableau 2.1:** Synthèse de la 6*H*,7*H*-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-*b*][1]benzopyran-6-one **4a** et de la 3-(2-hydroxybenzoyl)-2*H*-chromén-2-ones **5a** dans différentes conditions de réaction.

| Entrée | Solvant     | Rdt %     |           |
|--------|-------------|-----------|-----------|
|        |             | <b>5a</b> | <b>4a</b> |
| 1      | Ethanol     | 40        | 5         |
| 2      | Méthanol    | 33        | 21        |
| 3      | Propanol    | 25        | 11        |
| 4      | Isopropanol | 26        | -         |
| 5      | Butan-2-ol  | 35        | -         |
| 6      | Isobutanol  | 34        | 11        |
| 7      | ACN         | 7         | 2         |
| 8      | THF         | 14        | 2         |
| 9      | Toluène     | PR        | PR        |

Temps : 90 minutes

### III.2. Effet de la nature et de la quantité du catalyseur

Pour étudier l'influence d'un catalyseur sur le résultat de la réaction, la même transformation a été réalisée dans des conditions catalysées par un acide (hétéropolyacide, H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et une base (triéthylamine) dans de l'éthanol et méthanol au reflux. Dans toutes ces conditions, la réaction a donné deux produits **4a** et **5a** **tableau 2.2**. Cependant, la catalyse acide favorise surtout la formation du dicoumarol **4a**, alors que la NEt<sub>3</sub> donne exclusivement le produit de translactonisation **5a**. La formation du composé **4a** peut être expliquée par une réaction en cascade régiosélective impliquant une condensation de Knoevenagel catalysée par un acide ou une base de la 4-hydroxycoumarine **1** avec le salicylaldéhyde **2a** conduisant au composé **3**, qui subit une addition de Michael dans une position spécifique (**3a**) d'une autre molécule de 4-hydroxycoumarine donnant l'intermédiaire **10**. Une cyclodéshydratation supplémentaire de **10** a donné la 6*H*,7*H*-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-*b*][1]benzopyran-6-one isolée **4a**. La formation du composé **4a** est sensible à la nature du solvant utilisé et à la quantité d'HPA. Le rendement du composé **4a** augmente avec

l'augmentation de la quantité du  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  **tableau 2.2** et le meilleur rendement étant obtenu en présence de 5 % molaire de catalyseur dans le méthanol.

Lorsque la réaction a été réalisée en utilisant deux équivalents de **1** et un équivalent de salicylaldéhyde **2a** en présence de 5 % molaire de  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  dans du méthanol, le composé **4a** a été acquis avec un bon rendement (65%) (**entrée 11, tableau 2.2**).

**Tableau 2.2:** Synthèse de **5a** et **4a** sous différents catalyseurs dans l'éthanol et le méthanol.

| Entrée | Solvant         | Catalyseur (Qté)  | Rdt (%)       |           | Temps (min) |
|--------|-----------------|---|---------------|-----------|-------------|
|        |                 |   | 5a            | 4a        |             |
| 1      | Ethanol         | $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ (1%)                               | 3             | 18        | 90          |
| 2      |                 | $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ (2%)                               | 4             | 22        | 90          |
| 3      |                 | $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ (5%)                               | 6             | 36        | 90          |
| 4      |                 | $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ (8%)                               | traces        | 32        | 90          |
| 5      |                 | Triéthylamine   | 53            | -         | 20          |
| 6      | <b>Méthanol</b> | $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ (1%)                               | 5             | 38        | 90          |
| 7      |                 | $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ (2%)                               | 2             | 39        | 90          |
| 8      |                 | <b><math>\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}</math> (5%)</b>             | <b>traces</b> | <b>40</b> | <b>90</b>   |
| 9      |                 | $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ (8%)                               | traces        | 40        | 90          |
| 10     |                 | Triéthylamine   | 78            | -         | 20          |
| 11     |                 | <b><math>\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}</math> (5%)<sup>c</sup></b> | -             | <b>65</b> | <b>90</b>   |

<sup>c</sup> Conditions de la réaction : 4-hydroxycoumarin **1** (2 éq), salicylaldéhyde **2a** (1 éq), au reflux du méthanol,  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  (5%), 90 minutes.

### III.3. Effet du substituant

Ensuite, la réaction a été appliquée aux 2-hydroxyarylaldehydes **2b-f** et au 2-hydroxynaphtalaldéhyde **2g**, qui présentent une gamme de substituants donneurs ou receveurs d'électrons **tableau 2.3**. Les réactions ont été effectuées dans le méthanol ou éthanol sans aucun catalyseur ou en présence de  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  (5 mol%). Par ailleurs, le rapport molaire des deux réactifs **1** et **2a-g** a été modifié de 1:1 à 2:1 pour étudier l'impact d'un excès de la 4-hydroxycoumarine **1** sur le rapport ou le rendement. La transformation s'est avérée efficace dans tous les cas, donnant les benzoylchromènes **5b-g** et les chroméno-chromènes fusionnés **4b-4g** attendus. De meilleurs rendements ont été obtenus en utilisant **2éq** de 4-

hydroxycoumarine **1** et **1éq** de 2-hydroxyarylaldehydes **2b-f** et 2-hydroxy-naphtaldehyde **2g**. Contrairement aux autres dérivés du salicylaldehyde, il a été observé que le 5-hydroxysalicylaldehyde **2d** conduit à la formation du même produit **4d** en présence ou en absence du catalyseur **tableau 2.3**.

**Tableau 2.3:** Synthèse des composés **5a-g** et/ou **4a-g**.

| Entrée | Solvant  | (Qté des réactifs) | Aldéhydes                          | Conditions                                       | Rdt (%) |      |
|--------|----------|--------------------|------------------------------------|--|---------|------|
|        |          |                    |                                    |  | 5a-g    | 4a-g |
| 1      |          |                    | Salicylaldehyde <b>2a</b>          | Sans   | 40      | 5    |
| 2      |          |                    | 3-hydroxysalicylaldehyde <b>2b</b> | catalyseur                                       | 22      | 10   |
| 3      |          | (1:1)              | 4-hydroxysalicylaldehyde <b>2c</b> |  | 40      | -    |
| 4      | Ethanol  |                    | 5-hydroxysalicylaldehyde <b>2d</b> |  | -       | 24   |
| 5      |          |                    | 5-nitrosalicylaldehyde <b>2e</b>   |  | PR      | PR   |
| 6      |          |                    | 5-Iodosalicylaldehyde <b>2f</b>    |  | 68      | 16   |
| 7      |          |                    | 2-hydroxynaphtaldehyde <b>2g</b>   |  | 51      | -    |
| 8      |          |                    | Salicylaldehyde <b>2a</b>          | H <sub>3</sub> PMO <sub>12</sub> O <sub>40</sub> | 6       | 36   |
| 9      |          |                    | 3-hydroxysalicylaldehyde <b>2b</b> | (5 mol %)  | -       | 32   |
| 10     |          | (1:1)              | 4-hydroxysalicylaldehyde <b>2c</b> |  | -       | 40   |
| 11     |          |                    | 5-hydroxysalicylaldehyde <b>2d</b> |  | -       | 43   |
| 12     |          |                    | 5-nitrosalicylaldehyde <b>2e</b>   |  | -       | 37   |
| 13     |          |                    | 5-Iodosalicylaldehyde <b>2f</b>    |  | 10      | 41   |
| 14     | Méthanol |                    | 2-hydroxynaphtaldehyde <b>2g</b>   |  | -       | 48   |
| 15     |          |                    | Salicylaldehyde <b>2a</b>          | H <sub>3</sub> PMO <sub>12</sub> O <sub>40</sub> | traces  | 65   |
| 16     |          |                    | 3-hydroxysalicylaldehyde <b>2b</b> | (5 mol %)  | -       | 53   |
| 17     |          | (2:1)              | 4-hydroxysalicylaldehyde <b>2c</b> |  | -       | 64   |
| 18     |          |                    | 5-hydroxysalicylaldehyde <b>2d</b> |  | -       | 60   |
| 19     |          |                    | 5-nitrosalicylaldehyde <b>2e</b>   |  | -       | 32   |
| 20     |          |                    | 5-Iodosalicylaldehyde <b>2f</b>    |  | traces  | 48   |
| 21     |          |                    | 2-hydroxynaphtaldehyde <b>2g</b>   |  | -       | 65   |

Conditions : Absence de catalyseur (dans l'éthanol) et en présence de H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub> (5 mol %) (dans le méthanol), 4-hydroxycoumarine **1**/ 2-hydroxyarylaldehydes **2b-f** (et 2-hydroxy-naphtaldehyde **2g**) (1:1 et 2:1 éq), 90 minutes.

### III.4. Effet du temps sur la synthèse des composés 4 et 5

Une augmentation du temps de réaction (suivi réalisé par CCM), a conduit à une sélectivité totale vers les composés **4** avec de meilleurs rendements que ceux observés lorsque le temps de réaction était de 90 minutes. Le plus grand rendement a été obtenu avec le 2-hydroxynaphthalaldéhyde **2g** (**4g** : 83%) (tableau 2.4).

**Tableau 2.4:** Synthèse des composés **4a-g**.

| Entrée | Aldéhydes                           | Composé   | Temps (h) | Rdt (%) |
|--------|-------------------------------------|-----------|-----------|---------|
| 1      | Salicylaldehyde <b>2a</b>           | <b>4a</b> | 5         | 73      |
| 2      | 3-hydroxysalicylaldehyde <b>2b</b>  | <b>4b</b> | 4         | 62      |
| 3      | 4-hydroxysalicylaldehyde <b>2c</b>  | <b>4c</b> | 4         | 78      |
| 4      | 5-hydroxysalicylaldehyde <b>2d</b>  | <b>4d</b> | 3         | 76      |
| 5      | 5-nitrosalicylaldehyde <b>2e</b>    | <b>4e</b> | 6         | 40      |
| 6      | 5-Iodosalicylaldehyde <b>2f</b>     | <b>4f</b> | 4         | 63      |
| 7      | 2-hydroxynaphthalaldéhyde <b>2g</b> | <b>4g</b> | 6         | 83      |

Conditions : Présence de  $H_3PMO_{12}O_{40}$  (5 mol %), de méthanol et de 4-hydroxycoumarine **1/2a-g** (2:1 éq).

## IV. Caractérisations spectroscopiques des produits synthétisés 4 et 5

### IV.1. Étude par spectrométrie de masse électro-spray (MS-ESI<sup>+</sup>)

Les spectres de masse réalisés en mode MS-ESI<sup>+</sup>, montrent deux ions moléculaires correspondant à  $[M+Na]^+$  /  $[M+H]^+$ , confirmant la formule brute de chaque composé. Les résultats sont résumés dans le **tableau 2.5**.

**Tableau 2.5 :** Résultats des analyses MS-ESI<sup>+</sup> des produits **4** et **5**.

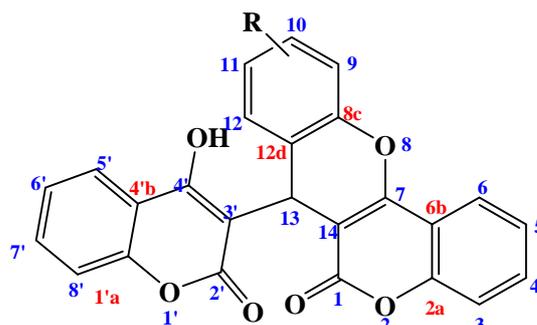
| Produit   | Ion                | m/z (%)     | M g/mol | Formule            |
|-----------|--------------------|-------------|---------|--------------------|
| <b>4a</b> | $[M+Na]^+$         | 433,2 (100) | 410,08  | $C_{25}H_{14}O_6$  |
| <b>4b</b> | $[M+Na]^+$         | 449,2 (100) | 426,07  | $C_{25}H_{14}O_7$  |
| <b>4c</b> | $[M+Na]^+$         | 449,2 (100) | 426,07  | $C_{25}H_{14}O_7$  |
| <b>4d</b> | $[M+Na]^+$         | 449,1 (100) | 426,07  | $C_{25}H_{14}O_7$  |
| <b>4e</b> | $[M+Na, ^{14}N]^+$ | 478,1 (100) | 455,06  | $C_{25}H_{13}O_8N$ |

|           |                       |             |        |                    |
|-----------|-----------------------|-------------|--------|--------------------|
|           | $[M+Na, ^{15}N]^+$    | 479,1 (27)  |        |                    |
| <b>4f</b> | $[M+Na, ^{126.9}I]^+$ | 558,9 (100) | 535,98 | $C_{25}H_{13}IO_6$ |
|           | $[M+Na, ^{127.9}I]^+$ | 559,9 (23)  |        |                    |
| <b>4g</b> | $[M+Na]^+$            | 483,2 (100) | 460,09 | $C_{29}H_{16}O_6$  |
| <b>5a</b> | $[M+H]^+$             | 267,1 (100) | 266,06 | $C_{16}H_{10}O_4$  |
| <b>5b</b> | $[M+Na]^+$            | 305,1 (100) | 282,05 | $C_{16}H_{10}O_5$  |
| <b>5c</b> | $[M+Na]^+$            | 305,1 (100) | 282,05 | $C_{16}H_{10}O_5$  |
| <b>5f</b> | $[M+Na, ^{126.9}I]^+$ | 414,9 (100) | 391,95 | $C_{16}H_9IO_4$    |
|           | $[M+Na, ^{127.9}I]^+$ | 415,9 (17)  |        |                    |
| <b>5g</b> | $[M+Na]^+$            | 339,1 (100) | 316,07 | $C_{20}H_{12}O_4$  |

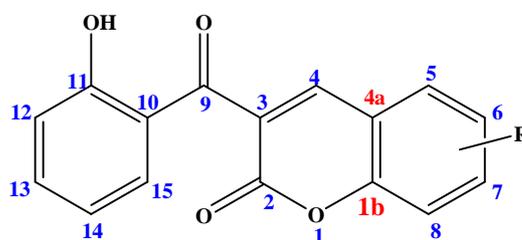
#### IV.2. Etude par spectroscopie RMN $^1H$ des composés 4 et 5

Les spectres RMN du proton sont réalisés à 300,13 MHz dans un appareil spectromètre Bruker Avance 300 en présence du diméthylsulfoxyde 6-deutéié comme solvant et le TMS comme référence interne, les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm. L'interprétation des spectres RMN  $^1H$  des benzoylchromènes **5a-c**, **5f**, **5g** et des chroméno-chromènes fusionnés **4a-g** est facile **tableaux 2.6, 2.7**.

- Tous les composés chroméno-chromènes fusionnés **4a-g** présentent le même proton H-13 positionné sur le carbone asymétrique, qui apparait entre 5,62-6,20 ppm sous forme d'un singulet et un autre singulet large à 12,12-12,66 ppm correspondant au -OH-4' de la pyrone.
- Contrairement au deux composés **4a**, **4g** les composés **4b**, **4c**, **4d** présentent un groupement hydroxyle donneur d'électron par effet mésomère sur leur noyau benzénique, le proton de ce groupement raisonne entre 9,85, 9,79, 9,39 ppm respectivement pour les trois composés et surgit sous forme d'un singulet large.
- La présence du groupement nitro et iodo connus pour leur effet mésomère attracteur d'électrons dans les deux composés **4e**, **4f** entraine les déplacements chimiques vers les champs faibles (protons déblindés).



- Tous les benzoylchromènes **5a-c**, **5f**, **5g**, présentent le même proton H-4 qui se révèle sous forme de singulet entre 8,27-9,13 ppm et un autre singulet large correspondant au groupement -OH-11.



#### IV.2.1. Etude par spectroscopie RMN $^1\text{H}$ du composé **4a**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé montre l'apparition d'un singulet intense à 5,75 ppm attribuable au proton H-13 qui se trouve sur le carbone asymétrique. L'apparition d'un multiplet allant de 7.15-7.68 ppm affecter à 11 protons aromatiques (H-3, H-4, H-5, H-6, H-5', H-6', H-7', H-8', H-9, H-10, H-11) confirme la condensation de la 2<sup>ème</sup> molécule de la 4-hydroxycoumarine et la conservation des deux noyaux benzo- $\alpha$ -pyrone. Le proton H-12 du cycle benzénique se révèle à 8,09 ppm sous forme d'un doublet ( $J=8.1$  Hz). Le -OH de la pyrone survient sous forme d'un singulet large à 12,20 ppm.

#### IV.2.2. Etude par spectroscopie RMN $^1\text{H}$ du composé **4b**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé présente trois singulets; le premier très intense se montre à 5,71 ppm et ne peut être que le H-13 du carbone asymétrique, les deux autres sont petits et larges correspondent aux groupements hydroxyles (-OH). Celui du cycle benzénique se dessine en premier à 9,85 ppm tandis que celui de la pyrone est observé vers les plus faibles champs (12,20 ppm). Les protons aromatiques H-10, H-12, H-5' se montrent à 6,61, 6,82, 8,31 ppm sous forme de doublets avec des constantes de couplage de ( $J=6.63\text{Hz}$ ,  $J=6,8$  Hz,  $J=8,3$  Hz) respectivement. Les deux protons aromatiques H-11, H-5 surgissent à 7,52 et

7,76 ppm respectivement sous forme de deux triplets. A 7,32-7,50 ppm apparait un multiplet regroupant le reste des protons aromatiques de ce composé (H-6, H-6', H-7', H-8', H-3, H-4).

#### IV.2.3. Etude par spectroscopie RMN $^1\text{H}$ du composé **4c**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé est similaire à celui du **4b**, sauf que dans ce spectre les protons aromatiques H-11, H-9 surviennent sous forme de doublets à 6,57, 6,71 ppm ( $J=6,6$  Hz,  $J=6,7$ ) respectivement.

#### IV.2.4. Etude par spectroscopie RMN $^1\text{H}$ du composé **4d**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé montre également la présence d'un singulet à 5,62 ppm qui ne peut être que le H-13 commun à tous les composés chroméno-chromènes fusionnés. Un autre singulet est observé à 6,60 ppm, ce dernier est octroyé au proton aromatique H-12.

Nous avons également observé trois doublets à 6,68, 7,1, 8,06 ppm ( $J=6,6$  Hz,  $J=6,7$  Hz,  $J=8,1$  Hz) le premier provient du couplage du proton H-9 avec son voisin H-10, le 2<sup>ème</sup> est attaché au couplage du proton aromatique H-10 avec le H-9 et le dernier résulte du couplage du proton aromatique H-5' avec le H du groupement hydroxyle de la pyrone. Ce dernier est observé dans tous les composés.

Les protons aromatiques qui restent (H-3, H-4, H-6, H-7', H-8') ont émis un signal sous forme de multiplet. Les deux protons aromatiques H-5, H-6' qui s'affichent à 7,59, 7,67 ppm respectivement forment deux triplets.

Enfin, l'apparition de deux pics large dans les champs faibles à 9,79 et 12,12 ppm suggère la présence de protons liés à un hétéroatome et qui ne peuvent être que les deux -OH, le premier correspond à celui du cycle benzénique (de l'aldéhyde aromatique) le dernier appartient à la pyrone.

#### IV.2.5. Etude par spectroscopie RMN $^1\text{H}$ du composé **4e**

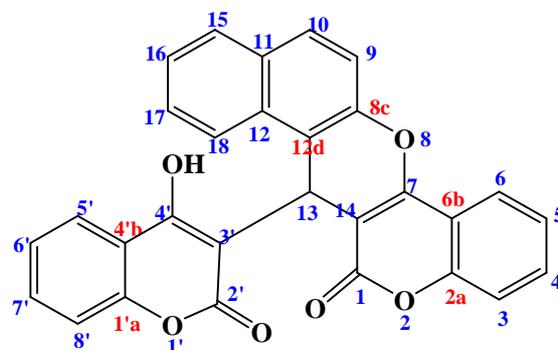
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé ressemble à celui du composé **4d**, sauf que la présence du groupement nitro attracteur d'électrons par effet mésomère décale les déplacements chimiques vers les champs faibles (protons déblindés). Dans ce cas le proton aromatique H-9 apparait sous forme de doublet ( $J=8,8$  Hz) à 6,79 ppm, le proton H-10 se manifeste également sous forme de doublet ( $J=7,2$  Hz) à 7,82 ppm, tandis que le proton aromatique H-12 apparait comme un doublet de doublet ( $J=8,8$  Hz,  $J'=2,8$  Hz) à 7,93 ppm.

#### IV.2.6. Etude par spectroscopie RMN $^1\text{H}$ du composé **4f**

Nous observons dans le spectre de ce composé tout comme dans le composé précédent un décalage des déplacements chimiques vers des champs faibles, néanmoins dans ce cas ils sont

moins importants car le groupement iodo est moins attracteur que le groupement nitro. Les signaux enregistrés pour ce composé sont presque identiques que ceux observés pour le composé **4e**, à l'exception du proton aromatique H-10 qui ne forme pas dans ce cas un doublet mais se manifeste plutôt à l'intérieur du multiplet attribué aux protons aromatiques.

#### IV.2.7. Etude par spectroscopie RMN $^1\text{H}$ du composé **4g**



La particularité du spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé est la présence du naphthyle, dont les protons sont enregistrés sous forme de deux triplets (H-16, H-17) à 7.26 ppm, (H-15, H-18) à 7.93 ppm et un multiplet qui correspond aux protons (H-9, H-10).

**Tableau 2.6 :** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  à 300,13 MHz des composés **4a-g**.

| Composé   | $\delta$ (ppm) | Multiplicité | Attribution  |
|-----------|----------------|--------------|--|
| <b>4a</b> | 5,75           | s            | H-13   |
|           | 7,15-7,68      | m            | H-3,H-4,H-5,H-6, H-6', H-7', H-8', H-9, H-10, H-11, H-12 |
|           | 8,09           | d            | H-5'   |
|           | 12,20          | s            | OH-pyr   |
|           |                |              |  |
| <b>4b</b> | 5,71           | s            | H-13   |
|           | 6,61           | d            | H-10   |
|           | 6,82           | d            | H-12   |
|           | 7,32-7,50      | m            | H-6', H-7', H-8', H-3, H-4, H-6                          |
|           | 7,52           | t            | H-11   |
|           | 7,76           | t            | H-5  |
|           | 8,31           | d            | H-5'   |
|           | 9,85           | s            | OH-Ar  |
| 12,20     | s              | OH-pyr       |  |
| <b>4c</b> | 5,62           | s            | H-13   |
|           | 6,57           | d            | H-11   |
|           | 6,71           | d            | H-9  |
|           | 6,98           | d            | H-12   |
|           | 7,31- 7,73     | m            | H-6', H-7', H-8', H-3, H-4, H-5 H-6                      |
|           | 8,08           | d            | H-5'   |
|           | 9,79           | s            | OH-Ar  |
|           | 12,12          | s            | OH-pyr   |
| <b>4d</b> | 5,67           | s            | H-13   |
|           | 6,60           | s            | H-12   |
|           | 6,68           | d            | H-9  |
|           | 7,1            | d            | H-10   |
|           | 7,33-7,48      | m            | H-3, H-4, H-6, H-7', H-8'                                |

|           |           |    |                                      |
|-----------|-----------|----|--------------------------------------|
|           | 7,59      | t  | H-5                                  |
|           | 7,67      | t  | H-6'                                 |
|           | 8,06      | d  | H-5'                                 |
|           | 9,39      | s  | OH-Ar                                |
|           | 12,24     | s  | OH-pyr                               |
| <b>4e</b> | 6,20      | s  | H-13                                 |
|           | 6,79      | d  | H-9                                  |
|           | 7,22-7,26 | m  | H-3, H-5, H-6', H-8'                 |
|           | 7,48-7,52 | m  | H-4, H-6, H-7'                       |
|           | 7,82      | d  | H-10                                 |
|           | 7,93      | dd | H-12                                 |
|           | 8,04      | d  | H-5'                                 |
|           | 12,43     | s  | OH-pyr                               |
| <b>4f</b> | 5,69      | s  | H-13                                 |
|           | 7,16      | d  | H-9                                  |
|           | 7,31-7,48 | m  | H-3, H-5, H-6', H-8', H-10           |
|           | 7,57-7,71 | m  | H-4, H-6, H-7'                       |
|           | 8,05      | dd | H-12                                 |
|           | 8,07      | d  | H-5'                                 |
|           | 12,33     | s  | OH-pyr                               |
| <b>4g</b> | 6,19      | s  | H-13                                 |
|           | 7,26      | t  | H-16, H-17                           |
|           | 7,42-7,63 | m  | H-3, H-4, H-5, H-6, H-6', H-7', H-8' |
|           | 7,69-7,74 | m  | H-9, H-10                            |
|           | 7,93      | t  | H-15, H-18                           |
|           | 8,16      | dd | H-5'                                 |
|           | 12,66     | s  | OH-pyr                               |

#### IV.2.8. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H du composé 5a

Nous avons observé dans le spectre RMN <sup>1</sup>H de ce composé six signaux, les trois premiers représentent des multiplets; le premier correspond aux deux protons aromatiques H-6, H-8 et apparait de 6,90-6,97 ppm, le second qui se déclare à 7,40-7,50 ppm est attribué aux trois protons aromatiques H-5, H-13, H-15, le dernier est affecté aux deux protons aromatiques H-7, H-14 et se dévoile de 7,67 à 7,74. Le 4<sup>ème</sup> signal représente un doublet à 7,86 ppm ( $J=7,6$  Hz), résultat d'un couplage entre le proton aromatique H-12 et le proton du groupement hydroxyle qui se trouve en position 11. Le 5<sup>ème</sup> signal est observé à 8,34 ppm sous forme de singulet consacré au proton H-4. Le dernier se révèle sous forme d'un autre singulet large à 10,69 ppm et ne peut être que le groupement -OH-11.

#### IV.2.9. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H du composé 5b

Le spectre RMN <sup>1</sup>H de ce composé présente :

- Quatre multiplets à 6,90-6,97, 7,19-7,30, 7,45-7,51, 7,66-7,69 ppm, le premier correspond aux deux protons aromatique H-5, H-6, le second aux protons H-7, H-13, H-15, le 3<sup>ème</sup> au proton aromatique H-14 et le dernier est attribué au proton aromatique H-12 qui ne se couple pas dans ce cas avec le proton du groupement hydroxyle (-OH-11).
- A 8,27 ppm apparait un singulet qui est décerné au proton H-4.

- Deux autres singulets larges apparaissent à 10,37 et 10,68 ppm attribuables aux deux groupements –OH-8, -OH-11 respectivement.

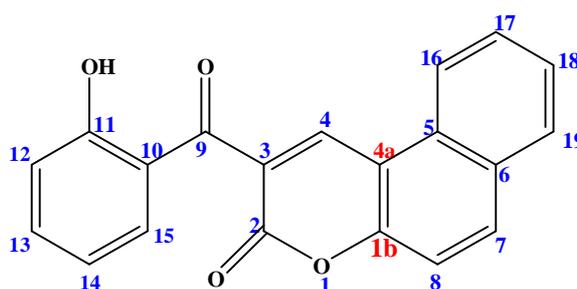
#### IV.2.10. Etude par spectroscopie RMN $^1\text{H}$ du composé 5c

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 5c montre quatre singulets, le premier apparaît à 6,78 ppm et correspond au proton aromatique H-8, le 2<sup>ème</sup> est observé dans tous les composés et ne peut être que le H-4, le 3<sup>ème</sup> se montre à 9,93 ppm et accorder au proton du groupement –OH-7, le dernier singulet qui se présente à 10,64 ppm est commun à tous les benzoylchromènes et correspond au –OH-11. Les protons aromatique H-6, H-12, H-5, H-15, apparaissent à 6,84, 6,87, 7,59, 7,71 respectivement sous forme de doublets ( $J=7,6$  Hz,  $J=8,0$  Hz,  $J=7,6$  Hz,  $J=7,8$  Hz). Enfin, les deux derniers protons aromatiques H-14, H-13 se manifestent à 6,90, 7,42 ppm respectivement sous forme de triplets.

#### IV.2.11. Etude par spectroscopie RMN $^1\text{H}$ du composé 5f

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé donne 8 signaux, trois d'entre eux correspondent à des singulets, le premier qui apparaît à 8,26 ppm est attribué au proton aromatique H-5, le second qui surgit à 8,27 est assigné au H-4, le dernier à 10,74 ppm ne peut être que le –OH-11. Les protons aromatiques H-12, H-13, H-15 apparaissent à 7,29, 7,69, 7,97 ppm, ( $J=7,3$  Hz,  $J=7,7$  Hz,  $J=7,8$  Hz) respectivement sous formes de trois doublets. De 6,92 à 6,96 ppm on observe un multiplet qui correspond aux deux protons aromatiques H-7, H-8. Le dernier proton aromatique H-14 se déclare également sous forme de multiplet dont le déplacement chimique est entre 7,47 et 7,52 ppm.

#### IV.2.12. Etude par spectroscopie RMN $^1\text{H}$ du composé 5g



Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé présente 9 signaux. Le premier qui est observé à 6,93 ppm sous forme de doublet ( $J=7,8$  Hz) est affecté à deux protons aromatiques H-12, H-8, le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> apparaissent à 7,49 et 7,72 sous forme de triplets; chaque triplet correspond à deux protons aromatiques (H-18, H-14), (H-17, H-13) respectivement. Les quatre autres signaux qui suivent sont octroyés à des doublets et surgissent à 7,65, 8,10, 8,30, 8,63 ppm ( $J=7,8$  Hz,  $J=7,7$  MHz,  $J=7,6$  Hz,  $J=8,0$  Hz), ces derniers sont attribués aux protons H-7, H-16,

H-19, H-15 respectivement. Les deux derniers signaux se présentent à 9,13 et 10,78 ppm sous forme de singulets allouer au H-4 et -OH-11 respectivement.

**Tableau 2.7 :** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  à 300,13 MHz des composés **5**.

| Composé   | $\delta$ (ppm) | Multiplicité | Attribution     |
|-----------|----------------|--------------|-----------------|
| <b>5a</b> | 6,90-6,97      | m            | H-6, H-8        |
|           | 7,40-7,50      | m            | H-5, H-13, H-15 |
|           | 7,67 – 7,74    | m            | H-7, H-14       |
|           | 7,86           | d            | H-12            |
|           | 8,34           | s            | H-4             |
|           | 10,69          | s            | -OH             |
| <b>5b</b> | 6,90-6,97      | s            | H-5, H-6        |
|           | 7,19-7,30      | m            | H-7, H-13, H-15 |
|           | 7,45-7,51      | m            | H-14            |
|           | 7,66-7,69      | m            | H-12            |
|           | 8,27           | s            | H-4             |
|           | 10,37          | s            | -OH-8           |
|           | 10,68          | s            | -OH-11          |
| <b>5c</b> | 6,78           | s            | H-8             |
|           | 6,84           | d            | H-6             |
|           | 6,87           | d            | H-12            |
|           | 6,90           | t            | H-14            |
|           | 7,42           | t            | H-13            |
|           | 7,59           | d            | H-5             |
|           | 7,71           | d            | H-15            |
|           | 8,28           | s            | H-4             |
|           | 9,93           | s            | -OH-7           |
|           | 10,64          | s            | -OH-11          |
| <b>5f</b> | 6,92-6,96      | m            | H-7, H-8        |
|           | 7,29           | d            | H-12            |
|           | 7,47-7,52      | m            | H-14            |
|           | 7,69           | d            | H-13            |
|           | 7,97           | d            | H-15            |
|           | 8,26           | s            | H-5             |
|           | 8,27           | s            | H-4             |
|           | 10,74          | s            | -OH-11          |
| <b>5g</b> | 6,93           | d            | H-12, H-8       |
|           | 7,49           | t            | H-18, H-14      |
|           | 7,72           | t            | H-17, H-13      |
|           | 7,65           | d            | H-7             |
|           | 8,10           | d            | H-16            |
|           | 8,30           | d            | H-19            |

|  |       |   |        |
|--|-------|---|--------|
|  | 8,63  | d | H-15   |
|  | 9,13  | s | H-4    |
|  | 10,78 | s | -OH-11 |

### IV.3. Etude par spectroscopie RMN $^{13}\text{C}$ des composés 4 et 5

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  sont réalisés dans un appareil spectromètre Bruker Avance 300, carbone 75,47 MHz, en utilisant le DMSO- $d_6$  comme solvant et le TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm par rapport au signal de TMS.

Les spectres des composés chroméno-chromènes fusionnés **4a-g**, présentent la même empreinte caractéristique des carbones dans les différents produits résumés dans le **tableau 2.8**.

- Dans le domaine des carbones  $sp^3$ , nous observons un seul pic qui ne peut être attribué qu'au carbone asymétrique en position C-13.
- Tous les autres pics appartiennent au domaine des carbones ayant une hybridation  $sp^2$ .

**Tableau 2.8:** Déplacements chimiques en RMN  $^{13}\text{C}$  75,47 MHz des composés **4a-g**.

| Composé / C | 4a    | 4b    | 4c    | 4d    | 4e    | 4f     | 4g    |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| C-1, C-2'   | 152,2 | 151,9 | 152,1 | 152,2 | 154,3 | 152,7  | 152,0 |
| C-2a, C-1'a | 149,2 | 145,1 | 132,4 | 142,1 | 152,3 | 144,5  | 132,6 |
| C-3, C-8'   | 116,5 | 116,2 | 122,7 | 122,6 | 124,4 | 122,6  | 117,0 |
| C-4, C-7'   | 128,3 | 125,2 | 129,1 | 132,4 | 133,3 | 132,7  | 128,7 |
| C-5, C-6'   | 123,9 | 123,9 | 123,9 | 124,5 | 132,5 | 124,5  | 124,5 |
| C-6, C-5'   | 125,3 | 124,4 | 124,5 | 132,2 | 132,9 | 126,3  | 125,0 |
| C-6b, C-4'b | 116,1 | 116,1 | 116,4 | 116,4 | 116,6 | 118,2  | 116,2 |
| C-7         | 160,4 | 160,5 | 160,5 | 160,5 | 160,1 | 160,7  | 160,5 |
| C-8c        | 151,7 | 132,2 | 149,7 | 142,0 | 113,3 | 152,4  | 138,4 |
| C-9         | 113,9 | 132,4 | 112,9 | 117,1 | 117,6 | 118,9  | 116,5 |
| C-10        | 124,5 | 115,5 | 151,9 | 114,0 | 123,1 | 134,5  | 127,2 |
| C-11        | 122,2 | 118,3 | 116,2 | 151,9 | 144,2 | 102,80 | 129,2 |
| C-12        | 128,6 | 116,3 | 132,1 | 115,2 | 125,0 | 137,4  | 132,3 |
| C-12d       | 122,6 | 123,2 | 117,2 | 123,9 | 124,7 | 125,4  | 115,8 |
| C-13 (C*)   | 28,7  | 28,7  | 28,1  | 28,7  | 28,6  | 28,9   | 27,0  |
| C-14        | 106,1 | 114,0 | 113,8 | 113,9 | 112,5 | 116,6  | 113,7 |

|      |       |       |       |       |       |       |       |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C-3' | 100,6 | 107,3 | 102,7 | 98,8  | 102,5 | 116,5 | 101,3 |
| C-4' | 156,3 | 152,1 | 157,3 | 154,5 | 159,7 | 152,8 | 152,2 |
| C-15 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 127,2 |
| C-16 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 123,9 |
| C-17 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 124,9 |
| C-18 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 122,7 |

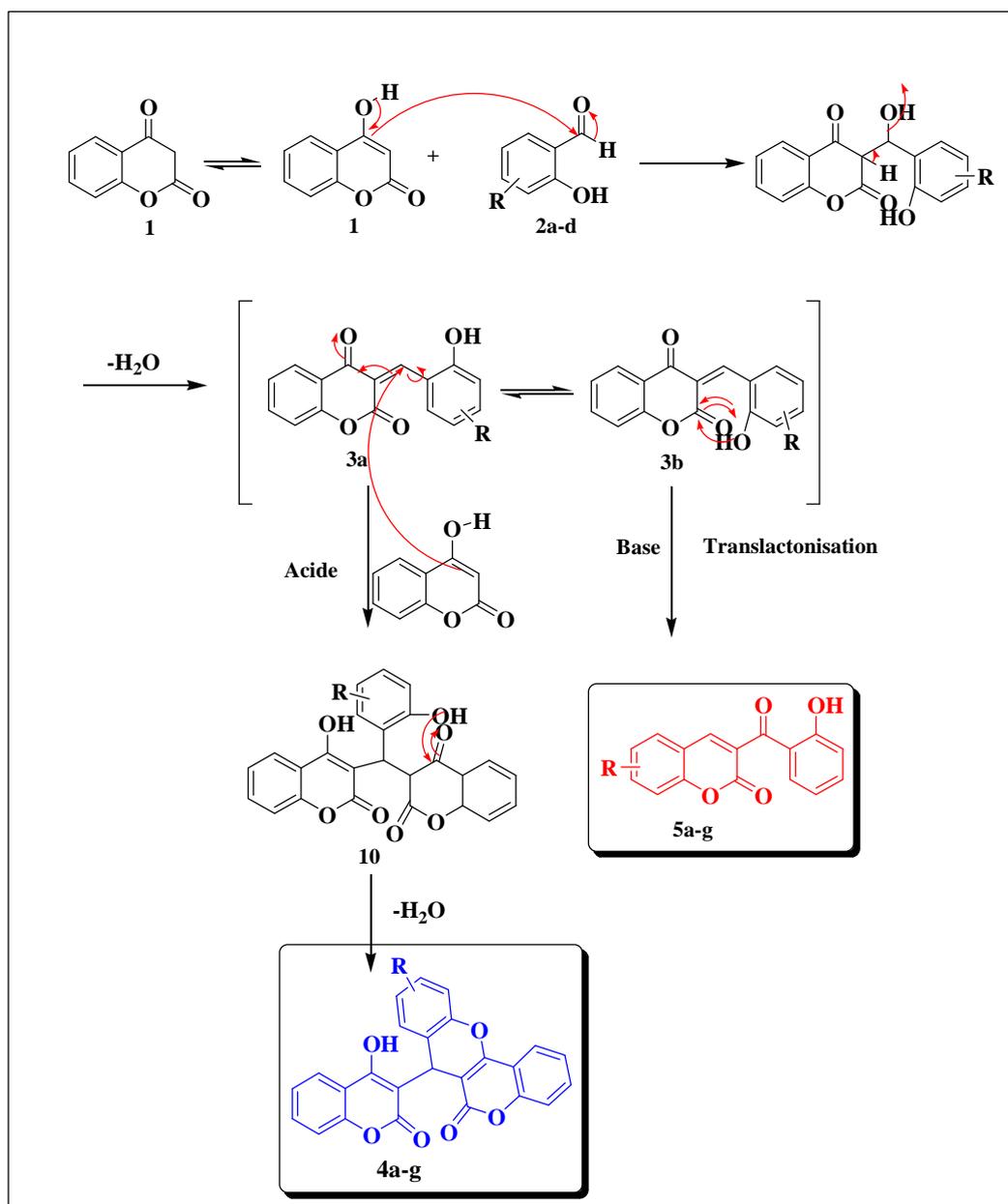
Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  des composés benzoylchromènes **5a-c**, **5f-g**, présentent le même degré d'hybridation ( $\text{sp}^2$ ), l'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 2.9**.

**Tableau 2.9:** Déplacements chimiques en RMN  $^{13}\text{C}$  75,47 MHz des composés **5a-c**, **5f-g**.

| Composé<br>C | 5a    | 5b     | 5c    | 5f     | 5g    |
|--------------|-------|--------|-------|--------|-------|
| C-2          | 153,7 | 158,50 | 158,5 | 159,2  | 157,6 |
| C-3          | 128,8 | 129,23 | 124,3 | 127,0  | 128,4 |
| C-4          | 135,2 | 142,95 | 144,7 | 153,9  | 138,7 |
| C-4a         | 119,2 | 124,02 | 113,9 | 123,8  | 116,2 |
| C-5          | 128,1 | 119,82 | 130,9 | 136,0  | 134,4 |
| C-6          | 124,8 | 125,29 | 110,9 | 117,4  | 128,9 |
| C-7          | 129,7 | 117,48 | 158,3 | 141,7  | 129,7 |
| C-8          | 116,9 | 145,02 | 102,0 | 121,1  | 116,9 |
| C-1b         | 142,7 | 143,75 | 156,4 | 158,1  | 153,9 |
| C-9          | 191,8 | 192,68 | 192,5 | 192,0  | 192,8 |
| C-10         | 123,4 | 120,12 | 123,5 | 119,9  | 123,3 |
| C-11         | 158,5 | 159,19 | 163,6 | 160,89 | 159,0 |
| C-12         | 116,1 | 119,78 | 116,8 | 117,5  | 112,3 |
| C-13         | 133,2 | 135,76 | 134,7 | 138,0  | 135,3 |
| C-14         | 118,3 | 120,04 | 119,2 | 119,0  | 119,0 |
| C-15         | 130,8 | 131,40 | 131,6 | 131,3  | 131,1 |
| C-16         | -     | -      | -     | -      | 122,1 |
| C-17         | -     | -      | -     | -      | 127,1 |
| C-18         | -     | -      | -     | -      | 126,0 |
| C-19         | -     | -      | -     | -      | 128,6 |

## V. Etude du mécanisme de la réaction

La première étape du mécanisme proposé **Schéma 2.5** est une condensation de Knoevenagel suivie d'une déshydratation, aboutissant à la formation d'une chromone **3** stable qui pourrait exister sous deux formes tautomériques **3a** et **3b**. Dans la dernière étape, le conjugué chromone **3** subit deux types de réactions selon la conformation de l'intermédiaire: la translactonisation intramoléculaire, qui passe par la forme **3b** donne les composés **5** et une addition de Michael d'une seconde molécule de 4-hydroxycoumarine sur la forme **3a**, donne les dicoumaroles **4**.



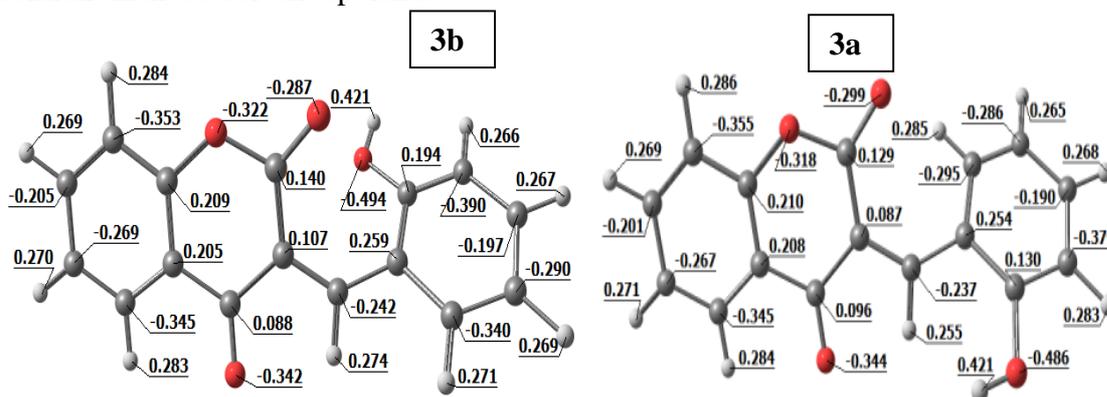
**Schéma 2.5** : Proposition de mécanisme pour la synthèse de la 6*H*,7*H*-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-*b*][1]benzopyran-6-one **4a** et des 3-(2-hydroxybenzoyl)-2*H*-chromèn-2-ones **5a**.

Afin d'expliquer la formation des deux produits, nous avons effectué les calculs théoriques des enthalpies de formation  $\Delta H_f$  et du potentiel électrostatique des charges **tableau 2.10** pour les deux rotamères **3a** et **3b** au niveau de théorie B3LYP/6-31G\* en utilisant le logiciel ORCA <sup>[10, 11]</sup>.

Selon le **tableau 2.10**, avec presque tous les substrats (R = H, OH, NO<sub>2</sub>, I) dans l'éthanol, la conformation endo-OH **3b** a une énergie plus faible que sa contrepartie exo-OH **3a**. Ce résultat pourrait expliquer l'augmentation du rendement du produit **5** qui résulte de l'attaque

intramoléculaire du -OH proximal au carbonyle de coumarinyle, comme observé dans la structure **3a**.

Par contre, si on regarde les valeurs de la charge de Mulliken de l'atome de carbone de la liaison C = O en position 2 du noyau coumarine, celle-ci est plus positive dans la forme **3b** que dans la **3a**, ce qui favorise l'approche du solvant polaire et facilite la translocation contrairement au solvant apolaire.



**Figure 2.1** : Charges de Mulliken des deux formes **3a** et **3b** dans l'éthanol.

**Tableau 2.10** : Enthalpie de formation  $\Delta H_f$  calculée des deux rotamères **3a** et **3b**.

| R                 | Solvant  | $\Delta H_f$ Kcal/mol x $10^{-3}$ |           |
|-------------------|----------|-----------------------------------|-----------|
|                   |          | <b>3a</b>                         | <b>3b</b> |
| H                 | Ethanol  | -575,45                           | -577,24   |
|                   | Méthanol | -576,93                           | -579,05   |
|                   | THF      | -573,61                           | -571,14   |
| 3-OH              | Ethanol  | -622,78                           | -624,46   |
|                   | Méthanol | -621,39                           | -619,00   |
|                   | THF      | -620,59                           | -618,07   |
| 4-OH              | Ethanol  | -620,19                           | -619,08   |
|                   | Méthanol | -617,63                           | -622,61   |
|                   | THF      | -621,81                           | -616,99   |
| 5-OH              | Ethanol  | -620,99                           | -618,48   |
|                   | Méthanol | -626,90                           | -629,16   |
|                   | THF      | -624,96                           | -624,79   |
| 5-NO <sub>2</sub> | Ethanol  | -703,53                           | -707,32   |
|                   | Méthanol | -708,40                           | -708,22   |
|                   | THF      | -700,45                           | -706,41   |
| 5-I               | Ethanol  | 578,63                            | -579,52   |
|                   | Méthanol | -578,33                           | -579,52   |
|                   | THF      | -582,64                           | -577,72   |
| Benzo[f]          | Ethanol  | -670,28                           | -670,51   |
|                   | Méthanol | -669,76                           | -669,99   |
|                   | THF      | -670,23                           | -670,68   |

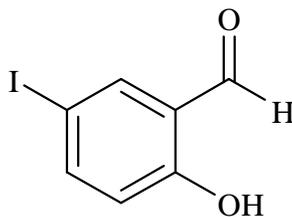
## VI. Conclusion

Dans ce travail, nous avons établi une méthodologie simple et efficace pour contrôler la sélectivité de la réaction des dérivés du salicylaldéhyde avec la 4-hydroxycoumarine dans différentes conditions. Il a été montré que la synthèse de dérivés de coumarine et de biscoumarine à partir de 2-hydroxyarylaldehydes est fortement dépendante des conditions opératoires utilisées (nature du solvant, absence ou présence du catalyseur, quantité et nature du catalyseur, nature du substituant, temps de réaction). L'absence de catalyseur et la présence d'un catalyseur basique (triéthylamine) ont favorisé la formation des composés **5**. Par contre, un catalyseur acide ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ , 5mol %) en présence de 2 éq de la 4-hydroxycoumarine **1**, en utilisant un solvant polaire protique (méthanol), a conduit à une sélectivité vers les composés **4**. Les meilleurs rendements ont été obtenus pour les composés **4** après augmentation du temps de réaction.

Les points de fusion des composés **4** et **5** synthétisés ont été déterminés sur un appareil scientifique Stuart SPM3 équipé d'un microscope et ne sont pas corrigés. Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ont été enregistrés dans des solutions de DMSO- $d_6$  sur un spectromètre Bruker Avance 300 (300,13 MHz pour  $^1\text{H}$  et 75,47 MHz pour  $^{13}\text{C}$ ). Les déplacements chimiques sont rapportés en parties par million ( $\delta$ , ppm) en utilisant le TMS comme référence interne et les constantes de couplage ( $J$ ) sont données en hertz (Hz). Les spectres de masse ESI à ions positifs ont été obtenus à l'aide d'un instrument Q-TOF 2 [en solubilisant 1 mL d'échantillon de solution de chloroforme ( $\sim 10^{-5}$  M) dans 200  $\mu\text{L}$  de solution d'acide trifluoroacétique /méthanol à 0,1%. L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation et l'argon comme gaz de collision. La tension de l'aiguille a été réglée à 3000 V, la source d'ions à 80 °C et la température de désolvatation à 150 °C. La tension du cône était de 35 V]. La microanalyse élémentaire (C, H, N) a été effectuée par l'équipement d'analyse élémentaire Truspec 630-200-200, les résultats ont été fournis avec une précision absolue  $\pm 0.2\%$  et validés par trois essais.

## I. Procédure de synthèse du 5-iodosalicyaldéhyde

Dans un ballon sec à fond rond de 500 mL, 14 mL (0,134 mol) de salicyaldéhyde et 300 mL de méthanol sont ajoutés et agités jusqu'à dissolution complète. Tout en maintenant l'agitation magnétique, 20,07 g (0,134 mol) d'iodure de sodium (NaI) ont été ajoutés. Après dissolution complète du NaI, le bécher a été placé sur un bain de glace/eau. Avec précaution, 1 éq de chloramine T a été ajouté au mélange réactionnel, une agitation magnétique a été maintenue pendant 60 minutes en maintenant la température à 0°C. Après avoir retiré le bain de glace, 100 mL d'une solution aqueuse de thiosulfate de sodium à 10% (v/v) ont été ajoutés tout en agitant pendant 5 minutes supplémentaires. Sous agitation magnétique, l'acidification du mélange réactionnel a été réalisée avec une solution de HCl (2M, environ 10 mL) jusqu'à la formation d'un précipité jaune (pH 3-4). Le solide obtenu a été filtré, lavé avec de l'eau distillée froide, séché et ensuite recristallisé dans de l'éthanol dilué (50%) pour obtenir l'iodosalicyaldéhyde sous forme de cristaux blancs.

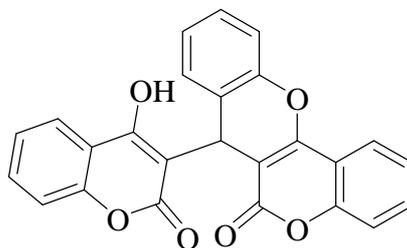
**5-iodosalicyaldéhyde**

Cristaux blancs clair, Rdt 60 %, Pf 98 °C, IR  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3220 (large, OH), 2974 (CH aliphatique), 1668 (C=O), 1604 (C=C aromatique), 557 (C-I). RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  10,93 (s, 1H, OH), 10,16 (s, 1H, CHO), 7,87 (d,  $J=2,5$ , 1H, ArH), 7,77 (dd,  $J=9,0$ ,  $J=2,5$ , 1H, ArH), 6,85 (d,  $J=9,0$ , 1H, ArH).

## II. Procédure générale pour la synthèse des 6*H*,7*H*-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-*b*][1]benzopyran-6-ones (4a-g) et 3-(2-hydroxybenzoyl)-2*H*-chromèn-2-ones (5a-c, 5f, 5g)

Un ballon sec a été chargé avec la 4-hydroxy-2*H*-chromèn-2-one **1** [(1 éq, 5 mmoles) ou (2 éq, 10 mmoles)] et (1 éq, 5 mmoles) de dérivé de salicyaldéhyde approprié (et le 2-hydroxynaphthalaldéhyde) **2a-g** ont été ajoutés, sans ou en présence d'une quantité de catalyseur dans un solvant (20 mL). Le mélange a été agité et porté à reflux. Le solide obtenu a été filtré et lavé avec du méthanol chaud et a été identifié comme les composés **4a-g** (solides non solubles dans le méthanol chaud obtenu par filtration avant refroidissement) et les composés **5a-c**, **5f**, **5g** ont été obtenus à partir du filtrat après refroidissement.

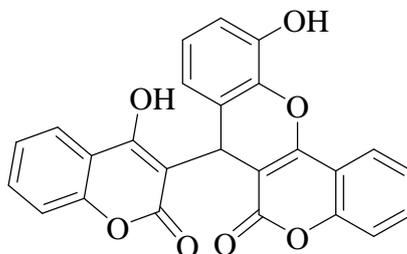
### 6*H*,7*H*-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-*b*][1]benzopyran-6-one (4a)



Poudre blanche, Pf 241-243 °C; IR  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2972, 1699, 1645, 1610, 1567, 1488, 1455, 1390, 1276, 1242, 1221, 1106, 1044, 979, 905, 866, 757  $\text{cm}^{-1}$ , RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  5,75 (s, 1H, H\*), 7,15–7,68 (m, 11H, ArH), 8,09–8,12 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H, ArH), 12,20 (L, s, OH-pyr); RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  28,7 (C\*), 100,6, 106,1, 113,9, 116,1, 116,2, 116,5, 122,2, 122,6, 123,9, 124,5, 125,3, 128,3, 128,6, 149,2, 151,7, 152,2, 156,3 160,4. MS (ESI $^+$ ): m/z (%):

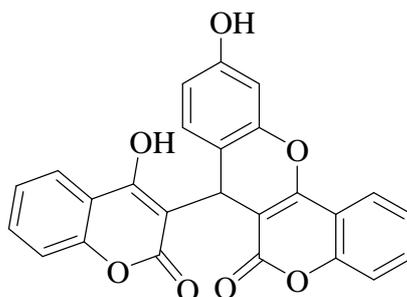
433,2 (100 %)  $[M+Na]^+$ . Analyse élémentaire: calculée pour  $C_{25}H_{14}O_6$ : C 73,17; H 3,44; mesurée: C 73,20; H 3,50.

**10-Hydroxy-6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one (4b)**



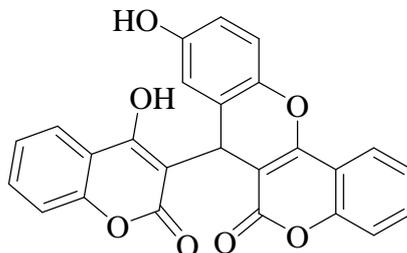
Poudre blanche, Pf 265-267 °C; RMN  $^1H$  (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  5,71 (s, 1H, CH), 6,61 (d,  $J=6,63$ Hz, 1H, ArH) 6,82 (d,  $J= 6,8$  Hz, 1H, ArH), 7,32-7,50 (m, 6H, ArH), 7,52 (t,  $J= 7,51$ Hz,  $J'=7,52$  Hz, 1H, ArH), 7,76 (t,  $J=7,74$  Hz,  $J'=7,75$  Hz, 1H, ArH), 8,31 (d,  $J=8,3$  Hz, 1H, ArH), 9,85 (L, s, OH-Ar), 12,20 (L, s, OH-pyr.); RMN  $^{13}C$  (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  28,7 (C\*), 107,3, 114,0, 115,5, 116,1, 116,2,116,3, 118,3, 123,2, 123,9, 124,4, 125,2, 132,2, 132,4, 145,1, 151,9, 152,1, 160,5. MS (ESI $^+$ ): m/z (%): 449,2 (100%)  $[M+Na]^+$ . Analyse élémentaire: Calculée pour:  $C_{25}H_{14}O_7$ : C 70,42; H 3,31; mesurée: C 70,50; H 3,39.

**11-Hydroxy-6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one (4c)**



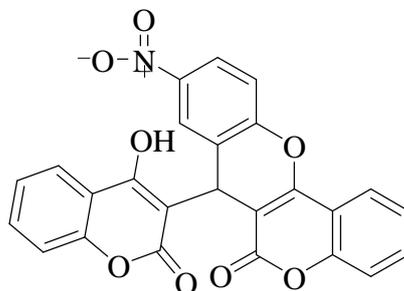
Poudre rose, Pf 235-237 °C; RMN  $^1H$  (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  5,62 (s, 1H, CH), 6,57 (d,  $J=6,6$  Hz, 1H, ArH), 6,71 (d,  $J= 6,7$  Hz, 1H, ArH), 6,98 (d,  $J= 7,0$  Hz, 1H, ArH), 7,31-7,73 (m, 7H, ArH), 8,08 (d,  $J=8,1$  Hz, 1H, ArH), 9,79 (L, s, OH-Ar), 12,12 (L, s, OH-pyr) ; RMN  $^{13}C$  (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  28,1 (C\*), 102,7, 112,9, 113,8, 116,2, 116,4, 117,2, 122,7, 123,9, 124,5, 129,1, 132,1, 132,4, 149,7, 151,9, 152,1, 157,3, 160,5. MS (ESI $^+$ ): m/z (%): 449,2 (100%)  $[M+Na]^+$ . Analyse élémentaire: Calculée pour  $C_{25}H_{14}O_7$ : C 70,42; H 3,31; mesurée: C 70,50; H 3,39.

**9-Hydroxy-6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one (4d)**



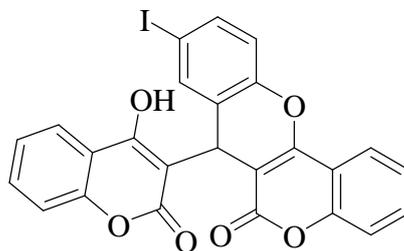
Poudre grise, Pf 292-294 °C; RMN <sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 5,67 (s, 1H, H\*), 6,60 (s, 1H, ArH) 6,68 (d, *J*= 6,70 Hz, 1H, ArH), 7,1 (d, *J*= 7,17 Hz, 1H, ArH), 7,33-7,48 (m, 5H, ArH), 7,59 (t, *J*= 7,60 Hz, *J'*= 7,60 Hz 1H, ArH), 7,67 (t, 1H, ArH), 8,05 (d, *J*= 8,06 Hz, 1H, ArH), 9,39 (L, s, OH-Ar), 12,24 (L, s, OH-pyr.); RMN <sup>13</sup>C (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 28,7 (C\*), 98,8, 113,9, 114,0, 115,2, 116,4, 117,1, 122,6, 123,9, 124,5, 132,2, 132,4, 142,0, 142,1, 151,9, 152,2, 154,5, 160,5. MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* (%): 449,1 (100%) [M+Na]<sup>+</sup>. Analyse élémentaire: Calculée pour C<sub>25</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>: C 70,42; H 3,31; mesurée: C 70,50; H 3,39.

**9-Nitro-6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one (4e)**



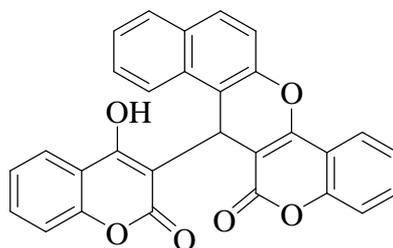
Poudre blanche, Pf 312-315 °C; I.R ν (cm<sup>-1</sup>): 3309, 3072, 1703, 1670, 1646, 1629, 1609, 1523, 1496, 1455, 1392, 1337, 1286, 1243, 1218, 1185, 1111, 1090, 1059, 904, 848, 754. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 6,20 (s, 1H, H\*), 6,79 (d, *J*=8,8 Hz, 1H, ArH) 7,22–7,26 (m, 4H, ArH), 7,48–7,52 (m, 2H, ArH), 7,82 (d, *J*=7,2 Hz, 2H, ArH), 7,93 (dd, *J*=8,8 Hz, *J'*=2,8 Hz, 1H, ArH), 8,04 (d, *J*=8,0 Hz, 1H, ArH), 12,43 (L, s, OH-pyr); RMN <sup>13</sup>C (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 28,6 (C\*), 102,5, 112,5, 113,3, 116,6, 117,6, 123,1, 124,4, 124,7, 125,0, 132,5, 132,9, 133,3, 144,2, 152,3, 154,3, 159,7, 160,1. MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* (%): 478,1 (100%) [M+Na]<sup>+</sup>. Analyse élémentaire : Calculée pour C<sub>25</sub>H<sub>13</sub>O<sub>8</sub>N: C 65,94, H 2,88, N 3,08, mesurée: C 66,02, H 2,96, N 3,04.

**9-Iodo-6*H*,7*H*-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-*b*][1]benzopyran-6-one (4f)**

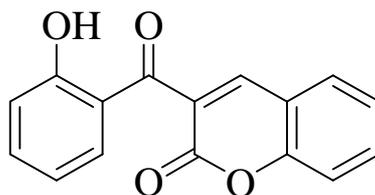


Poudre blanche, Pf 295-297 °C; RMN <sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 5,69 (s, 1H, CH), 7,16 (d, *J*=7,19 Hz, 1H, ArH), 7,31-7,48 (m, 5H, ArH), 7,57-7,71 (m, 3H, ArH), 8,05 (dd, *J*=8,07 Hz, *J*'=2,1 Hz, 1H, ArH), 8,07 (d, *J*=8,09 Hz, 1H, ArH), 12,33 (L, s, OH-pyr.); RMN <sup>13</sup>C (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 28,9, 102,80, 116,5, 116,6, 118,2, 118,9, 122,6, 124,5, 125,4, 126,3, 132,7, 134,5, 137,4, 144,5, 152,4, 152,7, 152,8, 160,7. MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* (%): 558,9 (100%) [M+Na]<sup>+</sup>. Analyse élémentaire: Calculée pour C<sub>25</sub>H<sub>13</sub>IO<sub>6</sub>: C 55,99, H 2,44, mesurée: C 56,02, H 2,56.

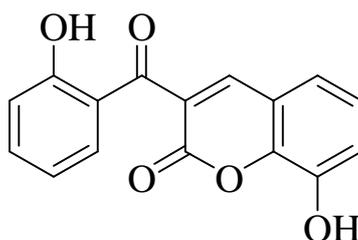
**6*H*,7*H*-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzo[*f*]benzopyrano[4,3-*b*][1]benzopyran-6-one (4g)**



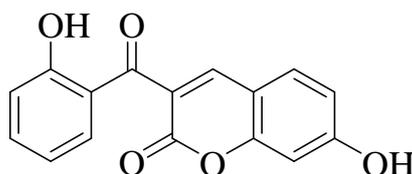
Poudre rose, Pf 298-300 °C; RMN <sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 6,19 (s, 1H, CH), 7,26 (t, *J*=7,7, *J*'= 6,0 Hz, 2H, ArH) 7,42-7,63 (m, 7H, ArH), 7,69-7,74 (m, 2H, ArH), 7,93 (t, *J*=9,0 Hz, *J*'= 9,0 Hz, 2H, ArH), 8,16 (dd, 1H, *J*=8,2 Hz, *J*'= 2,1 Hz), 12,66 (L, s, OH-pyr.); RMN <sup>13</sup>C (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 27,0 (C\*), 101,3, 113,7, 115,8, 116,2, 116,5, 117,0, 122,7, 123,9, 124,5, 124,9, 125,0, 127,2, 128,7, 129,2, 132,3, 132,6, 138,4, 152,0, 152,2, 160,5; MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* (%): 483,2 (100%) [M+Na]<sup>+</sup>. Analyse élémentaire: Calculée pour: C<sub>29</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>: C 75,65; H 3,50; mesurée: C 75,86; H 3,65.

**3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromèn-2-one (5a)**

Poudre jaune, Pf 175-177°C; I.R  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3403 (OH), 1716 (O=C-O); RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  6,90–6,97 (m, 2H, HAr), 7,40–7,50 (m, 3H, HAr), 7,67–7,74 (m, 2H, HAr), 7,86 (d,  $J=7,6$  Hz, 1H, HAr), 8,34 (s, 1H, H-4), 10,69 (L, s, OH-11) ; RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ) :  $\delta$  116,1, 116,9, 118,3, 119,2, 123,4, 124,8, 128,1, 128,8, 129,7, 130,8, 133,2, 135,2, 142,7, 153,7, 158,5, 191,8. Ms (ESI $^+$ ): m/z (%): 267,1 (100%)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Analyse élémentaire: Calculée pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_4$ : C 72,18 ; H 3,79 ; mesurée: C 72,02 ; H 3,60.

**8-hydroxy-3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromèn-2-one (5b)**

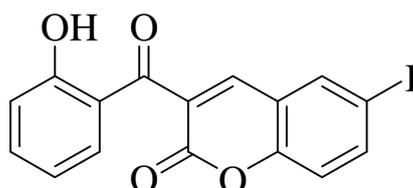
Poudre jaune, Pf 252-254 °C; RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  6,90-6,97 (m, 2H, Ar-H), 7,19-7,30 (m, 3H, Ar-H), 7,45-7,51 (m, 1H, Ar-H), 7,66-7,69 (m, 1H, Ar-H), 8,27 (s, 1H, H-4), 10,37 (-OH-8), 10,68 (-OH-11); RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ) :  $\delta$  117,48, 119,78, 119,82, 120,04, 120,12, 124,02, 125,29, 129,23, 131,40, 135,76, 142,95, 143,75, 145,02, 158,50, 159,19, 192,68. MS (ESI $^+$ ): m/z (%): 305,1 (100%)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Analyse élémentaire: Calculée pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_5$ : C 68,09 ; H 3,57 ; mesurée: C 68,12 ; H 3,60.

**7-hydroxy-3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromèn-2-one (5c)**

Poudre jaune, Pf 254-256 °C ; RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  6,78 (s, 1H, HAr), 6,84 (d,  $J=7,6$  Hz, 1H, HAr), 6,87 (d,  $J=8,0$  Hz, 1H, HAr), 6,90 (t, 1H, HAr), 7,71 (d,  $J=7,8$  Hz, 1H, HAr), 7,42 (t, 1H, HAr), 7,59 (d,  $J=7,6$  Hz, 1H, HAr), 8,28 (s, 1H, H-4), 9,93 (s, 1H, OH-7), 10,64 (s, 1H,

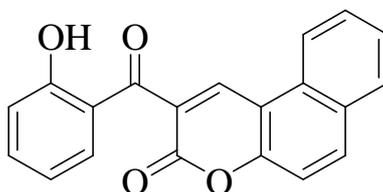
OH-11); RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  102,0, 110,9, 113,9, 116,8, 119,2, 123,5, 124,3, 130,9, 131,6, 134,7, 144,7, 156,4, 158,3, 158,5, 163,6, 192,5. MS (ESI $^+$ ): m/z (%): 305,1 (100%) [M+Na] $^+$ . Analyse élémentaire: Calculée pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_5$ : C 68,09 ; H 3,57 mesurée: C 68,22 ; H 3,50.

### 3-(2-hydroxybenzoyl)-6-iodo-2H-chromèn-2-one (5f)



Poudre jaune, Pf 252-234 °C; RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  6,92-6,96 (m, 2H, ArH), 7,29 (d,  $J=7,3$  Hz, 1H, HAr), 7,47-7,52 (m, 1H, ArH), 7,69 (d,  $J=7,7$  Hz, 1H, HAr), 7,97 (d,  $J=7,8$  Hz, 1H, HAr), 8,26 (s, 1H, HAr), 8,27 (s, 1H, H-4), 10,74 (s, br, OH-11); RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  117,4, 117,5, 119,0, 119,9, 121,1, 123,8, 127,0, 130,2, 131,3, 136,0, 138,0, 141,7, 153,9, 158,1, 159,2, 192,0, 160,89. MS (ESI $^+$ ): m/z (%): 414,9 (100%) [M+Na] $^+$ . Analyse élémentaire: Calculée pour  $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{IO}_4$ : C 49,01 ; H 2,31 mesurée: C 48,92 ; H 2,40.

### 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-benzo[f]chromèn-2-one (5g)



Poudre jaune, Pf 254-256°C; IR  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3486 (OH), 1571 (C=C-aromatic); RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  6,93 (d,  $J=7,8$  Hz, 2H, HAr), 7,49 (t, 2H, HAr), 7,72 (t, 2H, HAr), 7,65 (d,  $J=7,8$  Hz, 1H, HAr), 8,10 (d,  $J=7,7$  Hz, 1H, HAr), 8,30 (d,  $J=7,6$  Hz, 1H, HAr), 8,63 (d,  $J=8,0$  Hz, 1H, HAr), 9,13 (s, 1H, H-4), 10,78 (s, 1H, OH-11); RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  112,3, 116,2, 116,9, 119,0, 122,1, 123,3, 126,0, 127,1, 128,4, 128,6, 128,9, 129,7, 131,1, 134,4, 135,3, 138,7, 153,9, 157,6, 159,0, 192,8; MS (ESI $^+$ ): m/z (%): 339,1 (100%) [M+Na] $^+$ . Analyse élémentaire: Calculée pour :  $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_4$ : C 75,94; H 3,82; mesurée: C 75,80; H 3,75.

# Chapitre 2

*Evaluation de l'activité antioxydante in-vitro, docking et étude de la dynamique moléculaire des benzoylchromènes et des chroménochromènes.*

## I. Introduction

Le stress oxydatif est le processus de génération de radicaux libres, y compris les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS). Ce sont des conséquences inévitables du métabolisme aérobie des sous-produits, qui endommagent la structure et la fonction des organites cellulaires. L'augmentation de concentrations de ROS et RNS dans le métabolisme sont liées au développement de maladies [12]. Le piégeage ou la prévention de la génération de ces radicaux libres est réalisé par un système de défense antioxydatif efficace qui peut contenir divers types d'antioxydants.

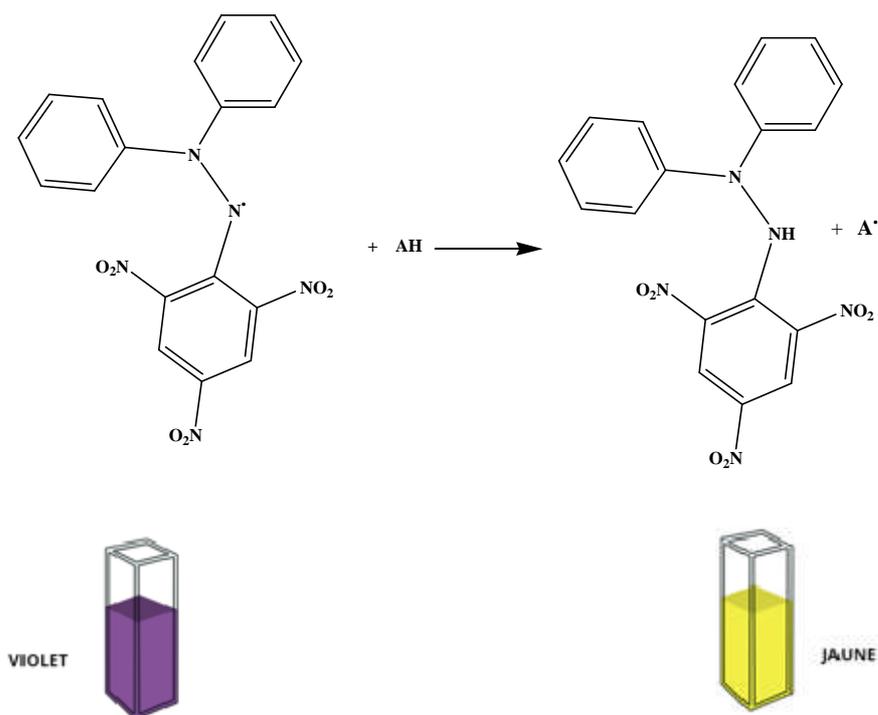
Bien que les effets protecteurs ont été principalement attribués aux antioxydants bien connus, tels que la vitamine C, la vitamine E, les composés phénoliques des plantes ou synthétiques peuvent également jouer un rôle important. Il existe plusieurs méthodes permettant d'évaluer l'activité de piégeage des radicaux libres, mais la méthode la plus facile et la plus utilisée est celle qui fait intervenir le radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH<sup>•</sup>), ce dernier est considéré comme un très bon modèle *in-vitro* pour l'évaluation de l'activité antioxydante.

Nous avons vu dans la première partie de cette thèse l'application des composés à motif coumarinique dans le domaine thérapeutique, ils peuvent être de forts agents antioxydants ou de potentiels agents anticancéreux. Nous rapportons donc dans ce chapitre l'évaluation de l'activité anti-radicalaire *in-vitro* des benzoylchromènes **5a-c**, **5f-g**, des chroméno-chromènes fusionnés **4a-g** ainsi que les résultats du docking moléculaire. Cette méthode nous a permis d'évaluer d'une manière théorique le potentiel de ces composés comme agents inhibiteurs de la protéine kinase activée par les mitogènes p38 (MAPK P38) qui est une enzyme cible anticancéreuse.

## II. Evaluation de l'activité antioxydante des dérivées du 6*H*,7*H*-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-*b*][1]benzopyran-6-ones (**4a-g**) et 3-(2-hydroxybenzoyl)-2*H*-chromèn-2-ones (**5a-c**, **5f**, **5g**)

L'activité antioxydante des composés synthétisés **4a-g**, **5a-c**, **5f-g** a été évaluée en utilisant le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH<sup>•</sup>) [13,14]. La méthode du DPPH<sup>•</sup> est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH<sup>•</sup> En

présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une molécule diamagnétique DPPH-H; 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (forme non-radicalaire). La réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, initialement violet foncé sous sa forme libre, devient jaune pâle après transfert d'électron ou d'hydrogène par des composés antioxydants. Cette réduction qui se traduit par une diminution de l'absorbance de la solution de DPPH<sup>•</sup> en présence d'antioxydant est suivie par spectrophotométrie à 517 nm par apport à l'acide ascorbique qui est utilisé comme témoin (antioxydant commercial).



**Figure 2.2** : Structure du DPPH<sup>•</sup> et sa réduction par le composé antioxydant AH.

### II.1. Pourcentage d'inhibition (RSA)

La **figure 2.3** montre la variation de l'absorbance en fonction de la concentration des différents composés **4a-g**, **5a-c**, **5f-g** et de l'acide ascorbique qui est utilisé comme référence. Une absorbance plus faible du mélange réactionnel indique une activité de piégeage des radicaux libres plus élevée. L'effet de piégeage du DPPH<sup>•</sup> ou le pourcentage d'inhibition est calculé à l'aide de l'équation (1) :

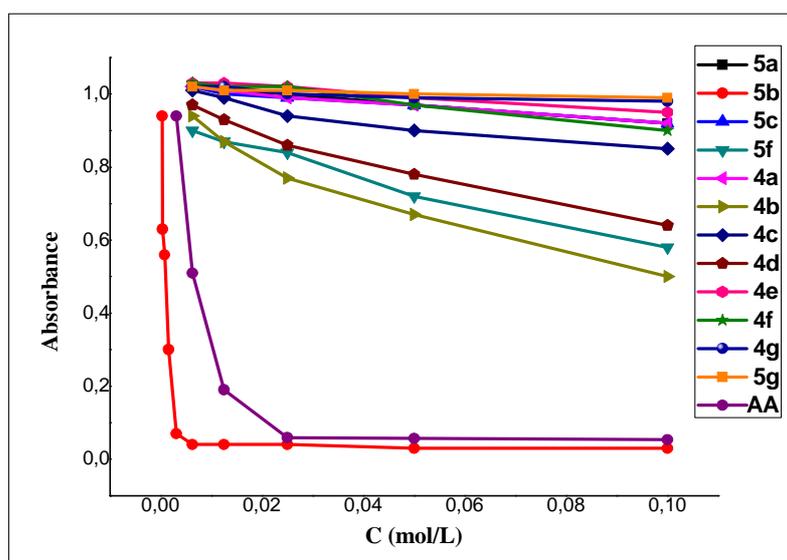
$$\text{RSA (\%)} = [(\text{Ac} - \text{As})/\text{Ac}] \times 100$$

Où Ac est l'absorbance du contrôle (absorbance du DPPH<sup>•</sup> Dans une solution d'éthanol sans échantillon), et As est l'absorbance du composé testé après 60 min d'incubation.

Ces essais révèlent que le composé **5b** possède une excellente activité antioxydante ( $IC_{50} = 0,2357$  mg/mL), suivi par les composés **4b** et **5f**. En revanche, les autres dérivés coumariniques **5a**, **5g**, **4e**, **4g** ne présentent pas d'activité significative. D'après les résultats obtenus, on remarque que la condensation d'une seconde molécule de 4-hydroxycoumarine (composé **4b**, **4f**) conduit à une diminution de l'activité antioxydante ( $RSA (\%)$  **5b** > **4b**, **5f** > **4f**).

Les résultats obtenus ont montré que la présence et la position des groupes hydroxyles a un impact significatif sur l'activité antioxydante. La meilleure inhibition a été observée lorsque le groupe -OH est en position méta.

L'introduction d'un substituant halogène (Iode) dans les composés **5f** et **4f** a conduit à une augmentation de l'activité antioxydante.



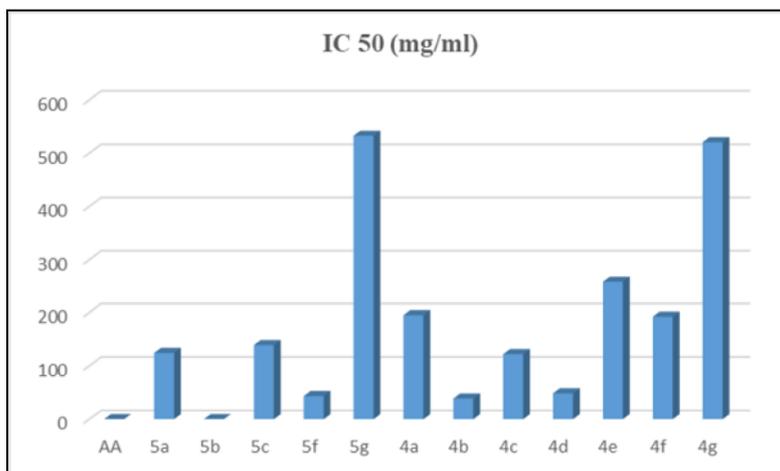
**Figure 2.3 :** Variation de l'absorbance en fonction de la concentration des différents composés **4**, **5** et du standard (**AA**).

## II.2. Concentration Minimale Inhibitrice $IC_{50}$

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  $IC_{50}$  est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. Les résultats exprimés en  $IC_{50}$  sont calculés à partir des courbes de la

variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration, par interpolation ou extrapolation à 50% d'inhibition.

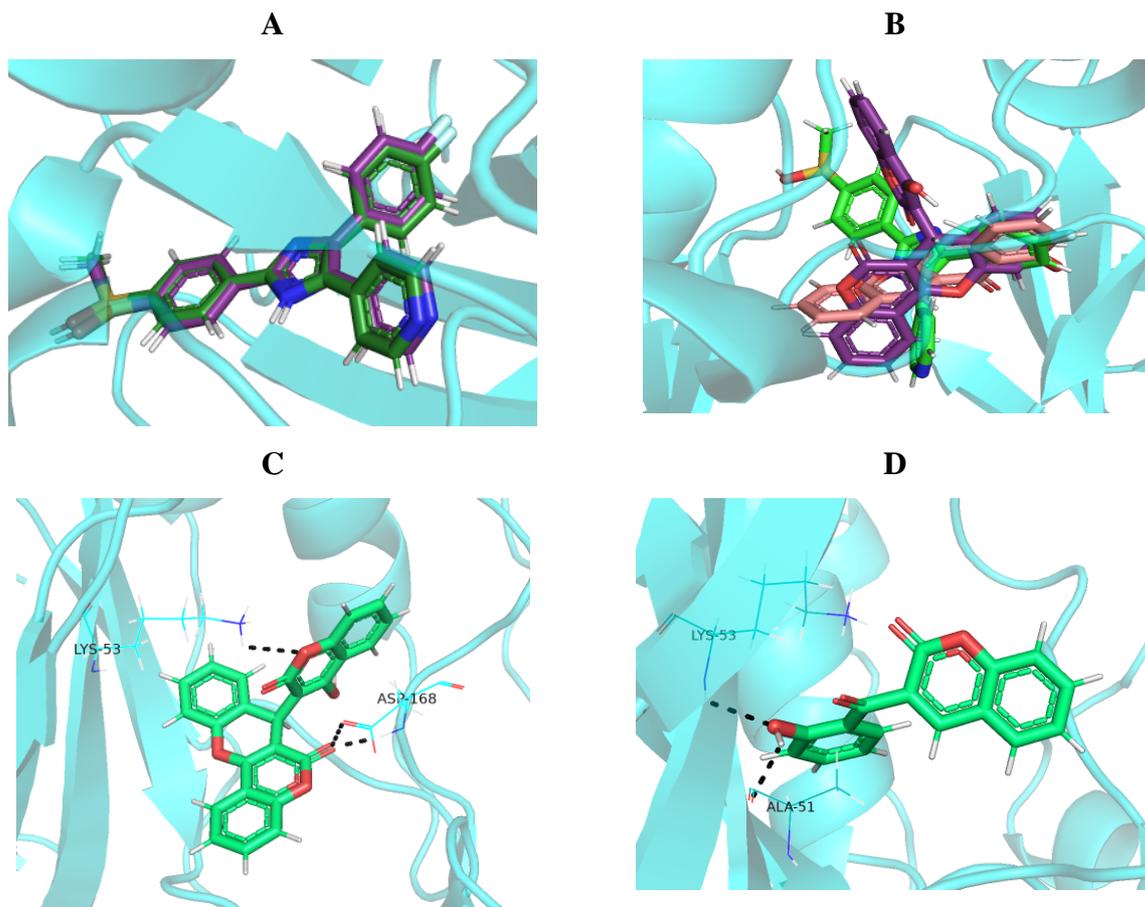
La  $IC_{50}$  des composés les plus actifs est présentée dans la (Fig.2.4). Ces essais révèlent que le composé **5b** a présenté une excellente activité antioxydante ( $IC_{50}= 0,2357$  mg/mL), suivi par le composé **4b** ( $IC_{50}= 38,77$  mg/mL).



**Figure 2.4:** Valeurs d' $IC_{50}$  de l'activité antioxydante pour les composés **5b**, **4b** et le standard **AA**.

### III. Mise en docking moléculaire

Afin d'évaluer le potentiel de nos composés synthétisés contre la pathologie cancéreuse, nous avons étudié ici leurs modes de liaison, leurs interactions et leurs énergies de liaison avec la protéine kinase activée par les mitogènes p38 (**p38 MAPK**). Les résultats montrent que presque tous les composés dockés se lient au même site de liaison dans le site actif de la p38 MAPK tel que déterminé expérimentalement. Notre méthode de docking a d'abord été validée avec le ligand connu **SB2**, un inhibiteur puissant de p38 MAPK, en utilisant la structure du complexe protéine-ligand PDB : 1a9u. De manière satisfaisante, la comparaison entre le positionnement calculé et expérimental de **SB2** dans la protéine montre que la conformation arrimée était proche de celle du cristal (comme le montre la **Fig. 2.5 A**). La RMSD entre les deux conformations était de 0,75 Å, ce qui est tout à fait correct comme ça été démontré précédemment [15].



**Figure 2.5 :** Superposition des structures A- dockées (vert) et expérimentale (magenta) de **SB2**; B- composés **4a** (magenta), **5a** (rose) et structures expérimentales (vert) de **SB2**; C et D- interactions de liaison hydrogène entre les résidus du site actif de p38 MAPK et les composés synthétisés C- **4a**, D- **5a**. Le squelette de la protéine est présenté en ruban bleu.

La superposition des conformations dockées des composés synthétisés **4a** et **5a** sur la structure aux rayons X de **SB2** montre que les modes de liaison de **4a** et **5a** sont effectivement les plus proches de ceux observés dans le complexe cristallographique 1a9u, comme le montre la **Fig.2.5 B**.

La visualisation des conformations dockées de **4a** et **5a** montre que les composés synthétisés sont impliqués dans des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes avec les résidus du site actif de la protéine. Le composé **4a** a interagi avec différents acides aminés comme le montrent la **Fig. 2.5 C** et le **tableau 2.11**. Il établit deux liaisons hydrogène avec le résidu **Asp168** et une avec **Lys53**. D'autre part, le composé **5a** établit une liaison hydrogène avec le résidu **Ala51** et une avec **Lys53** (**Fig. 2.5 C** et **tableau 2.11**).

Dans le **tableau 2.11**, nous avons rapporté les énergies de liaison de **4a** et **5a**, les liaisons hydrogène et les résidus interagissant du site actif ( $< 4 \text{ \AA}$ ). Les énergies de liaison entre les composés synthétisés et la protéine MAPK p38 sont négatives. Il convient de noter que la valeur négative du changement d'énergie de liaison révèle que le processus de liaison est spontané et que le composé pourrait être accepté comme un médicament.

D'autre part, l'énergie de liaison calculée du composé **4a** est inférieure à celle du ligand expérimental **SB2** **tableau 2.11**. Sur la base de ce résultat, on peut supposer que le composé **4a** synthétisé présente des affinités plus élevées pour la protéine MAPK p38. En outre, les résidus d'interaction, à savoir **Asp168**, **Leu104**, **Lys53** et **Ala51**, sont prédits par notre modèle de docking comme étant conservés dans les trois composés étudiés.

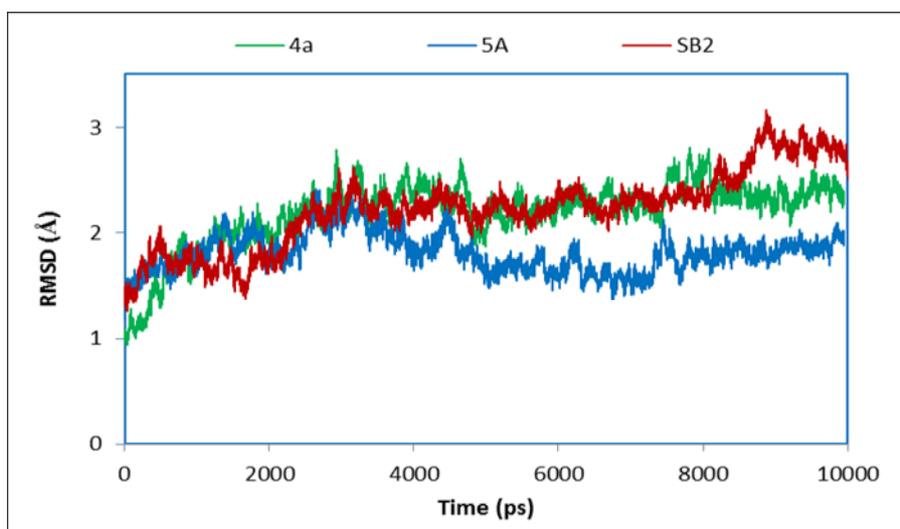
**Tableau 2.11** : Résidus d'interaction, liaisons hydrogène et énergies de liaison des composés étudiés tels que prédits par le logiciel iGEMDOCK.

| Composé    | Liaisons hydrogène                            | Résidus d'interaction  | Énergie de liaison |
|------------|---|--|--------------------|
| <b>4a</b>  | <b>Asp168</b> (2 liaisons H),<br><b>Lys53</b> | <b>Asp168</b> , Glu71, Leu167, <b>Leu104</b> ,<br><b>Lys53</b> , <b>Ala51</b> , Met109,                          | <b>-104,37</b>     |
| <b>5a</b>  | <b>Ala51</b> , <b>Lys53</b>                   | <b>Asp168</b> , Leu167, <b>Leu104</b> , <b>Lys53</b> ,<br>Val38, <b>Ala51</b>                                    | <b>-77,13</b>      |
| <b>SB2</b> | <b>Met109</b> , <b>Lys53</b>                  | <b>Asp168</b> , Met109, His107, Thr106,<br>Val105, <b>Ala51</b> , <b>Leu104</b> , <b>Lys53</b> ,<br>Val38, Tyr35 | <b>-98,80</b>      |

## IV. Études de dynamique moléculaire

Des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées pour confirmer le mode de liaison et la stabilité des ligands amarrés **4a** et **5a** avec le p38 MAPK. La stabilité des systèmes étudiés a été évaluée sur la base du changement de la RMSD des ligands dans le site actif de la protéine et de la RMSD des carbones  $\alpha$  du squelette de la protéine et comparée à celles du ligand expérimental **SB2**.

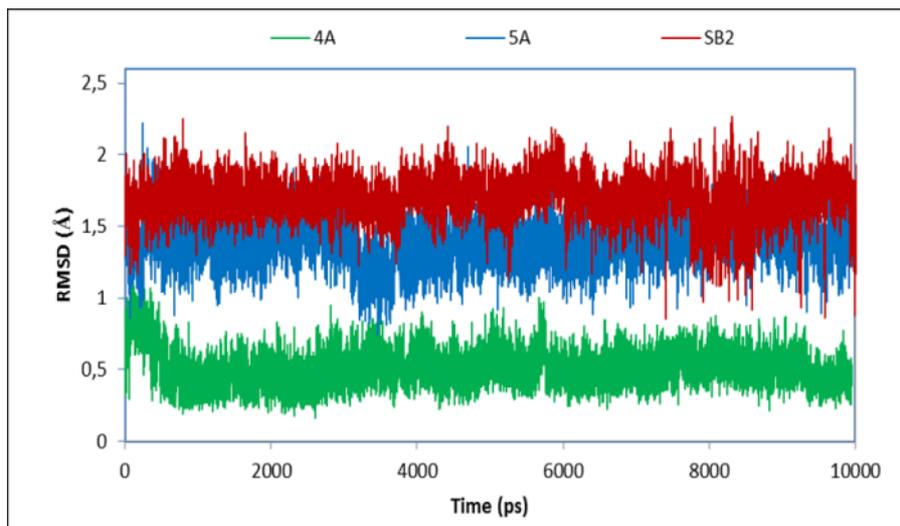
Les tracés RMSD calculés des atomes  $C\alpha$  du squelette de la protéine des systèmes étudiés (**4a**-p38 MAPK, **5a**-p38 MAPK et **SB2**-p38 MAPK), à travers les 10 ns de dynamique moléculaire sont rapportés dans la **figure. 2.6**.



**Figure 2.6** : Graphiques RMSD des atomes  $C\alpha$  du squelette des complexes **4a**-p38 (vert), **5a**-p38 (bleu) et **SB2**-p38 (rouge).

La **figure 2.7** montre que le squelette  $C\alpha$  des complexes **5a**-p38 et **4a**-p38 présente de petites fluctuations jusqu'à 5 ns, où le complexe atteint la stabilité à environ 1,5 Å et 2,2 Å de RMSD respectivement, jusqu'à la fin de la simulation. La RMSD du squelette  $C\alpha$  de **SB2**-p38 augmente jusqu'à 8,3 Å, elle se stabilise à 2,8 Å jusqu'à la fin de la simulation.

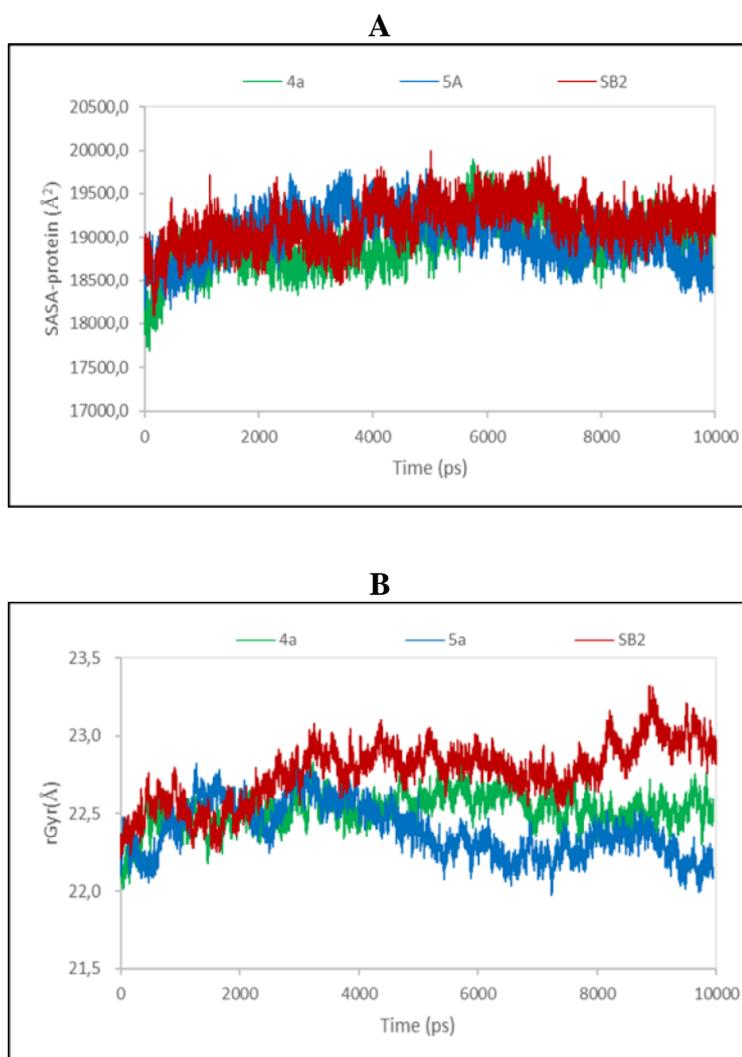
Les tracés RMSD calculés des trois ligands étudiés **4a**, **5a** et **SB2**, à travers les 10 ns de dynamique moléculaire sont rapportés dans la **figure. 2.7**.



**Figure 2.7** : Graphiques RMSD des composés étudiés **4a** (vert), **5a** (bleu) et **SB2** (rouge) au cours des 10 ns de simulations de dynamique moléculaire.

L'analyse des résultats évoque quelques différences entre les trois courbes indiquant certains mouvements des composés étudiés dans le site actif de p38. Les valeurs RMSD calculées du composé **4a** diminuent de 1 Å à 0,5 Å jusqu'à 0,5 ns, et restent constantes jusqu'à la fin du temps de simulation. Ce résultat confirme que le composé **4a** atteint l'équilibre à 0,5 ns, révélant qu'il a convergé pendant la simulation. D'autre part, la forme de la courbe RMSD calculée pour le composé **5a** s'approche d'une ligne horizontale pendant tout le temps de la simulation, à la valeur moyenne de RMSD de 1,4 Å, indiquant que le composé atteint l'équilibre et que son changement de conformation est très faible. Au contraire, le composé expérimental **SB2** est stable jusqu'à 7 ns, par la suite quelques fluctuations ont été observées.

La surface accessible au solvant (SASA) et le rayon de giration (rGyr) ont été calculés pour les trois complexes étudiés pendant les 10 ns de la simulation de dynamique moléculaire afin d'illustrer le changement structural de la protéine, les résultats sont rapportés dans la **figure. 2.8**. Ces deux paramètres sont largement utilisés comme critère d'équilibre [16,17].



**Figure 2.8** : Tracés calculés de **A**- SASA de la protéine ; **B**- rayon de giration pour les trois complexes étudiés **4a**-p38 (vert), **5a**-p38 (bleu) et **SB2**-p38 (rouge) à travers les 10 ns de simulation de dynamique moléculaire.

Les valeurs moyennes de la SASA totale calculée pour les complexes **SB2**-p38 MAPK, **4a**-p38 MAPK et **5a**-p38 MAPK sont respectivement de 19178,6 Å<sup>2</sup>, 18926,0 Å<sup>2</sup> et 19018,58 Å<sup>2</sup> (**Fig. 2.8 A**). Les SASA des complexes **4a**-p38 MAPK et **5a**-p38 MAPK présentent un comportement similaire au comportement expérimental jusqu'à 6 ns, par la suite une légère diminution des SASA du complexe **5a**-p38 MAPK a été observée.

Le rayon de giration calculé (rGyr) pour les complexes **4a**-p38 MAPK et **5a**-p38 MAPK présente des fluctuations moindres par rapport au **SB2**-p38 MAPK, ce qui révèle que les systèmes composés de nos produits synthétisés **4a** et **5a** et de la protéine p38 MAPK ont une conformation plus compacte.

## V. Conclusion

D'après l'évaluation de l'activité antioxydante *in-vitro* des composés préparés **4a-g** et **5a-c, 5f-g**, on peut souligner que le dérivé **5b** portant un groupe catéchol présente une activité plus élevée à faible concentration.

Les études de docking et de dynamique moléculaire ont permis de mieux comprendre la stabilité moléculaire des composés synthétisés **4a** et **5a**, elles ont également montré que ces composés se lient au site de liaison à l'ATP du p38 MAPK, de la même manière que les inhibiteurs polyaromatiques puissants connus. Les composés synthétisés pourraient être envisagés pour la thérapie du cancer.

## I. Évaluation du piégeage des radicaux libres des 6*H*,7*H*-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-*b*][1]benzopyran-6-ones (**4a-g**) et 3-(2-hydroxybenzoyl)-2*H*-chromèn-2-ones (**5a-c**, **5f**, **5g**)

La capacité de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> a été mesurée à partir de la décoloration d'une solution éthanolique de DPPH<sup>•</sup> de couleur violette, selon la méthode décrite par L.L. Mensor [13] et al, J.S. Lee et al [14]. La solution mère de DPPH a été préparée en dissolvant 4 mg de ce dernier dans 100 mL d'éthanol. Les composés **4** et **5** ont été dissous dans du DMSO pour obtenir une solution de 10<sup>-1</sup> M. Les composés testés ont été dilués davantage avec du DMSO pour obtenir des concentrations finales de 0,05, 0,025 et 0,0125 mol/L pour tous les composés, tandis que le standard (acide ascorbique) a été dilué à des solutions de 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125, 0,00625, 0,003125, 0,0015625 mol/L, respectivement. Les tubes ont été chargés avec 40 µL de l'échantillon testé et ensuite avec 2 mL de la solution de DPPH, tous les essais étant effectués en triplicata. Les tubes de contrôle négatif ont été chargés avec 40 µL de DMSO et 2 mL de solution de DPPH. Après agitation, les mélanges ont été incubés à température ambiante pendant 1 h dans l'obscurité à 25 °C, puis l'absorbance de chaque échantillon a été enregistrée à 517 nm. Un blanc contenant uniquement de l'éthanol avec du DMSO a été utilisé comme contrôle.

## II. Études de docking moléculaire

Des études de docking moléculaire ont été menées pour évaluer le potentiel des composés **4a**, **5a** à inhiber la p38 MAPK, une enzyme cible anticancéreuse. Dans ce but, **4a**, **5a** ainsi que l'inhibiteur connu **SB2**, appartenant structurellement à la famille des pyridinyl-imidazoles, ont été dockés dans le site actif de la p38 MAPK, en utilisant le programme iGEMDOCK v 2,1 [18], afin de prédire leur mode de liaison, leurs interactions et leurs énergies de liaison avec cette protéine. Les structures ont été dessinées à l'aide du logiciel MarvinSketch [19] et les fichiers PDB correspondants ont été importés dans le logiciel iGEMDOCK v2,1 comme ligands. Les coordonnées de la protéine p38 MAPK ont été téléchargées depuis la Protein Data Bank [20] (PDB : 1a9u avec une résolution de 2,50 Å, correspondant à la protéine p38 MAPK complexée avec l'inhibiteur **SB2**). Le site actif a été identifié à une distance de 8 Å du centre du ligand lié **SB2**. Toutes les simulations de docking ont été réalisées avec un docking standard, une taille de population de 200, 70 générations et un nombre de solutions de 2. Les modes de liaison et les énergies de docking obtenus pour **4a**, **5a** ont été comparés à ceux de l'inhibiteur puissant **SB2**.

### III. Études de dynamique moléculaire

Afin d'évaluer la stabilité des complexes dockés, **4a**-p38 MAPK, **5a**-p38 MAPK et **SB2**-p38 MAPK, nous les avons soumis à 10 ns de simulations de dynamique moléculaire, en utilisant le même protocole de dynamique moléculaire que dans nos travaux précédents [16]. Ainsi, nous avons utilisé le logiciel Nano Molecular Dynamics NAMD 2,12 [21] avec le champ de force CHARMM 36. Les topologies des ligands ont été générées en utilisant le serveur web CHARMM General Force Field (CGenFF). Tous les complexes ont été solvatés dans une boîte à eau cubique de longueur d'arête 10 Å, puis neutralisés avec du NaCl. La méthode Ewald à maille de particules (PME) [22] a été utilisée avec une coupure non liée de 12 Å et un espacement de grille de 1 Å pour inclure la contribution des interactions à courte/longue portée. Des conditions aux limites périodiques (PBC) [23] ont été utilisées et la température et la pression ont été maintenues constantes en utilisant respectivement le thermostat de Langevin (310 K) et le barostat de Langevin (1 atm). Ensuite, les trois systèmes ont subi 5000 étapes de minimisation de l'énergie par descente la plus raide pour éliminer les chevauchements atomiques ou les géométries inappropriées. Après cela, les systèmes étudiés ont été équilibrés pendant 100 ps sous le nombre constant de particules, la pression et la température (NPT). Enfin, les systèmes obtenus ont été soumis à 10 ns de dynamique moléculaire en utilisant des pas de temps de 2 fs. Les résultats obtenus ont été visualisés et analysés à l'aide du logiciel VMD [24] et du visualiseur Discovery Studio [25].

# **Références bibliographiques**

- [<sup>1</sup>] A. Heydari, S. Khaksar, M. Sheykhan, M. Tajbakhsh, H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub> as a new and reusable catalyst for Mukaiyama and Mannich reactions in heterogeneous media, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 287 (2008) 5–8. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2008.02.024>.
- [<sup>2</sup>] I. V. KOZHEVNIKOV, Heteropoly Acids and Related Compounds as Catalysts for Fine Chemical Synthesis, *Catal. Rev.*, 37, 2 (1995) 311-352. <https://doi.org/10.1080/01614949508007097>.
- [<sup>3</sup>] W. R. Sullivan, C. F. Huebner, M. A. Stahmann and K. P. Link, Studies on 4-Hydroxycoumarins. II. The Condensation of Aldehydes with 4-Hydroxycoumarins, *J. Am. Chem. Soc.*, 65 (1943) 2288-2291. <https://doi.org/10.1021/ja01252a008>.
- [<sup>4</sup>] M. Makhloufi-Chebli, M. Hamdi, A. M. Silva, S. F. Balegrone, Translactonisation intramoléculaire assistée par micro-ondes. Synthèse des coumarines, *J. Soc. Alger. Chim.*, 18 (2008) 91-101.
- [<sup>5</sup>] X. S. Wang, J. Zhou, K. Yang, M. M Zhang, Divergent Products Obtained from the Reactions of Salicylaldehyde and 4-Hydroxycoumarin in TEBAC-H<sub>2</sub>O, KF-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-EtOH, and Ionic Liquid, *Synt. Comm.*, 40 (2010) 3332-3345. <https://doi.org/10.1080/00397910903419837>.
- [<sup>6</sup>] J. Riboulleau, C. Deschamps-Vallet, D. Molho, C. Mentzer, Benzopyrylium salts. I. Preparation and reductive heterocyclization of several 3-(o-hydroxybenzylidene)-2,4-dioxochromanes, *Bull. Soc. Chim., France.*, 8-9 (1970) 3138-3144.
- [<sup>7</sup>] P. de March, M. Moreno-Manas, J. L. Roca, The reactions of 4-hydroxy-2-pyrones with 2-hydroxybenzaldehydes. A note of warning, *J. of Het. Chem.*, 21 (5) (1984) 1371-1372. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570210525>.
- [<sup>8</sup>] A. Benazzouz, M. Makhloufi-Chebli, N. Khatir-Hamdi, B. Boutemur-Khedis, A.M.S. Silva, M. Hamdi, A facile synthesis of new coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones dyads, *Tetrahedron*, 71 (2015) 3890-3894. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.04.028>.
- [<sup>9</sup>] L. Saher, M. Makhloufi-Chebli, L. Dermeche, S. Dermeche, B. Boutemur-Khedis, C. Rabia, M. Hamdi, A. M.S. Silva, 10-(4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2H-pyran-3-yl)-3-methyl-1H,10H pyrano[4,3-b]chromen-1-ones from a pseudo-multicomponent reaction and evaluation of their antioxidant activity, *Tetrahedron*, 74 (2018) 872-879. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.01.009>.
- [<sup>10</sup>] F. Neese, The ORCA program system, *Wiley interdiscip. WIREs. Comput. Mol. Sci.*, 2 (2012) 73–78. <https://doi.org/10.1002/wcms.81>.
- [<sup>11</sup>] F. Neese, Calculation of the zero-field splitting tensor on the basis of hybrid density functional and Hartree-Fock theory, *J. Chem. Phys.*, 127 16 (2007) 164112-164119. <https://doi.org/10.1063/1.2772857>.
- [<sup>12</sup>] K. Sridhar, A. L. Charles, *In vitro* antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•</sup> assays: Estimation methods for EC<sub>50</sub> using advanced statistical programs, *F. Chem.*, 275 (2018) 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.040>.

- [13] L. L. Mensor, F. S. Menezes, G. G. Leitão, A. S. Reis, C. T. dos Santos, S. C. Coube, S. G. Leitão, Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, *Phytother. Res.*, 15 (2001) 127-130. <https://doi.org/10.1002/ptr.687>.
- [14] J. S. Lee, H. J. Kim, H. Park, Y. S. Lee, New Diarylheptanoids from the Stems of *Carpinus cordata*, *J. Nat. Prod.*, 65 (2002) 1367-1370. <https://doi.org/10.1021/np020048l>.
- [15] S. Bouaziz-Terrachet, A. Toumi-Maouche, B. Maouche, S. Taïri-Kellou, Modeling the binding modes of stilbene analogs to cyclooxygenase-2: a molecular docking study, *J. Mol. Model.*, 16 (12) (2010) 1919–1929. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0679-7>.
- [16] S. Hammad, S. Bouaziz-Terrachet, R. Mghnem, D. Meziane, Pharmacophore development, drug-likeness analysis, molecular docking, and molecular dynamics simulations for identification of new CK2 inhibitors, *J. Mol. Model.*, 26 160 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00894-020-04408-2>.
- [17] D. Roccatano, I. Daidone, M.A. Ceruso, C. Bossa, A.D. Nolan, Selective excitation of native fluctuation during thermal unfolding simulations: horse heart cytochrom c as a case study, *Biophys. J.*, 84 (2003) 1876 – 1883. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74995-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74995-9).
- [18] H. Kai-Cheng, C. Yen-Fu, L. Shen-Rong, Y. Jinn-Moon, iGEMDOCK: a graphical environment of enhancing GEMDOCK using pharmacological interactions and post-screening analysis, *BMC Bioinf.*, 12 (2011) 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S1-S33>.
- [19] Marvin Sketch program, Chemaxon, <http://www.chemaxon.com>, (2009).
- [20] <http://www.rcsb.org/>.
- [21] J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten, Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.*, 26 (16) (2005) 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
- [22] U. Essman, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.*, 103 (1995) 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- [23] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.*, 79 (1983) 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- [24] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, 14 (1) (1996) 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [25] <http://www.accelrys.com>.

# Partie 3

# Chapitre 1

*Synthèse de cétones  $\alpha,\beta$ -insaturées dérivées de la 4-acétylpyridine,  
de nouvelles chalcone-oximes et d'une isoxazoline dérivée de  
l'indole.*

## I. Introduction

Les chalcones représentent une pléthore de composés naturels et synthétiques. Les fonctionnalités de ce système carbonyle  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturé ont montré un large spectre d'activités biologiques [1- 8]. Étant électrophiles, plusieurs molécules hétérocycliques importantes sur le plan thérapeutique peuvent être synthétisées [4,9], notamment les isoxazolines [10].

Les chalcone-oximes sont des dérivés des chalcones, ils ont été signalés comme présentant diverses activités biologiques puissantes et une faible toxicité [11-15]. Ces molécules à fort potentiel peuvent être obtenues par des méthodes simples et économiques.

Nous décrivons dans ce chapitre la synthèse de nouvelles chalcone-oximes dérivées de la 4-acétylpyridine afin d'étudier l'impact de la présence d'un hétérocycle azoté dans ces molécules sur leurs activités biologiques.

## II. Synthèse des chalcones : (*E*)-3-aryl-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (3a-i), (2*E*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-on (3j)

Les chalcones (3a-i) ont été synthétisées à partir de la 4-acétylpyridine en présence de différents aldéhydes aromatiques. Afin d'optimiser les conditions de réaction les plus envisageables et les plus rentables, plusieurs essais ont été réalisés en faisant varier les conditions de réaction comme c'est rapporté dans la littérature sur les dérivés de la 3-acétylpyridine [16]. La synthèse de la chalcone a été initiée en faisant réagir le 4-*N,N*-diméthylbenzaldéhyde avec la 4-acétylpyridine dans un milieu alcoolique à température ambiante ou au reflux [17] pendant un certain temps, en présence d'hydroxyde de sodium ou d'hydroxyde de potassium comme base selon la condensation de *Claisen-Schmidt* représentée en schéma 3.1. Après plusieurs essais, nous avons conclu que la 4-acétylpyridine réagit différemment de l'acétophénone et de la 3-acétylpyridine. La chalcone s'est formée lorsque la 4-acétylpyridine a été ajoutée goutte à goutte au mélange alcoolique (éthanol ou méthanol) contenant l'aldéhyde et du NaOH aqueux à 10%, confirmant ainsi ces travaux [18].

Plusieurs aldéhydes aromatiques ont été utilisés afin d'étudier l'influence de leurs différents substituants (donneurs ou attracteurs) sur le rendement de la réaction ainsi que sur les différentes activités biologiques étudiées. D'autres aldéhydes aromatiques présentant des hétéroatomes ont été employés afin d'étudier l'influence de leurs natures et leurs positions (thiophène-2-carbaldéhyde et thiophène-3-carbaldéhyde). Nous avons également utilisé le

cinnamaldéhyde pour étudier l'effet de la présence d'une autre double liaison prolongeant ainsi le système conjugué.

La chalcone **3j** a été synthétisée différemment selon la condensation de Knoevenagel suite à la présence d'un autre type d'aldéhyde aromatique (1*H*-indole-3-carbaldéhyde) présentant de bonnes propriétés biologiques, la synthèse du composé **3j** a nécessité un chauffage au reflux pendant plusieurs heures en présence d'une base organique (pipéridine) [19].

Les chalcones préparées sont purifiées par recristallisation dans l'éthanol ou dans le mélange éthanol-dichlorométhane (v/v) pour donner des poudres cristallines avec des rendements variant entre 62 à 90%.

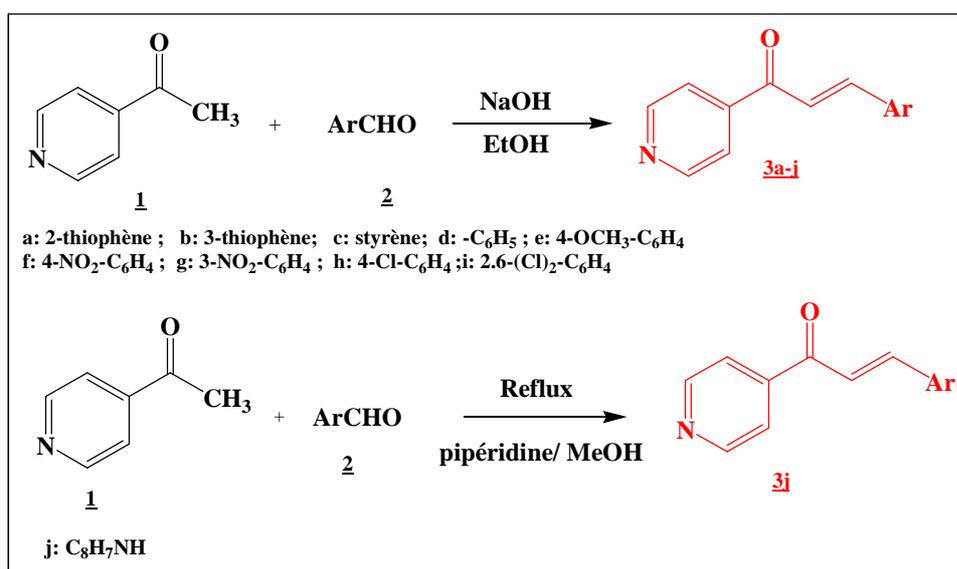


Schéma 3.1 : Synthèse des chalcones (3a-j).

### II.1. Synthèse du (*E*)-1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophèn-2-yl)prop-2-èn-1-one (3a)

La chalcone **3a** a été préparée par une condensation aldolique de la 4-acétylpyridine vis-à-vis du thiophène-2-carbaldéhyde en quantité équimolaire à froid (0°C) pendant 60 minutes ensuite à température ambiante pendant 60 autres minutes, en présence d'hydroxyde de sodium aqueux à 10% et d'éthanol comme solvant. Le composé 1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophèn-2-yl)prop-2-èn-1-one **3a** formé est recristallisé dans l'éthanol pour donner une poudre cristalline verte schéma 3.2. La structure de ce composé a été confirmée par une étude spectroscopique détaillée.

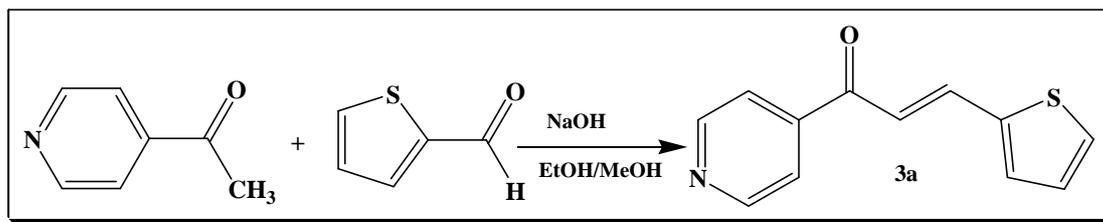


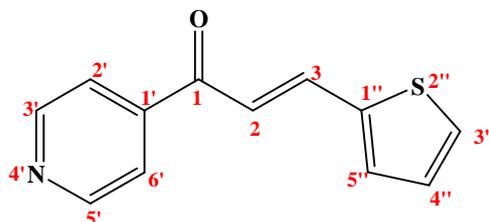
Schéma 3.2 : Synthèse de la chalcone 3a.

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

Le spectre de masse obtenu par la LC-MS en mode ESI (+), montre un ion moléculaire à  $m/z = 216,1$  (100%) correspondant à  $[M+H]^+$ , confirmant ainsi la formule brute  $C_{12}H_9NOS$  du composé 3a.

### II.1.2. Etude par spectroscopie RMN du proton $^1H$

Les spectres RMN du  $^1H$  sont réalisés dans un appareil spectromètre Bruker Avance 300, proton à 300,13 MHz, en présence du DMSO- $d_6$  ou du  $CDCl_3$  comme solvant et le TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm par rapport au signal du TMS.

Tableau 3.1 : Résultats de l'analyse RMN  $^1H$  du composé 3a.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Multiplicité | Attribution |
|-----------------------------|--------------|-------------|
| 7,23                        | dd           | H-4''       |
| 7,51                        | d            | H-2         |
| 7,76                        | m            | H-3''       |
| 7,86                        | m            | H-5''       |
| 7,94                        | m            | H-2', H-6'  |
| 7,98                        | m            | H-3         |
| 8,84                        | m            | H-3', H-5'  |

Le spectre RMN du proton de la chalcone **3a** se caractérise par les déplacements chimiques significatifs des protons du noyau pyridinique, les protons des carbones  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturés et ceux du cycle thiophénique.

En effet, la présence du cycle pyridinique donne en RMN du proton deux signaux correspondant à deux multiplets, le premier apparaît à  $\delta = 7,94$  ppm correspondant aux deux protons aromatiques H-2', H-6' le second qui représente les protons aromatiques H-3', H-5' est observé à 8,84 ppm.

Les protons des deux carbones  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturés surgissent sous formes de deux signaux différents, le premier qui se présente sous forme de doublet à  $\delta = 7,51$  ppm ( $J = 15,4$  Hz) correspond au proton H-2, le second octroyé au proton H-3 se dessine à 7,98 ppm sous forme de multiplet.

Les protons aromatiques du thiophène émettent trois signaux, le premier se manifeste sous forme de doublet de doublet ( $J = 3,7$  Hz,  $J = 5,0$  Hz) à  $\delta = 7,23$  ppm et correspond au proton H-4'', le proton H-3'' s'affiche sous forme de multiplet à  $\delta = 7,76$  ppm, le proton H-5'' apparaît également sous forme de multiplet à 7,86 ppm. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le **tableau 3.1**.

### II.1.3. Etude par spectroscopie RMN $^{13}\text{C}$

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  sont réalisés dans un appareil spectromètre Bruker Avance 300, carbone à 75,47 MHz en utilisant le DMSO- $d_6$  ou le  $\text{CDCl}_3$  comme solvant et le TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm par rapport au signal de TMS.

**Tableau 3.2:** Résultats de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **3a**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Attribution |
|-----------------------------|-------------|
| 119,84                      | C-5''       |
| 121,50                      | C-2', C-6'  |
| 128,88                      | C-2         |
| 131,44                      | C-4''       |
| 133,76                      | C-3''       |
| 138,38                      | C-3         |
| 139,41                      | C-1''       |
| 143,58                      | C-1'        |
| 150,74                      | C-3', C-5'  |

|        |     |
|--------|-----|
| 188,72 | C-1 |
|--------|-----|

Dans ce spectre, nous remarquons que tous les pics qui apparaissent sont compatibles avec les carbones du composé **3a**. L'ensemble des pics observés appartient au domaine des carbones  $sp^2$ . Les résultats obtenus sont exposés dans le **tableau 3.2**.

#### II.1.4. Etude par spectroscopie UV-Visible

Le spectre d'absorption UV-Visible de la chalcone **3a** est réalisé à une concentration de  $3 \times 10^{-5}$  M dans le chloroforme. Nous observons dans ce spectre deux bandes distinctes  $\lambda_{abs1} = 355$  nm attribuée à la transition  $n-\pi^*$  (C=O) et  $\lambda_{abs2} = 242$  nm (transition  $\pi-\pi^*$ ) qui ne peut être attribuée qu'au groupement imine (C=N) du cycle pyridinique [20].

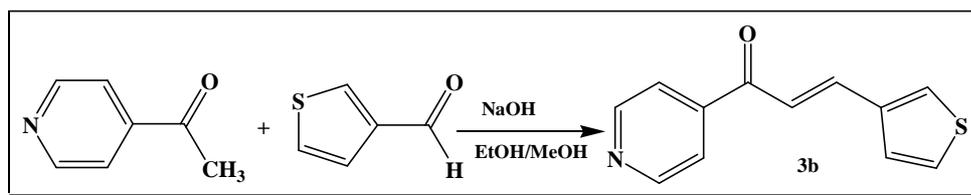
#### II.1.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge

Les principales bandes obtenues dans du KBr en pastilles se répartissent comme suit :  $\bar{\nu}$  ( $cm^{-1}$ ) : 3075, 1662, 1579, 1413, 965, 709.

- Le groupement carbonyle est le groupe commun de toutes les chalcones synthétisées, il est identifié dans cette chalcone par une bande d'intensité moyenne ( $1662\text{ cm}^{-1}$ ) correspondant aux vibrations d'élongation du groupement C=O, ce qui indique la présence d'un système fortement conjugué.
- La bande distincte  $1579\text{ cm}^{-1}$  suggère la présence de la liaison (C=C aromatique) des deux hétérocycles (thiophène, pyridine).
- La bande  $965\text{ cm}^{-1}$  d'intensité moyenne provient de la vibration CH=CH (trans) de la liaison oléfinique.
- La bande  $3075\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations d'élongations =C-H.
- Quant aux bandes 1413,  $709\text{ cm}^{-1}$  elles sont dues aux vibrations d'élongation des deux liaisons C=N, C-S respectivement.

#### II.2. Synthèse du (*E*)-1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophen-3-yl)prop-2-en-1-one (**3b**)

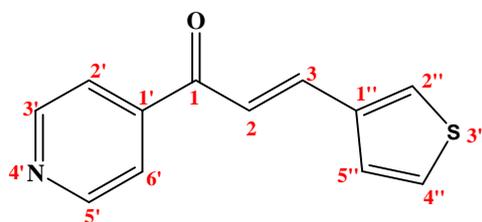
Nous avons travaillé dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites précédemment, en présence du thiophène-3-carbaldéhyde la chalcone 1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophen-3-yl)prop-2-en-1-one **3b** s'est formée **schéma 3.3**.

Schéma 3.3 : Synthèse de la chalcone **3b**.

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

Le spectre de masse obtenu par la LC-MS en mode ESI (+), montre un ion moléculaire à  $m/z = 216,1$  (100%) correspondant à  $[M+H]^+$ , confirmant ainsi la formule brute  $C_{12}H_9NOS$  du composé **3b**.

### II.2.2. Etude par spectroscopie RMN du proton $^1H$

Tableau 3.3 : Résultats de l'analyse RMN  $^1H$  du composé **3b**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Multiplicité | Attribution |
|-----------------------------|--------------|-------------|
| 7,70                        | m            | H-5''       |
| 7,71                        | d            | H-2         |
| 7,79                        | m            | H-4''       |
| 7,83                        | d            | H-3         |
| 7,97                        | m            | H-2', H-6'  |
| 8,19                        | m            | H-2''       |
| 8,85                        | m            | H-3', H-5'  |

Le spectre RMN  $^1H$  de la chalcone **3b** émis cinq signaux; le premier signal correspond à un multiplet et apparaît à  $\delta = 7,70$  ppm, ce dernier est attribué au proton aromatique H-5'' du cycle thiophénique. Le second signal qui surgit à  $\delta = 7,71$  ppm s'agit d'un doublet ( $J = 15,4$  Hz) allouer au proton H-2. Le 3<sup>ème</sup> signal s'affiche à  $\delta = 7,79$  ppm, il est représenté par un multiplet, ce dernier est affecté au proton aromatique H-4''. Le 4<sup>ème</sup> signal est observé à  $\delta =$

7,83 ppm, il est représenté par un doublet ( $J= 15,4$  Hz) qui ne peut être attribué qu'au proton H-3 de la double liaison. Le signal suivant se dessine à  $\delta= 7,97$  ppm, ce dernier est représenté par un multiplet, il correspond aux protons aromatiques (H-2', H-6'). Le dernier proton aromatique du cycle thiophène (H-2'') est observé sous forme de multiplet à  $\delta= 8,19$  ppm. Nous apercevons le dernier signal à  $\delta= 8,85$  ppm, ce dernier s'exhibe sous forme d'un multiplet qui ne peut être conféré qu'aux derniers protons aromatiques H-3', H-5' du noyau pyridinique. L'ensemble des résultats de l'analyse RMN  $^1\text{H}$  de ce composé sont rapportés dans le **tableau 3.3** ci-dessus.

### II.2.3. Etude par spectroscopie RMN $^{13}\text{C}$

**Tableau 3.4:** Résultats de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **3b**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Attribution |
|-----------------------------|-------------|
| 120,92                      | C-2''       |
| 121,44                      | C-2', C-6'  |
| 125,16                      | C-4''       |
| 127,38                      | C-5''       |
| 130,36                      | C-2         |
| 137,70                      | C-1''       |
| 140,00                      | C-1'        |
| 144,39                      | C-3         |
| 150,75                      | C-3', C-5'  |
| 189,99                      | C-1         |

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  révèle tous les pics correspondants aux carbones de la chalcone **3b**. Nous rapportons dans le **tableau 3.4** l'ensemble des résultats de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  de ce composé.

### II.2.4. Etude par spectroscopie UV-Visible

Le spectre d'absorption UV-Visible de la chalcone **3b** est préparé à une concentration de  $3 \times 10^{-5}$  M dans le chloroforme. Nous distinguons dans ce spectre deux bandes différentes  $\lambda_{\text{abs}1} = 329$  nm qui correspond à la transition  $n-\pi^*$  du groupement carbonyle (C=O) et  $\lambda_{\text{abs}2} = 240$  nm (transition  $\pi-\pi^*$ ) du groupement imine (C=N) du cycle pyridinique [20].

### II.2.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge

Les principales bandes obtenues dans le KBr en pastilles sont représentées comme suit:  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3095, 1662, 1585, 1543, 987, 781. Le spectre IR de cette chalcone ressemble au spectre IR du composé **3a**, les bandes d'absorption suivantes sont attribuées aux mêmes groupements décrits dans le composé **3a**.

### II.3. Synthèse du (2E,4E)-1-phényl-5-(pyridin-4-yl)penta-2,4-dien-1-one (3c)

La condensation de la 4-acétylpyridine sur l'aldéhyde cinnamique selon les conditions de *Claisen Schmidt* donne la chalcone **3c** schéma3.4.

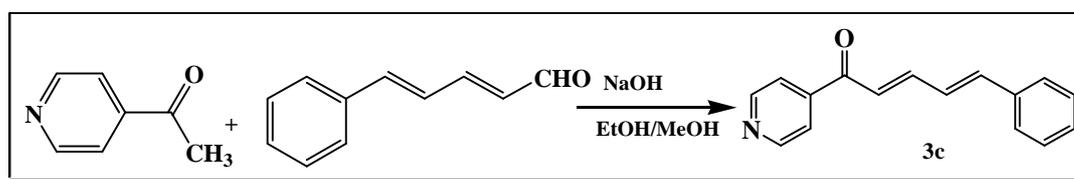


Schéma 3.4 : Synthèse de la chalcone **3c**.

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

Le spectre de masse obtenu par la LC-MS en mode ESI (+), présente un ion moléculaire à  $m/z = 236,2$  (100%) affecter à  $[M+H]^+$ , confirmant ainsi la formule brute C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO du composé **3c**.

#### II.3.2. Etude par spectroscopie RMN du proton <sup>1</sup>H

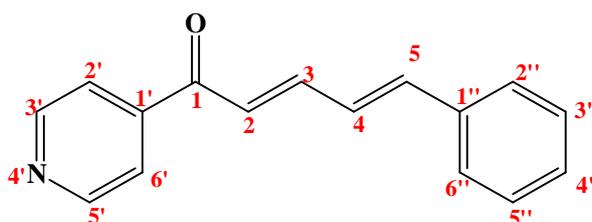


Tableau 3.5: Résultats de l'analyse RMN <sup>1</sup>H du composé **3c**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Multiplicité | Attribution       |
|-----------------------------|--------------|-------------------|
| 7,26-7,35                   | m            | H-2, H-3'', H-5'' |
| 7,37-7,48                   | m            | H-4, H-5, H-4''   |
| 7,54-7,66                   | m            | H-3, H-2'', H-6'' |
| 7,85                        | m            | H-2', H-6'        |

|      |   |            |
|------|---|------------|
| 8,84 | m | H-3', H-5' |
|------|---|------------|

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de la chalcone **3c** révèle un multiplet à  $\delta= 7,26-7,35$  ppm qui correspond à trois protons (H-2, H-3'', H-5''). Le second signal est représenté par un multiplet il apparait à  $\delta=7,37-7,48$  ppm, ce dernier correspond au protons (H-4, H-5, H-4''). Le 3<sup>ème</sup> signal qui se manifeste à  $\delta= 7,54-7,66$  ppm est représenté également par un multiplet qui est alloué aux protons (H-3, H-2'', H-6''). Les deux derniers signaux qui se révèlent à  $\delta= 7,85$  ppm,  $\delta= 8,84$  ppm sous forme de multiplets correspondent aux protons (H-2', H-6'), (H-3', H-5') respectivement. L'ensemble des résultats de la RMN  $^1\text{H}$  de ce composé sont regroupés dans le **tableau 3.5** ci-dessus.

### II.3.3. Etude par spectroscopie RMN $^{13}\text{C}$

**Tableau 3.6:** Résultats de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **3c**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Attribution  |
|-----------------------------|--------------|
| 121,35                      | C-2', C-6'   |
| 124,98                      | C-4          |
| 127,03                      | C-4''        |
| 127,44                      | C-2'', C-6'' |
| 128,98                      | C-3'', C-5'' |
| 129,51                      | C-2          |
| 135,84                      | C-5          |
| 143,04                      | C-1''        |
| 143,77                      | C-1'         |
| 146,20                      | C-3          |
| 150,77                      | C-3', C-5'   |
| 189,29                      | C-1          |

Le spectre RMN du carbone enregistré, montre que le nombre de signaux qui s'affichent est compatible avec le nombre de carbone de la chalcone **3c**. Tous les carbones observés sont dans le domaine des carbones hybridés  $\text{sp}^2$ . Les résultats de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  de ce composé sont résumés dans le **tableau 3.6** ci-dessus.

### II.3.4. Etude par spectroscopie UV-Visible

Le spectre d'absorption UV-Visible de la chalcone **3c** est réalisé dans le chloroforme à une concentration de  $3 \times 10^{-5}$  M. Nous contemplons dans ce spectre deux bandes distinctes  $\lambda_{\text{abs1}} = 354$  nm (transition  $n-\pi^*$  C=O) et  $\lambda_{\text{abs2}} = 242$  nm (transition  $\pi-\pi^*$ ) qui correspond au groupement imine (C=N) du cycle pyridinique [20].

### II.3.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge

Les principales bandes obtenues dans le KBr en pastilles sont représentées comme suit:  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3046, 1651, 1576, 1417, 1007, 699. Les cinq premières bandes observées dans ce spectre correspondent aux mêmes groupements observés dans les chalcones **3a**, **3b**, cependant la sixième bande correspond aux vibrations de déformation de la liaison =C-H des cinq atomes adjacents du cycle benzénique.

### II.4. Synthèse du (*E*)-3-phényl-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (**3d**)

L'action de la 4-acétylpyridine sur le benzaldéhyde en présence de l'hydroxyde de sodium aqueux à 10 % et de l'éthanol comme solvant sous agitation magnétique à froid ( $0^\circ\text{C}$ ) pendant une heure et à température ambiante pendant 60 autres minutes conduit à la formation du 3-phényl-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one **3d** schéma 3.5. La structure de cette chalcone a été confirmée par différentes techniques d'analyse suivantes.

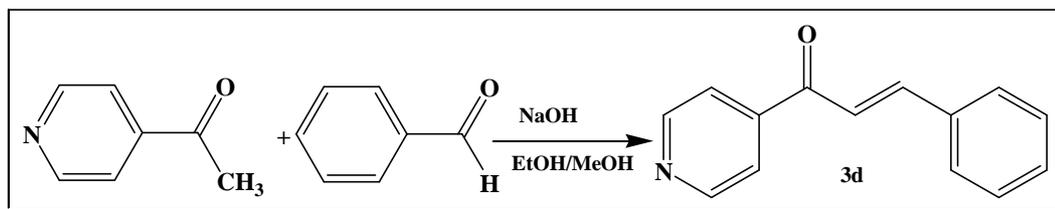
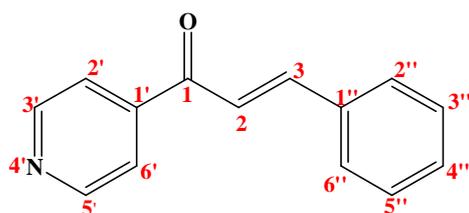


Schéma 3.5 : Synthèse de la chalcone **3d**.

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

Le spectre de masse obtenu par la LC-MS en mode ESI (+), révèle un ion moléculaire à  $m/z = 210,1$  (100%) correspondant à  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , confirmant ainsi la formule brute  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}$  du composé **3d**.

II.4.2. Etude par spectroscopie RMN du proton  $^1\text{H}$ Tableau 3.7 : Résultats de l'analyse RMN  $^1\text{H}$  du composé **3d**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Multiplicité | Attribution         |
|-----------------------------|--------------|---------------------|
| 7,42                        | d            | H-2                 |
| 7,41-7,48                   | m            | H-3'', H-4'', H-5'' |
| 7,62-7,68                   | m            | H-2'', H-6''        |
| 7,79                        | m            | H-2', H-6'          |
| 7,83                        | d            | H-3                 |
| 8,84                        | d            | H-3', H-5'          |

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de la chalcone **3d** est réalisé dans un appareil spectromètre Bruker Avance 500, proton à 500,28 MHz, en employant le  $\text{CDCl}_3$  comme solvant et le TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm par rapport au signal de TMS.

Dans cette chalcone les protons aromatiques du cycle pyridinique (H-2', H-6'), (H-3', H-5') sont observés également sous forme de deux multiplets à  $\delta = 7,79$  ppm et  $\delta = 8,84$  ppm respectivement. Deux autres multiplets sont observés correspondant aux protons aromatiques du cycle benzénique ; le premier survient à  $\delta = 7,41-7,48$  ppm et il est réservé aux protons (H-3'', H-4'', H-5'') le second à  $\delta = 7,62-7,68$  ppm ne peut être attribué qu'aux protons H-2'', H-6''. Les protons de la double liaison se dessinent sous forme de doublets; le premier doublet correspondant au proton H-2 ( $J = 15,8$  Hz) surgit à  $\delta = 7,42$  ppm. Le proton H-3 est observé à  $\delta = 7,83$  ppm ( $J = 15,8$  Hz). L'ensemble des signaux émis confirment la structure du composé **3d** et sont exposés dans le **tableau 3.7**.

### II.4.3. Etude par spectroscopie RMN $^{13}\text{C}$

**Tableau 3.8:** Résultats de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **3d**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Attribution  |
|-----------------------------|--------------|
| 121,27                      | C-2          |
| 121,80                      | C-2', C-6'   |
| 128,86                      | C-2'', C-6'' |
| 129,25                      | C-3'', C-5'' |
| 131,20                      | C-4''        |
| 143,90                      | C-1''        |
| 144,84                      | C-1'         |
| 147,17                      | C-3          |
| 150,60                      | C-3', C-5'   |
| 189,87                      | C-1          |

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la chalcone **3d** est réalisé dans un appareil spectromètre Bruker Avance 500, carbone à 125,8 MHz, en se servant du  $\text{CDCl}_3$  comme solvant et le TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm par rapport au signal de TMS.

Dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  réalisé, nous remarquons que tous les pics qui surviennent sont compatibles avec le type des carbones du composé **3d**. L'ensemble des résultats de ce composé sont résumés dans le **tableau 3.8** ci-dessus.

### II.4.4. Etude par spectroscopie UV-Visible

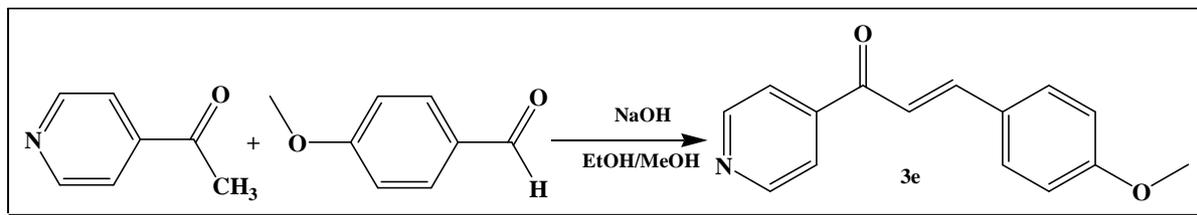
Le spectre d'absorption UV-Visible de la chalcone **3d** est également réalisé dans le chloroforme à une concentration de  $3 \times 10^{-5}$  M. Nous observons aussi dans ce spectre deux bandes distinctes  $\lambda_{\text{abs}1} = 316$  nm (transition  $n-\pi^*$  (C=O)) et  $\lambda_{\text{abs}2} = 242$  nm attribuée à transition  $\pi-\pi^*$  du groupement imine (C=N) du cycle pyridinique [20].

### II.4.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge

Dans le spectre IR de cette chalcone, on contemple les mêmes bandes significatives présentes dans la chalcone **3c**. Les principales bandes sont représentées comme suit :  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3055, 1663, 1595, 1446, 984, 686.

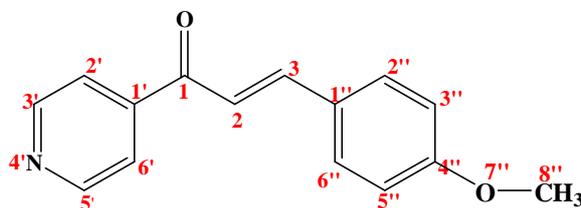
II.5. Synthèse du (*E*)-3-(4-méthoxyphényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (3e)

L'action de la 4-acétylpyridine sur le 4-méthoxybenzaldéhyde dans les mêmes conditions décrites précédemment conduit à la formation du 3-(4-méthoxyphényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one **3e** schéma 3.6.

Schéma 3.6 : Synthèse de la chalcone **3e**.

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

Le spectre de masse obtenu par la LC-MS en mode ESI (+), affiche un ion moléculaire à  $m/z = 240,2$  (100%) correspondant à  $[M+H]^+$ , confirmant ainsi la formule brute  $C_{15}H_{13}NO_2$  du composé **3e**.

II.5.2. Etude par spectroscopie RMN du proton  $^1H$ Tableau 3.9 : Résultats de l'analyse RMN  $^1H$  du composé **3e**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Multiplicité | Attribution           |
|-----------------------------|--------------|-----------------------|
| 3,84                        | s            | H (OCH <sub>3</sub> ) |
| 7,04                        | m            | H-3'', H-5''          |
| 7,77                        | m            | H-2'', H-6''          |
| 7,89                        | m            | H-2, H-3              |
| 7,99                        | m            | H-2', H-6'            |
| 8,84                        | m            | H-3', H-5'            |

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé montre un premier signal sous forme d'un singulet à  $\delta = 3,84$  ppm correspondant aux trois protons du groupement méthoxy ( $\text{OCH}_3$ ). A  $\delta = 7,04$  ppm nous avons observé un multiplet qui est affecté aux deux protons aromatiques ( $\text{H-3''}$ ,  $\text{H-5''}$ ). Les deux autres protons  $\text{H-2''}$ ,  $\text{H-6''}$  du cycle benzénique substitué en para sont aperçus sous forme d'un autre multiplet à  $\delta = 7,89$  ppm.

Les deux protons  $\text{H-2}$  et  $\text{H-3}$  ont émis un seul et même signal qui est sous forme de multiplet et surgit à  $\delta = 7,77$  ppm. A  $\delta = 7,99$  ppm et  $\delta = 8,84$  ppm on observe respectivement les multiplets des protons ( $\text{H-2'}$ ,  $\text{H-6'}$ ), ( $\text{H-3'}$ ,  $\text{H-5'}$ ) du cycle pyridinique. L'ensemble des résultats obtenus confirment la structure de cette chalcone, ces derniers sont regroupés dans le **tableau 3.9** ci-dessus.

### II.5.3. Etude par spectroscopie RMN $^{13}\text{C}$

**Tableau 3.10:** Résultats de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **3e**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Attribution  |
|-----------------------------|--------------|
| 55,44                       | C-8''        |
| 114,50                      | C-3'', C-5'' |
| 119,03                      | C-2          |
| 121,56                      | C-2', C-6'   |
| 127,00                      | C-1''        |
| 131,20                      | C-2'', C-6'' |
| 143,90                      | C-1'         |
| 145,77                      | C-3          |
| 150,72                      | C-3', C-5'   |
| 161,79                      | C-4''        |
| 188,92                      | C-1          |

Dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de cette chalcone, tous les pics aperçus correspondent aux carbones du composé **3e**. L'ensemble des résultats de ce composé sont exposés dans le **tableau 3.10** ci-dessus.

### II.5.4. Etude par spectroscopie UV-Visible

Le spectre d'absorption UV-Visible de la chalcone **3e** est préparé à une concentration de  $3 \times 10^{-5}$  M dans le chloroforme. Ce spectre présente deux bandes distinctes  $\lambda_{\text{abs}1} = 352$  nm (transition  $n-\pi^*$  (C=O)) et  $\lambda_{\text{abs}2} = 242$  nm (transition  $\pi-\pi^*$ ) du groupement imine (C=N) du cycle pyridinique [20].

### II.5.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge

Dans le spectre IR de cette chalcone, on distingue les bandes qui représentent les groupements caractéristiques de la chalcone **3e**. Les principales bandes sont représentées comme suit:  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3060, 1658, 1588, 1508, 987, 813.

- La bande  $1658 \text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations d'élongation du carbonyle C=O.
- La bande distincte  $1588 \text{ cm}^{-1}$  suggère la présence de la liaison (C=C aromatique) des deux hétérocycles (benzène, pyridine).
- La bande  $987 \text{ cm}^{-1}$  d'intensité moyenne provient de la vibration CH=CH (trans) de la liaison oléfinique.
- La bande  $3060 \text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations d'élongations =C-H.
- La bande  $1508 \text{ cm}^{-1}$  est due aux vibrations d'élongation de la liaison C=N du cycle pyridinique.
- La bande  $813 \text{ cm}^{-1}$  est attribuée aux vibrations d'élongation de la liaison C-H du cycle benzénique substitué en position para.

### II.6. Synthèse du (*E*)-3-(4-nitrophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (**3f**)

Dans les mêmes conditions opératoires, la 4-acétylpyridine agit sur le 4-nitrobenzaldéhyde pour donner le 3-(4-nitrophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one **3f** sous forme d'une poudre grise après recristallisation avec un bon rendement (83%) **schéma 3.7**.

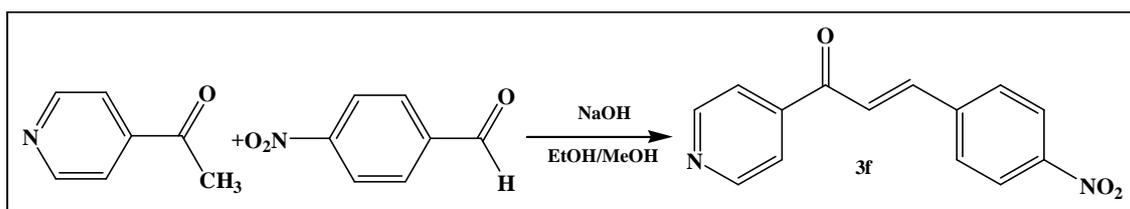


Schéma 3.7 : Synthèse de la chalcone **3f**.

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

Le spectre de masse obtenu par la LC-MS en mode ESI (+), révèle un ion moléculaire à  $m/z = 554,7$  (100%) correspondant à  $[M+2Na]^+$ , confirmant ainsi la formule brute  $C_{14}H_{10}N_2O_3$  du composé **3f**.

### II.6.2. Etude par spectroscopie RMN du proton $^1H$

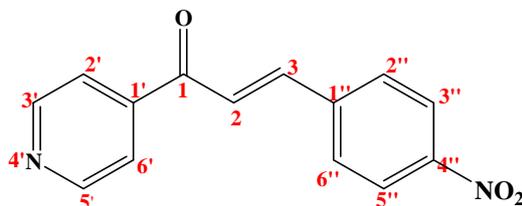


Tableau 3.11 : Résultats de l'analyse RMN  $^1H$  du composé **3f**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Multiplicité | Attribution  |
|-----------------------------|--------------|--------------|
| 5,82                        | m            | H-2          |
| 7,71                        | d            | H-2'', H-6'' |
| 8,83-8,86                   | m            | H-2', H-6'   |
| 8,19-8,31                   | m            | H-3'', H-5'' |
| 8,28                        | m            | H-3          |
| 8,79-8,81                   | m            | H-3', H-5'   |

Dans le spectre RMN  $^1H$  de la chalcone **3f**, nous observons un multiplet à  $\delta = 5,82$  ppm correspondant au proton H-2. Les deux protons aromatiques H-2'', H-6'' surgissent à  $\delta = 7,71$  ppm sous forme de doublet ( $J=9,0$  Hz), tandis que les deux protons H-2', H-6' du cycle pyridinique apparaissent à  $\delta = 8,83-8,86$  ppm sous forme de multiplet. Les deux protons aromatiques H-3'', H-5'' qui restent du cycle benzénique substitué en para se manifestent à  $\delta = 8,19-8,31$  ppm sous forme de multiplet. A  $\delta = 8,28$  ppm nous distinguons un autre multiplet qui correspond au proton H-3. Enfin, le dernier signal observé à  $\delta = 8,79-8,81$  ppm dans ce spectre est représenté également par à un multiplet commun à toutes les chalcones synthétisées accordé aux derniers protons de la pyridine (H-3', H-5'). L'ensemble des résultats sont résumés dans le **tableau 3.11** confirmant ainsi la structure de ce composé.

### II.6.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup>C

**Tableau 3.12** : Résultats de l'analyse RMN <sup>13</sup>C du composé **3f**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Attribution  |
|-----------------------------|--------------|
| 121,57                      | C-3'', C-5'' |
| 123,75                      | C-2', C-6'   |
| 124,41                      | C-2          |
| 127,68                      | C-2'', C-6'' |
| 141,23                      | C-1'         |
| 143,17                      | C-1''        |
| 147,03                      | C-3          |
| 151,24                      | C-3', C-5'   |
| 150,85                      | C-4''        |
| 192,04                      | C-1          |

Le spectre RMN <sup>13</sup>C de ce composé montre plusieurs signaux correspondant aux différents carbones hybridés sp<sup>2</sup> de la chalcone **3f**. L'ensemble des résultats sont exposés dans le **tableau 3.12**.

### II.6.4. Etude par spectroscopie UV-Visible

Le spectre d'absorption UV-Visible de la chalcone **3f** est réalisé dans le chloroforme à une concentration de 3×10<sup>-5</sup> M. Contrairement aux autres chalcones, la chalcone **3f** présente une seule bande d'absorption  $\lambda_{\text{abs}1} = 284$  nm correspondant à la transition n- $\pi^*$  (C=O), nous n'avons donc pas observé dans le spectre de ce composé la bande  $\lambda_{\text{abs}2} = 242$  nm (transition  $\pi$ - $\pi^*$ ) du groupement imine (C=N).

### II.6.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge

Dans le spectre IR du composé **3f**, on observe les bandes qui représentent les groupements caractéristiques de cette chalcone. Les principales bandes sont citées comme suit :  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>) : 3030, 1698, 1581, 1508, 1079, 1348, 813.

- La bande 1698 cm<sup>-1</sup> est accordée aux vibrations d'élongation C=O.
- La bande distincte 1581 cm<sup>-1</sup> suggère la présence de la liaison (C=C aromatique) des deux hétérocycles (benzène, pyridine).

- La bande  $1079\text{ cm}^{-1}$  d'intensité moyenne provient de la vibration CH=CH (trans) de la liaison oléfinique.
- La bande  $3030\text{ cm}^{-1}$  est alloué aux vibrations d'élongations =C-H.
- La bande  $1508\text{ cm}^{-1}$  est due aux vibrations d'élongation de la liaison C=N.
- La bande  $1348\text{ cm}^{-1}$  correspond aux vibrations d'élongation de la liaison C-NO<sub>2</sub>.
- La bande  $813\text{ cm}^{-1}$  est attribuée aux vibrations d'élongation de la liaison C-H du cycle benzénique substitué en position para.

### II.7. Synthèse du (*E*)-3-(3-nitrophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (3g)

La chalcone **3g** est obtenue suite à l'action de la 4-acétylpyridine sur le 3-nitrobenzaldéhyde en présence du NaOH aqueux à 10% dans de l'éthanol comme solvant **schéma 3.8**. Après recristallisation le produit **3g** obtenu avec un bon rendement (73 %) se présente sous forme d'une poudre fine blanchâtre.

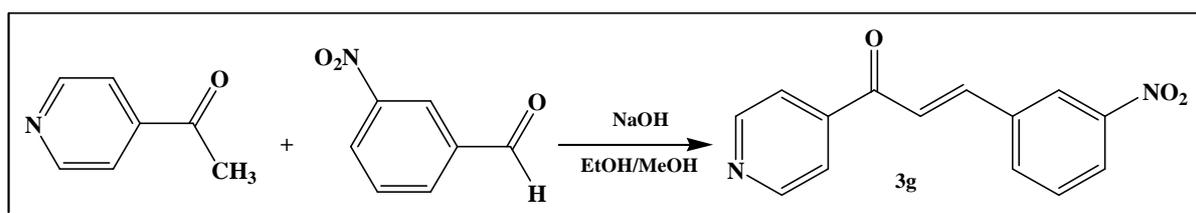
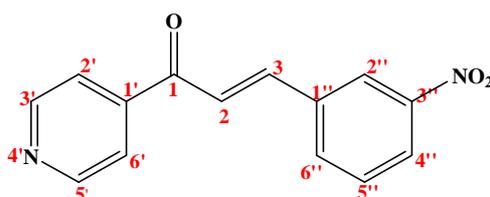


Schéma 3.8 : Synthèse de la chalcone **3g**.

#### II.7.1. Etude par spectrométrie de masse haute résolution ((HRMS) (ESI<sup>+</sup>))

Le spectre de masse obtenu par la HRMS (ESI<sup>+</sup>) met en évidence un ion moléculaire à  $m/z = 255,0770$  correspondant à  $[M+H]^+$ , confirmant ainsi la formule brute C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> du composé **3g**.

#### II.7.2. Etude par spectroscopie RMN du proton <sup>1</sup>H



**Tableau 3.13** : Résultats de l'analyse RMN  $^1\text{H}$  du composé **3g**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Multiplicité | Attribution |
|-----------------------------|--------------|-------------|
| 7,55                        | d            | H-2         |
| 7,63                        | t            | H-5''       |
| 7,85                        | m            | H-2', H-6'  |
| 7,86                        | m            | H-3         |
| 7,93                        | d            | H-6''       |
| 8,28                        | m            | H-4''       |
| 7,51                        | m            | H-2''       |
| 8,86                        | m            | H-3', H-5'  |

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de la chalcone **3g** est réalisé dans un appareil spectromètre Bruker Avance 500, proton à 500,28 MHz, en présence du  $\text{CDCl}_3$  comme solvant en plus de quelques gouttes de  $\text{CH}_3\text{OD}$  et du TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm par rapport au signal de TMS.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé montre un doublet ( $J= 15,8$  Hz) à  $\delta= 7,55$  ppm attribué au proton H-2. A  $\delta= 7,63$  nous observons un triplet ( $J= 8,0$  Hz) correspondant au proton aromatique H-5''. Les deux premiers protons du noyau pyridinique (H-2', H-6') sont aperçus à  $\delta= 7,85$  ppm sous forme de multiplet, un autre multiplet lui succède à  $\delta= 7,86$  ppm, ce dernier est octroyé au proton H-3. A  $\delta= 7,93$  ppm le proton aromatique H-6'' surgit sous forme de doublet ( $J=8,0$  Hz). Les trois derniers signaux sont représentés par des multiplets ils se révèlent à  $\delta= 8,28$ ,  $8,51$ ,  $8,86$  ppm et ils sont attribués aux protons H-4'', H-2'', (H-3', H-5') respectivement. L'ensemble des résultats sont résumés dans le **tableau 3.13** ci-dessus.

### II.7.3. Etude par spectroscopie RMN $^{13}\text{C}$

**Tableau 3.14** : Résultats de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **3g**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Attribution |
|-----------------------------|-------------|
| 121,94                      | C-4''       |
| 122,75                      | C-2', C-6'  |
| 123,57                      | C-2''       |
| 125,42                      | C-2         |
| 130,36                      | C-5''       |

|        |            |
|--------|------------|
| 134,64 | C-6''      |
| 136,06 | C-1''      |
| 143,95 | C-1'       |
| 144,34 | C-3        |
| 148,88 | C-3''      |
| 150,45 | C-3', C-5' |
| 185,03 | C-1        |

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la chalcone **3g** est effectué dans un appareil spectromètre Bruker Avance 500, carbone à 125,8 MHz, en utilisant le  $\text{CDCl}_3$  comme solvant en plus de quelques gouttes de  $\text{CH}_3\text{OD}$  et du TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm par rapport au signal de TMS.

L'ensemble des pics apparaissant dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **3g** sont compatibles avec la structure de ce dernier. Les résultats de cette analyse sont rapportés dans le **tableau 3.14** ci-dessus et confirment la structure de cette chalcone.

#### II.7.4. Etude par spectroscopie UV-Visible

Le spectre d'absorption UV-Visible de la chalcone **3g** est réalisé dans le chloroforme à une concentration de  $3 \times 10^{-5}$  M. Contrairement à la chalcone **3f**, cette chalcone dont le groupement nitro ( $-\text{NO}_2$ ) est situé en position 3 présente deux bandes d'absorption,  $\lambda_{\text{abs}1} = 296$  nm correspondant à la transition  $n-\pi^*$  du carbonyle ( $\text{C}=\text{O}$ ), quant à la seconde bande  $\lambda_{\text{abs}2} = 241$  nm, elle est observée dans la majorité des chalcones, elle est accordée à la transition  $\pi-\pi^*$  du groupement  $\text{C}=\text{N}$  du noyau pyridinique [20].

#### II.7.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge

Les principales bandes obtenues dans le KBr en pastilles sont représentées comme suit:  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3036, 1667, 1605, 1520, 1342, 995, 813 (correspond aux vibrations de déformation de la liaison C-H du cycle benzénique). Le spectre IR de cette chalcone ressemble au spectre IR du composé **3f**, les bandes d'absorption suivantes sont attribuées aux mêmes groupements décrits dans le composé **3f**.

## II.8. Synthèse du (E)-3-(4-chlorophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (3h)

L'action de la 4-acétylpyridine sur le 4-chlorobenzaldéhyde dans les mêmes conditions décrites précédemment conduit à la formation du 3-(4-chlorophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one **3h** schéma 3.9.

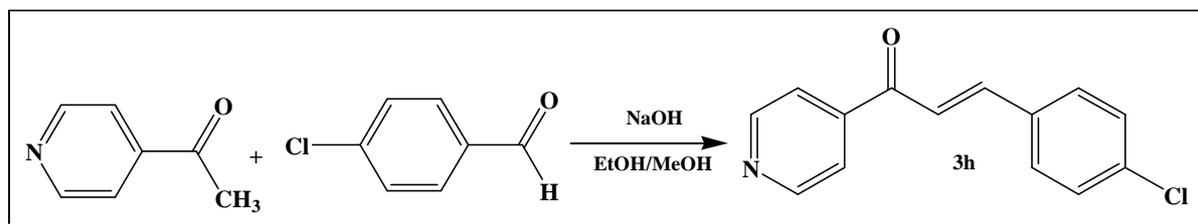


Schéma 3.9 : Synthèse de la chalcone **3h**.

### II.8.1. Etude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))

Le spectre de masse obtenu par la LC-MS en mode ESI (+), révèle des ions moléculaires à  $m/z = 244,1$  (100%),  $246,1$  (33,3%),  $247,1$  (5,1%) correspondant à  $[M+H]^+$ ,  $[M+H, Cl^{35}]^+$ ,  $[M+H, Cl^{37}]^+$  respectivement confirmant ainsi la formule brute  $C_{14}H_{10}ClNO$  du composé **3h**.

### II.8.2. Etude par spectroscopie RMN du proton $^1H$

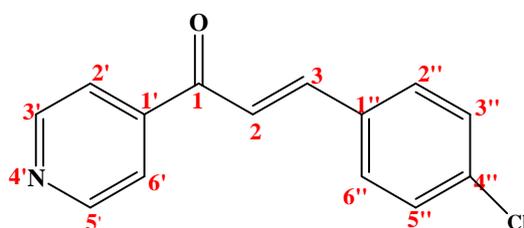


Tableau 3.15 : Résultats de l'analyse RMN  $^1H$  du composé **3h**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Multiplicité | Attribution  |
|-----------------------------|--------------|--------------|
| 7,56                        | d            | H-3'', H-5'' |
| 7,80                        | d            | H-2          |
| 7,94                        | d            | H-3          |
| 7,97                        | d            | H-2'', H-6'' |
| 8,01                        | m            | H-2', H-6'   |
| 8,86                        | m            | H-3', H-5'   |

Le premier signal observé dans le spectre RMN  $^1\text{H}$  de cette chalcone apparaît à  $\delta=7,56$  ppm sous forme de doublet ( $J=8,5$  Hz) et correspond aux deux protons aromatiques (H-3'', H-5''). Le second signal émis à  $\delta= 7,80$  ppm correspond également à un doublet ( $J= 15,7$  Hz), il est attribué au proton H-2. A  $\delta= 7,94$  ppm nous apercevons un 3<sup>ème</sup> doublet ( $J= 15,7$  Hz) correspondant au proton H-3 le 4<sup>ème</sup> doublet survient à  $\delta= 7.97$  ppm ( $J= 8,5$  Hz), ce dernier est accordé aux protons aromatiques H-2'', H-6''. Les protons aromatiques du cycle pyridinique ((H-2', H-6'), (H-3', H-5')) communs à toutes les chalcones s'affichent à  $\delta= 8,01, 8,86$  ppm respectivement sous forme de de multiplets. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le **tableau 3.15**.

### II.8.3. Etude par spectroscopie RMN $^{13}\text{C}$

**Tableau 3.16** : Résultats de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **3h**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Attribution  |
|-----------------------------|--------------|
| 122,08                      | C-2', C-6'   |
| 122,74                      | C-2          |
| 129,49                      | C-2'', C-6'' |
| 131,32                      | C-3'', C-5'' |
| 133,80                      | C-1''        |
| 136,07                      | C-4''        |
| 143,89                      | C-1'         |
| 144,63                      | C-3          |
| 151,26                      | C-3', C-5'   |
| 185,58                      | C-1          |

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de ce composé montre plusieurs signaux correspondant aux différents carbones de la chalcone **3h**. L'ensemble des résultats sont exposés dans le **tableau 3.16**.

### II.8.4. Etude par spectroscopie UV-Visible

Le spectre d'absorption UV-Visible de la chalcone **3h** est effectué dans le chloroforme à une concentration de  $3 \times 10^{-5}$  M. Ce spectre montre deux bandes différentes  $\lambda_{\text{abs1}}= 320$  nm

(transition  $n-\pi^*$ ) du groupement C=O et  $\lambda_{\text{abs}2} = 242 \text{ nm}$  (transition  $\pi-\pi^*$ ) du groupement imine (C=N) de la pyridine [20].

### II.8.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge

Les principales bandes obtenues dans le KBr en pastilles sont représentées comme suit (**Fig.3.16**):  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3027, 1671, 1581, 1486, 978, 813. Ces dernières correspondent aux différents groupements caractéristiques de la chalcone synthétisée.

### II.9. Synthèse du (*E*)-3-(2,6-dichlorophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (**3i**)

La 4-acétylpyridine agit sur le 2,6-dichlorobenzaldéhyde en présence de l'hydroxyde de sodium aqueux à 10% et de l'éthanol comme solvant sous agitation magnétique à froid pendant 1 heure, l'agitation est maintenue pendant 60 autres minutes à température ambiante **schéma 3.10**. Le précipité formé est filtré et recristallisé pour isoler la chalcone **3i**.

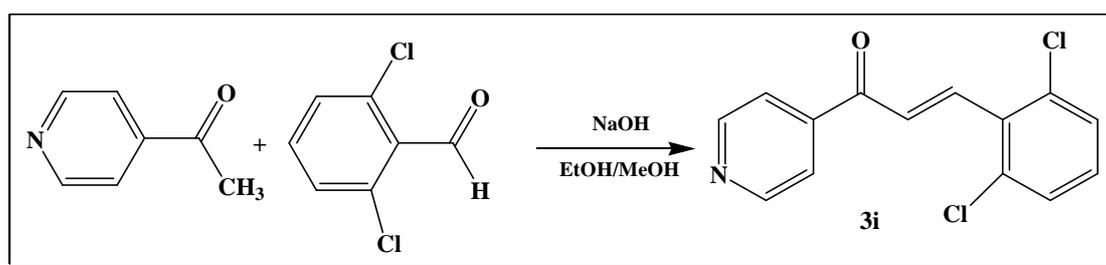
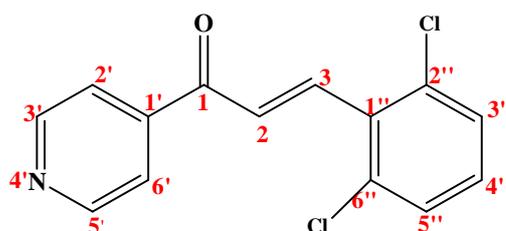


Schéma 3.10 : Synthèse de la chalcone **3i**.

#### II.9.1. Etude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))

Le spectre de masse obtenu par la LC-MS en mode ESI (+), présente des ions moléculaires à  $m/z = 278,1$  (100 %),  $280,1$  (63,9 %),  $282,1$  (11 %) correspondant à  $[M+H]^+$ ,  $[M+H, Cl^{35}]^+$ ,  $[M+H, Cl^{37}]^+$  respectivement confirmant ainsi la formule brute  $C_{14}H_9Cl_2NO$  du composé **3i**.

#### II.9.2. Etude par spectroscopie RMN du proton $^1H$



**Tableau 3.17** : Résultats de l'analyse RMN  $^1\text{H}$  du composé **3i**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Multiplicité | Attribution  |
|-----------------------------|--------------|--------------|
| 7,47                        | dd           | H-4''        |
| 7,62                        | m            | H-3'', H-5'' |
| 7,77                        | s (app)      | H-2, H-3     |
| 7,92                        | m            | H-2', H-6'   |
| 8,87                        | m            | H-3', H-5'   |

Nous distinguons dans le spectre RMN  $^1\text{H}$  de cette chalcone un premier signal à  $\delta=7,47$  représenté par un doublet de doublet ( $J=7,4$  Hz,  $J=8,7$  Hz) attribué au proton aromatique H-4'', le second signal à  $\delta=7,62$  ppm se manifeste sous forme de multiplet correspondant aux deux protons aromatiques H-3'', H-5'' qui restent du cycle benzénique substitué. A  $\delta=7,77$  ppm nous observons un singulet approximatif correspondant aux deux protons H-2, H-3. Nous apercevons également dans ce composé les deux multiplets représentatifs des protons aromatiques du cycle pyridinique ((H-2', H-6'), (H-3', H-5')) à  $\delta=7,92, 8,87$  ppm. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le **tableau 3.17** ci-dessus.

### II.9.3. Etude par spectroscopie RMN $^{13}\text{C}$

**Tableau 3.18** : Résultats de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **3i**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Attribution  |
|-----------------------------|--------------|
| 121,55                      | C-2', C-6'   |
| 129,18                      | C-3'', C-5'' |
| 129,95                      | C-2          |
| 131,36                      | C-4''        |
| 131,66                      | C-1''        |
| 134,20                      | C-2'', C-6'' |
| 138,43                      | C-1'         |
| 142,80                      | C-3          |
| 150,96                      | C-3', C-5'   |
| 189,26                      | C-1          |

Le spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  enregistré, montre que le nombre de signaux qui s'affichent est compatible avec le nombre de carbone de la chalcone **3i**. Tous les carbones observés sont dans le domaine des carbones hybridés  $\text{sp}^2$ . Les résultats de l'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  de ce composé sont exposés dans le **tableau 3.18** ci-dessus.

#### II.9.4. Etude par spectroscopie UV-Visible

Le spectre d'absorption UV-Visible de la chalcone **3i** est également préparé dans le chloroforme à une concentration de  $3 \times 10^{-5}$  M. Nous avons observé dans ce spectre une seule bande d'absorption distincte  $\lambda_{\text{abs}1} = 260$  nm attribuée à la transition  $n-\pi^*$  du groupement  $\text{C}=\text{O}$ . Quant à la bande d'absorption  $\lambda_{\text{abs}2} = 242$  nm représentative de la transition  $\pi-\pi^*$  du groupement ( $\text{C}=\text{N}$ ) n'apparaît pas dans le spectre UV-Vis de ce produit tout comme la chalcone **3f**.

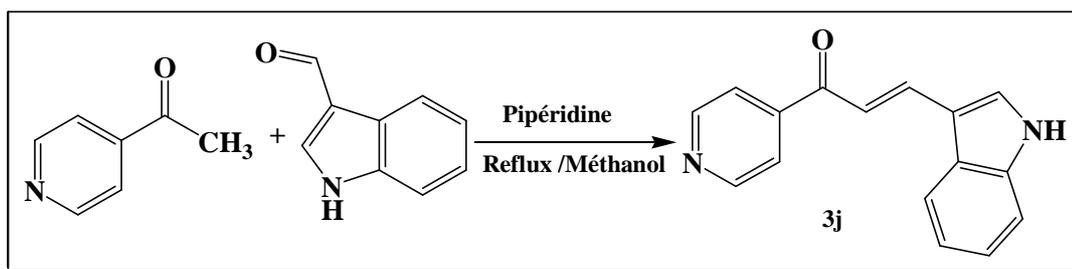
#### II.9.5. Etude par spectroscopie Infra Rouge

Dans le spectre IR du composé **3i**, on observe les bandes qui évoquent les groupements caractéristiques de la chalcone. Les principales bandes sont décrites comme suit:  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 3087, 1679, 1575, 1376, 969, 825.

- La bande  $1679 \text{ cm}^{-1}$  correspond aux vibrations d'élongation  $\text{C}=\text{O}$ .
- La bande distincte  $1575 \text{ cm}^{-1}$  suggère la présence de la liaison ( $\text{C}=\text{C}$  aromatique) des deux hétérocycles (benzène, pyridine).
- La bande  $969 \text{ cm}^{-1}$  d'intensité moyenne provient de la vibration  $\text{CH}=\text{CH}$  (trans) de la liaison oléfinique.
- La bande  $3087 \text{ cm}^{-1}$  est affectée aux vibrations d'élongations  $=\text{C}-\text{H}$ .
- La bande  $1376 \text{ cm}^{-1}$  est due aux vibrations d'élongation de la liaison  $\text{C}=\text{N}$ .
- La bande  $825 \text{ cm}^{-1}$  est attribuée aux vibrations d'élongation de la liaison  $\text{C}-\text{H}$  du cycle benzénique substitué.

#### II.10. Synthèse du (2E)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-on (3j)

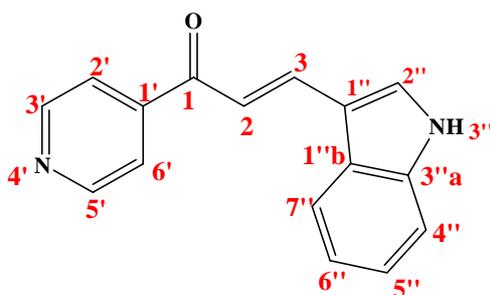
L'action de la 4-acétylpyridine sur le 1H-indole-3-carbaldéhyde au reflux du méthanol pendant 16 heures, en présence de la pipéridine nous a conduit à la formation du (2E)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-on **3j** sous forme d'une poudre jaune orangée après recristallisation dans le mélange de solvants méthanol-dichlorométhane (v/v) <sup>[19]</sup> **schéma 3.11**.

Schéma 3.11 : Synthèse de la chalcone **3j**.

### II.10.1. Etude par spectrométrie de masse électrospray LC-MS (ESI (+))

Le spectre de masse obtenu par la LC-MS en mode ESI (+), montre un ion moléculaire à  $m/z = 249,1$  (100%) correspondant à  $[M+H]^+$ , confirmant ainsi la formule brute  $C_{16}H_{12}N_2O$  du composé **3j**.

### II.10.2. Etude par spectroscopie RMN du proton $^1H$

Tableau 3.19 : Résultats de l'analyse RMN  $^1H$  du composé **3j**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Multiplicité | Attribution       |
|-----------------------------|--------------|-------------------|
| 7,22-7,29                   | m            | H-5'', H-6''      |
| 7,50-7,53                   | m            | H-3''             |
| 7,60                        | d            | H-2               |
| 7,98                        | m            | H-2', H-6'        |
| 8,09-8,18                   | m            | H-3, H-4'', H-7'' |
| 8,83                        | m            | H-3', H-5'        |
| 12,02                       | s            | H (NH)            |

Le spectre RMN  $^1H$  de ce composé montre un multiplet comme premier signal à  $\delta=7,22-7,29$  ppm correspondant aux protons aromatiques H-5'', H-6'', un autre multiplet lui succède à  $\delta= 7,50-7,53$  ppm, ce dernier est affecté au proton aromatique H-3''. Le proton H-2

surgit à  $\delta = 7,60$  ppm sous forme de doublet ( $J = 15,6$  Hz). A  $\delta = 7,98$  ppm nous observons un multiplet correspondant aux deux protons (H-2', H-6'). Le signal suivant correspond à trois protons ((1H, H-3), (2H, H-4'', H-7'')), il est représenté sous forme de multiplet à  $\delta = 8,09$ - $8,18$  ppm. Les deux protons H-3', H-5' qui restent du noyau pyridinique sont représentés également par un multiplet qui s'affiche à  $\delta = 8,83$  ppm. Le dernier signal du spectre correspond à un singulet, nous l'avons observé à  $\delta = 12,02$  ppm et ne peut être que le proton du groupement -NH. L'ensemble des résultats sont résumés dans le **tableau 3.19**.

### II.10.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup>C

**Tableau 3.20** : Résultats de l'analyse RMN <sup>13</sup>C du composé **3j**.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Attribution  |
|-----------------------------|--------------|
| 113,04                      | C-1''        |
| 113,35                      | C-4''        |
| 115,21                      | C-7''        |
| 121,02                      | C-5''        |
| 121,88                      | C-2', C-6'   |
| 121,94                      | C-6''        |
| 123,39                      | C-1''b       |
| 125,55                      | C-2          |
| 134,89                      | C-2''        |
| 138,12                      | C-3''a       |
| 141,33                      | C-1'         |
| 145,23                      | C-3          |
| 151,07                      | C-3'', C-5'' |
| 188,89                      | C-1          |

Le spectre RMN <sup>13</sup>C de cette chalcone montre l'apparition de plusieurs signaux correspondant aux différents carbones de cette molécule. Les résultats de cette analyse sont regroupés dans le **tableau 3.20** ci-dessus.

### II.10.4. Etude par spectroscopie UV-Visible

Le spectre d'absorption UV-Visible de la chalcone **3j** est préparé dans le DMSO à une concentration de  $1 \times 10^{-5}$  M. Nous avons observé dans ce spectre une seule bande d'absorption distincte  $\lambda_{\text{abs1}} = 405$  nm attribuée à la transition  $n-\pi^*$  du groupement C=O.

### III. Synthèse des chalcone-oximes (4a-c, e, h, i)

Les chalcones dérivées de la 4-acétylpyridine synthétisées, sont utilisées comme matières premières pour la synthèse de différentes oximes. L'action de l'hydroxylamine hydrochloré sur ces chalcones, en présence de l'acétate de sodium anhydre (base minérale), au reflux de l'éthanol pendant plusieurs heures donne après traitement des mélanges réactionnels plusieurs nouvelles chalcone-oximes non rapportées dans la littérature. Les structures des produits synthétisés (**4a-c, e, h, i**) sont confirmées par diverses techniques d'analyse.

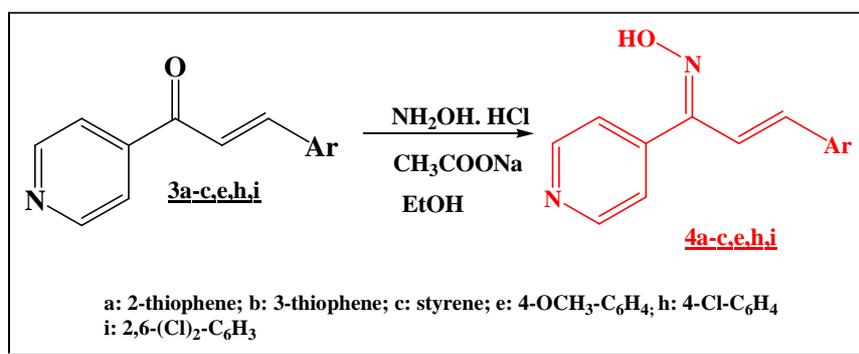


Schéma 3.12 : Voie de synthèse des chalcone-oximes **4a-c, e, h, i**.

#### III.1. Etude par spectrométrie de masse haute résolution ((HRMS) (ESI<sup>+</sup>))

Les spectres de masses obtenus par la HRMS (ESI<sup>+</sup>), révèlent un ion moléculaire correspondant à  $[M+H]^+$ , confirmant ainsi les formules brutes des produits synthétisés (**4a-c, e, h, i**). L'ensemble des résultats sont résumés dans le **tableau 3.21** suivant.

**Tableau 3.21** : Résultats des analyses HRMS ESI<sup>+</sup> des chalcone-oximes (**4a-c, e, h, i**).

| Produit   | Ion       | m/z      | M (g/mol)<br>calculée | Formule   |
|-----------|-----------|----------|-----------------------|---|
| <b>4a</b> | $[M+H]^+$ | 231,0592 | 231,0592              | C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> OS               |
| <b>4b</b> | $[M+H]^+$ | 231,0594 | 231,0592              | C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> OS               |
| <b>4c</b> | $[M+H]^+$ | 251,1186 | 251,1184              | C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O                |
| <b>4e</b> | $[M+H]^+$ | 255,1133 | 255,1134              | C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O                |
| <b>4h</b> | $[M+H]^+$ | 259,0636 | 259,0638              | C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> OCl              |
| <b>4i</b> | $[M+H]^+$ | 293,0248 | 293,0248              | C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> OCl <sub>2</sub> |

III.2. Etude par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  des chalcone-oximes (4a-c, e, h, i)

Les spectres RMN du proton sont réalisés à 500,28 MHz dans un appareil spectromètre Bruker Avance 500 en utilisant le diméthylsulfoxyde 6-deutéié comme solvant et le TMS comme référence interne, les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm. L'interprétation des spectres RMN  $^1\text{H}$  des chalcones-oximes est facile :

- Toutes les chalcone-oximes synthétisées présentent les mêmes protons (H-2', H-6'), (H-3', H-5') du noyau pyridinique apparaissant sous forme de multiplets allant de 8,04 à 8,12 ppm et de 8,91 à 8,96 ppm respectivement.
- Le groupement NOH caractéristique de l'oxime apparait également dans tous les spectres sous forme de singulet allant de 12,60 à 13,00 ppm confirmant ainsi la présence des chalcones-oximes.

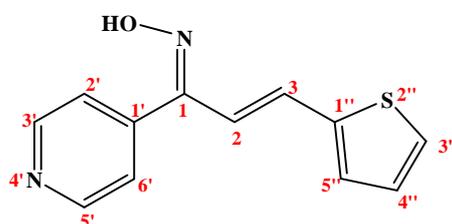
**Tableau 3.22** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  à 500,28 MHz des composés **4a-c, e, h, i**.

| Composé   | $\delta$ (ppm) | Multiplicité | Attribution |
|-----------|----------------|--------------|-------------|
| <b>4a</b> | 7,11           | d            | H-4''       |
|           | 7,14-7,24      | m            | H-2, H-3    |
|           | 7,33           | m            | H-5''       |
|           | 7,65           | d            | H-3''       |
|           | 8,04           | m            | H-2', H-6'  |
|           | 8,91           | m            | H-3', H-5'  |
|           | 12,68          | s            | NOH         |
| <b>4b</b> | 7,02           | d            | H-2         |
|           | 7,32           | d            | H-3         |
|           | 7,54           | m            | H-5''       |
|           | 7,62           | m            | H-4''       |
|           | 7,76           | m            | H-2''       |
|           | 8,07           | m            | H-2', H-6'  |
|           | 8,91           | m            | H-3', H-5'  |
|           | 12,64          | s            | NOH         |
| <b>4c</b> | 6,84           | d            | H-3         |
|           | 6,82           | d            | H-2         |
|           | 7,07           | d            | H-5         |

|           |       |    |                                 |
|-----------|-------|----|---------------------------------|
|           | 7,22  | dd | H-4                             |
|           | 7,29  | m  | H-4''                           |
|           | 7,37  | m  | H-3'', H-5''                    |
|           | 7,53  | m  | H-2'', H-6''                    |
|           | 8,05  | m  | H-2', H-6'                      |
|           | 8,93  | m  | H-3', H-5'                      |
|           | 12,68 | s  | NOH                             |
| <b>4e</b> | 3,78  | s  | 3H (OCH <sub>3</sub> )          |
|           | 6,93  | d  | H-2                             |
|           | 6,97  | m  | H-3'', H-5''                    |
|           | 7,35  | d  | H-3                             |
|           | 7,57  | m  | H-2'', H-6''                    |
|           | 8,08  | m  | H-2', H-6'                      |
|           | 8,92  | m  | H-3', H-5'                      |
|           | 12,60 | s  | NOH                             |
| <b>4h</b> | 7,02  | d  | H-2                             |
|           | 7,46  | m  | H-3'', H-5''                    |
|           | 7,48  | d  | H-3                             |
|           | 7,66  | m  | H-2'', H-6''                    |
|           | 8,12  | m  | H-2', H-6'                      |
|           | 8,94  | m  | H-3', H-5'                      |
|           | 12,85 | s  | NOH                             |
| <b>4i</b> | 6,36  | d  | H-2 (4i <sup>b</sup> )          |
|           | 6,95  | d  | H-2 (4i <sup>a</sup> )          |
|           | 7,06  | d  | H-2 (4i <sup>b</sup> )          |
|           | 7,34  | m  | H-4''(4i <sup>b</sup> )         |
|           | 7,37  | d  | H-3 (4i <sup>a</sup> )          |
|           | 7,40  | m  | H-4''(4i <sup>a</sup> )         |
|           | 7,52  | m  | H-3'', H-5'' (4i <sup>b</sup> ) |

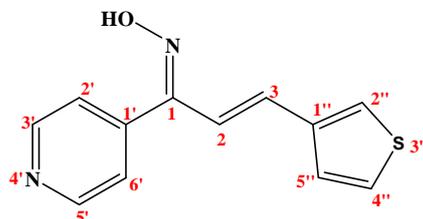
|       |   |                                 |
|-------|---|---------------------------------|
| 7,57  | m | H-3'', H-5'' (4i <sup>a</sup> ) |
| 7,91  | m | H-2', H-6' (4i <sup>b</sup> )   |
| 8,12  | m | H-2', H-6' (4i <sup>a</sup> )   |
| 8,96  | m | H-3', H-5' (4i <sup>a</sup> )   |
| 9,00  | m | H-3', H-5' (4i <sup>b</sup> )   |
| 12,26 | s | H, NOH (4i <sup>b</sup> )       |
| 13,00 | s | H, NOH (4i <sup>a</sup> )       |

### III.2.1. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H du composé 4a



Le spectre RMN <sup>1</sup>H de ce composé montre six signaux, le premier est représenté sous forme de doublet de doublet apparaissant à  $\delta = 7,11$  ppm ( $J = 3,6$  Hz,  $J = 5,0$  Hz) attribué au proton H-4'' du thiophène. Les deux autres signaux qui suivent surviennent également sous forme de multiplets. Le premier est aperçu à  $\delta = 7,14$ - $7,24$  ppm et il correspond aux deux protons H-2, H-3, le second à  $\delta = 7,33$  ppm est octroyé au proton H-5''. Le 4<sup>ème</sup> signal à  $\delta = 7,65$  ppm s'affiche sous forme de doublet ( $J = 5,0$  Hz), ce dernier est attribué au proton H-3''. Les trois derniers signaux sont communs à toutes les chalcone-oximes synthétisées, les deux premiers correspondent aux protons du noyau pyridinique et le dernier est un singulet affecté au proton de la fonction (NOH).

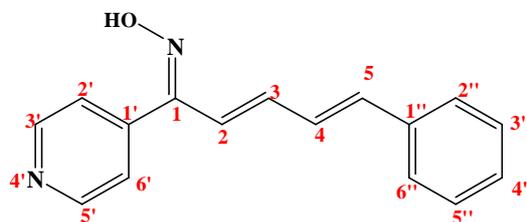
### III.2.2. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H du composé 4b



Nous contemplons dans le spectre RMN <sup>1</sup>H de ce composé à  $\delta = 7,02$  ppm un premier doublet ( $J = 16,9$  Hz) attribué au proton H-2, le second signal est accordé au proton H-3, ce dernier se présente également sous forme de doublet ( $J = 16,9$  Hz) à  $\delta = 7,32$  ppm. Les protons aromatiques du thiophène se révèlent sous forme de trois multiplets ; à  $\delta = 7,54, 7,62, 7,76$

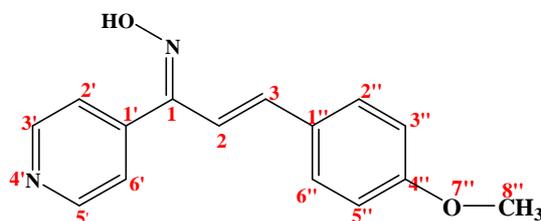
ppm et ils correspondent aux protons H-5'', H-4'', H-2'' respectivement. Les trois derniers signaux sont communs à toutes les chalcone-oximes synthétisées.

### III.2.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H du composé 4c

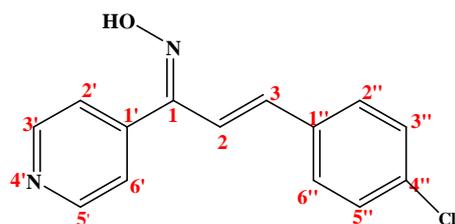


Le spectre RMN <sup>1</sup>H de ce composé montre un doublet comme premier signal à  $\delta= 6,84$  ppm ( $J=15,7$  Hz) affecté au proton H-3, le proton H-2 surgit sous forme de multiplet à  $\delta= 6,82$  ppm. Le proton H-5 est observé à  $\delta= 7,07$  ppm sous forme de doublet ( $J= 16,0$  Hz), tandis que le proton H-4 apparait sous forme de doublet de doublet à  $\delta= 7,22$  ppm ( $J= 10,7$  Hz,  $15,5$  Hz). Les protons aromatiques du cycle benzénique surviennent sous forme de multiplet à  $\delta= 7,29, 7,37, 7,53$  ppm ces derniers sont attribués aux protons H-4'', (H-3'', H-5''), (H-2'', H-6'') respectivement. Enfin, les trois autres signaux qui restent sont communs à toutes les chalcone-oximes synthétisées.

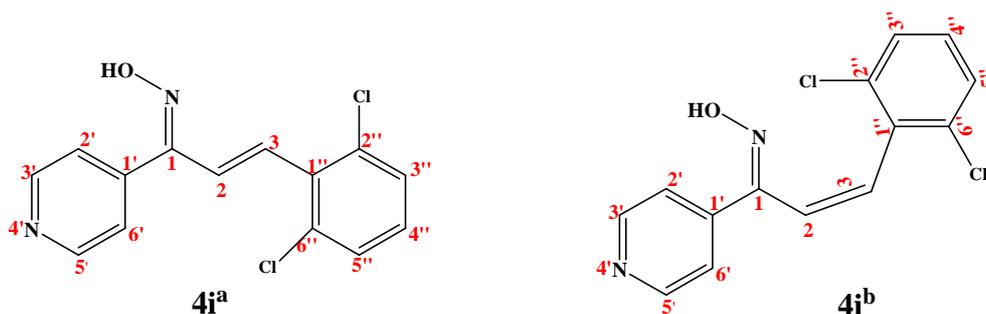
### III.2.4. Etude par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H du composé 4e



Le spectre RMN <sup>1</sup>H de ce composé montre un singulet à  $\delta=3,78$  ppm correspondant à trois protons aliphatiques, ces derniers ne peuvent être attribués qu'aux protons du groupement méthoxy (-O-CH<sub>3</sub>). A  $\delta= 6,93$  ppm nous observons le proton H-2 sous forme de doublet ( $J= 17,0$  Hz). Le signal suivant survient à  $\delta= 6,97$  ppm sous forme de multiplet, ce dernier est affecté aux deux protons aromatiques H-3'', H-5'' du cycle benzénique substitué en position para. Le proton H-3 se manifeste également sous forme de doublet ( $J=17,0$  Hz) à  $\delta= 7,35$  ppm, les protons aromatiques H-2'', H-6'' apparaissent sous forme de multiplet à  $\delta=7,57$  ppm. Les trois derniers signaux sont communs à toutes les chalcone-oximes synthétisées.

III.2.5. Etude par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  du composé **4h**

Dans le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **4h** le premier signal apparaît sous forme de doublet à  $\delta = 7,02$  ppm ( $J = 16,9$  Hz) qui est attribué au proton H-2. A  $\delta = 7,46$  ppm nous distinguons un premier multiplet correspondant aux protons aromatiques H-3'', H-5''. Le signal suivant surgit à  $\delta = 7,48$  ppm, il est représenté par un doublet ( $J = 16,9$  Hz), ce dernier ne peut être que le proton H-3. Les deux derniers protons aromatiques du cycle benzénique substitué H-2'', H-6'' se présentent à  $\delta = 7,66$  ppm sous forme de multiplet. Les autres signaux qui restent sont communs à toutes les chalcone-oximes.

III.2.6. Etude par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  du composé **4i**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **4i** montre qu'il existe un mélange de deux oximes *Z* et *E*, ceci est confirmé par la présence de deux signaux de la fonction (NOH). Les deux produits ont le même  $R_f$ , ils sont donc difficiles à séparer. Néanmoins la chalcone-oxime **4i<sup>a</sup>** se trouve en plus grand pourcentage par rapport à la chalcone-oxime **4i<sup>b</sup>**.

Le premier signal de ce spectre apparaît sous forme d'un doublet ( $J = 16,9$  Hz) à  $\delta = 6,36$  ppm et il correspond au proton H-2 du composé **4i<sup>b</sup>**. Un autre doublet ( $J = 17,2$  Hz) correspondant également au proton H-2 de l'oxime **4i<sup>a</sup>** surgit à  $\delta = 6,95$  ppm, le 3<sup>ème</sup> doublet s'affiche à  $\delta = 7,06$  ppm ( $J = 16,9$  Hz), il est accordé au proton H-3 du composé **4i<sup>b</sup>**. Le proton aromatique H-4'' du composé **4i<sup>b</sup>** survient sous forme de multiplet à  $\delta = 7,34$  ppm. Le proton H-3 de la liaison oléfinique de l'oxime **4i<sup>a</sup>** apparaît à  $\delta = 7,37$  ppm sous forme de doublet ( $J = 17,3$  Hz). Le proton aromatique H-4'' du composé **4i<sup>a</sup>** se révèle sous forme de multiplet à  $\delta = 7,40$  ppm. Les protons H-3'', H-5'' du noyau benzénique substitué apparaissent en premiers pour le composé **4i<sup>b</sup>** sous forme de multiplet à  $\delta = 7,52$  ppm, ce signal est suivi par un autre multiplet attribué aux protons H-3'', H-5'' du **4i<sup>a</sup>** à  $\delta = 7,57$  ppm.

Nous avons observé à  $\delta = 7,91$  ppm les protons aromatiques H-2', H-6' du composé **4i<sup>b</sup>** sous forme de multiplet, les protons H-2', H-6' de **4i<sup>a</sup>** se montrent également sous forme de multiplet à  $\delta = 8,12$  ppm. Les protons H-3', H-5' du cycle pyridinique de l'oxime **4i<sup>a</sup>** sont aperçus sous forme de multiplet à  $\delta = 8,96$  ppm, ceux du composé **4i<sup>b</sup>** s'affichent juste après sous forme de multiplet aussi à  $\delta = 9,00$  ppm.

Les deux derniers signaux contemplés dans ce spectre correspondent à des singulets; le premier est observé à  $\delta = 12,26$  ppm et il est attribué au H du groupement (NOH) de l'oxime **4i<sup>b</sup>**, le second à  $\delta = 13,00$  ppm ne peut être que le proton du groupement (NOH) de l'oxime **4i<sup>a</sup>**.

### III.3. Etude par spectroscopie RMN <sup>13</sup>C des composés (4a-c, e, h, i)

Les spectres RMN <sup>13</sup>C sont réalisés dans un appareil spectromètre Bruker Avance 500, carbone 125,8 MHz, en employant le DMSO-d<sub>6</sub> comme solvant et le TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm par rapport au signal de TMS.

**Tableau 3.23** : Déplacements chimiques en RMN <sup>13</sup>C à 125,8 MHz des composés **4a-c, e, h, i**.

| Carb/comp  | 4a     | 4b     | 4c     | 4e     | 4h     | 4i<br>(Oxime <sup>a</sup> ) | 4i<br>(Oxime <sup>b</sup> ) |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| C-1        | 151,92 | 152,92 | 152,15 | 160,34 | 151,80 | 151,23                      | 152,80                      |
| C-2        | 114,07 | 127,20 | 118,86 | 113,18 | 116,24 | 125,29                      | 124,15                      |
| C-3        | 131,15 | 138,84 | 151,80 | 137,77 | 136,75 | 149,83                      | 146,83                      |
| C-1''      | 140,86 | 132,45 | 137,57 | 128,24 | 133,82 | 132,92                      | 132,68                      |
| C-3''      | 130,18 | -      | 128,80 | 114,36 | 129,17 | 129,01                      | 128,97                      |
| C-4''      | 128,46 | 125,26 | 128,78 | 152,34 | 134,68 | 130,51                      | 130,11                      |
| C-5''      | 128,27 | 127,64 | 128,80 | 114,36 | 129,17 | 129,01                      | 128,97                      |
| C-1'       | 150,08 | 150,63 | 138,86 | 150,93 | 150,86 | 133,55                      | 133,40                      |
| C-2', C-6' | 125,72 | 125,66 | 125,73 | 125,79 | 125,78 | 126,40                      | 128,86                      |
| C-3', C-5' | 143,41 | 143,16 | 142,90 | 142,90 | 142,63 | 143,20                      | 144,14                      |
| C-2''      | -      | 115,15 | 126,90 | 129,04 | 128,91 | 131,92                      | 132,59                      |
| C-4        | -      | -      | 128,57 |        | -      | -                           | -                           |
| C-5        | -      | -      | 136,30 |        | -      | -                           | -                           |

|              |   |   |        |        |        |        |        |
|--------------|---|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>C-6''</b> | - | - | 126,90 | 129,04 | 129,37 | 131,92 | 132,59 |
| <b>C-7''</b> | - | - | -      | 50,28  | -      | -      | -      |

Les spectres des composés synthétisés, présentent la même empreinte caractéristique des carbones dans les différents produits. La disparition du pic carbonyle des chalcones à 185-192 ppm et l'apport d'un nouveau pic à 151- 160 ppm correspondant au C = N des oximes confirme la formation de cette dernière.

Contrairement aux autres composés, les résultats du spectre RMN <sup>13</sup>C du composé **4i** montrent la présence d'un mélange de chalcone-oxime *Z* et *E*. L'ensemble des résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 3.23**.

#### III.4. Etude par spectroscopie UV-Visible des chalcone-oximes (**4a-c, e, h, i**)

Les spectres d'absorption UV-Visible des produits **4a-c, e, h, i** sont effectués dans le DMSO **Fig.3.20**. A l'exception du composé **4a**, affichant deux bandes d'absorption, toutes les nouvelles chalcone-oximes synthétisées présentent une seule bande d'absorption. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le **tableau 3.24** ci-dessous.

**Tableau 3.24** : Résultats des analyses UV-visible des chalcone-oximes (**4a-c, e, h, i**).

| Composé   | $\lambda_{\text{abs}}$ (nm) |
|-----------|-----------------------------|
| <b>4a</b> | 317 $\pi$ - $\pi^*$         |
|           | 270 $\pi$ - $\pi^*$         |
| <b>4b</b> | 324 $\pi$ - $\pi^*$         |
| <b>4c</b> | 299 $\pi$ - $\pi^*$         |
| <b>4e</b> | 329 $\pi$ - $\pi^*$         |
| <b>4h</b> | 302 $\pi$ - $\pi^*$         |
| <b>4i</b> | 279 $\pi$ - $\pi^*$         |

#### III.5. Etude par spectroscopie IR des chalcone-oximes (**4a-c, e, h**)

**Tableau 3.25** : Résultats spectroscopiques IR des composés (**4a-c, e, h**).

| Produits  | Bandes caractéristiques enregistrées  |
|-----------|---------------------------------------|
| <b>4a</b> | 3116, 2555, 1611, 969, 813, 712       |
| <b>4b</b> | 3116, 2555, 1603, 1104, 972, 824, 767 |

|           |  |
|-----------|--|
| <b>4c</b> | 3094, 2555, 1500, 1104, 972, 822, 738      |
| <b>4e</b> | 3071, 2582, 1611, 1510, 969, 813, 531, 398 |
| <b>4h</b> | 3082, 2555, 1498, 981, 824, 509, 396       |

Les spectres IR réalisés sont caractérisés par deux bandes successives la première est observée à  $3116\text{ cm}^{-1}$  pour les différents produits synthétisés et correspond à la vibration d'élongation de la liaison  $=\text{C-H}$ , la seconde bande large qui surgit à  $2555\text{ cm}^{-1}$  ne peut être attribuée qu'au groupement OH. Cette seconde bande n'est pas observée dans les spectres IR des chalcones synthétisés. Cependant, la bande caractéristique du groupement  $\text{C=O}$  qui est observée vers  $1700\text{ cm}^{-1}$  n'apparaît pas dans les spectres IR de ces composés, ce qui confirme la présence des oximes. Nous avons également observé dans les différents spectres réalisés une bande à  $1500$  ou  $1600\text{ cm}^{-1}$  cette dernière ne peut être attribuée qu'au groupement  $\text{C=N}$  du noyau pyridinique. L'ensemble des résultats enregistrés sont regroupés dans le **tableau 3.25**.

#### IV. Synthèse 3-(3-(pyridin-4-yl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)-1H-indole (5j)

Le composé **5j** a été synthétisé à partir de la chalcone **3j**, l'action de l'hydroxylamine hydrochloré sur cette dernière en présence de l'acétate de sodium anhydre au reflux de l'éthanol pendant 13 h nous conduit vers l'obtention du 3-(3-(pyridin-4-yl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)-1H-indole **5j** schéma 3.13.

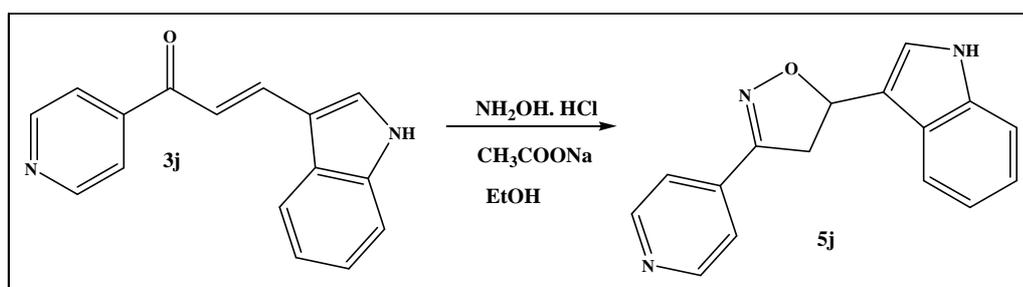
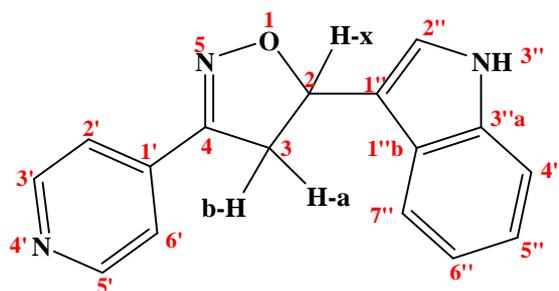


Schéma 3.13 : Voie de synthèse du composé **5j**.

##### IV.1. Etude par spectrométrie de masse haute résolution ((HRMS) (ESI<sup>+</sup>))

Le spectre de masse obtenu par la HRMS (ESI<sup>+</sup>), affiche un ion moléculaire à  $m/z = 264,1136$  correspondant à  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , masse calculée pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O} = 264,1137$ , confirmant ainsi la formule brute du composé **5j**.

IV.2. Etude par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  du composé (5j)Tableau 3.26 : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  à 500,28 MHz des composés 5j.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Multiplicité | Attribution |
|-----------------------------|--------------|-------------|
| 3,74                        | dd           | H-a         |
| 3,88                        | dd           | H-b         |
| 6,21                        | dd           | H-x         |
| 7,00                        | m            | H-4''       |
| 7,13                        | m            | H-5''       |
| 7,42                        | m            | H-6''       |
| 7,44                        | m            | H-7''       |
| 7,56                        | d            | H-2''       |
| 8,20                        | m            | H-2', H-6'  |
| 8,95                        | m            | H-3', H-5'  |
| 11,33                       | s            | H (NH)      |

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 5j montre la présence d'un système abx, nous avons observé un premier doublet de doublet à  $\delta=3,74$  ppm ( $J=9,5$  Hz,  $J=17,3$  Hz) attribué au proton H-a, le second doublet de doublet ( $J=11,3$  Hz,  $J=17,3$  Hz) est aperçu à  $\delta=3,88$  ppm, ce dernier ne peut être que le proton H-b, le proton H-x se révèle également sous forme de doublet de doublet ( $J=9,9$  Hz,  $J=11,1$  Hz) à  $\delta=6,21$  ppm. Les quatre protons aromatiques H-4'', H-5'', H-6'', H-7'' de l'indole apparaissent sous forme de quatre multiplets à  $\delta=7,00$ ,  $7,13$ ,  $7,42$ ,  $7,44$  ppm respectivement. Le proton H-2'' de l'indole est observé à  $\delta=7,56$  ppm sous forme de doublet ( $J=2,5$  Hz). Les protons du noyau pyridinique (H-2', H-6'), (H-3', H-5') sont contemplés sous forme de deux multiplets à  $\delta=8,20$ ,  $8,95$  ppm respectivement. Le dernier signal distingué à  $\delta=11,33$  ppm est un singulet du proton de la fonction NH de l'indole. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le **tableau 3. 26**.

IV.3. Etude par spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$  du composés (5j)Tableau 3.27 : Déplacements chimiques en RMN  $^{13}\text{C}$  à 125,8 MHz du composés 5j.

| $\delta$ expérimental (ppm) | Attribution  |
|-----------------------------|--------------|
| 37,77                       | C-3          |
| 79,83                       | C-2          |
| 111,99                      | C-4''        |
| 112,61                      | C-1''        |
| 118,67                      | C-6''        |
| 119,22                      | C-5'', C-7'' |
| 121,66                      | C-2''        |
| 123,12                      | C-2', C-6'   |
| 124,85                      | C-1''b       |
| 125,21                      | C-3''a       |
| 136,85                      | C-1'         |
| 143,78                      | C-3', C-5'   |
| 154,96                      | C-4          |

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de ce composé montre un signal à 37,77 ppm du  $\text{CH}_2$ , un autre signal à 79,83 ppm confirmant ainsi la formation d'une isoxazoline et la présence du système abx. L'ensemble des résultats sont résumés dans le **tableau 3. 27**.

## IV.4. Etude par spectroscopie UV-Visible du composé 5j

Le spectre d'absorption UV-Visible du composé **5j** est réalisé dans le DMSO, il présente une seule bande d'absorption  $\lambda_{\text{abs}}=278$  nm attribuée à la transition  $\pi-\pi^*$ .

## IV.5. Etude par spectroscopie IR du 3-(3-(pyridin-4-yl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)-1H-indole (5j)

Le spectre IR de ce composé montre les bandes suivantes  $\bar{\nu}$ :

- 3284  $\text{cm}^{-1}$  : vibrations d'élongation caractéristique de l'amine secondaire.
- 2498  $\text{cm}^{-1}$  : vibrations d'élongation symétrique de la liaison  $\text{CH}_2$  de l'isoxazoline.
- 1498  $\text{cm}^{-1}$  : due aux vibrations d'élongation de la liaison  $\text{C}=\text{N}$ .
- 1239  $\text{cm}^{-1}$  : vibrations d'élongation de la liaison  $\text{C}-\text{O}$  du cycle isoxazoline.
- 914  $\text{cm}^{-1}$  : vibrations de déformation hors du plan de la liaison  $=\text{CH}$  d'un seul atome d'hydrogène de l'indole.
- 745  $\text{cm}^{-1}$  : vibrations de déformation hors du plan de la liaison  $=\text{CH}$  de 4 atomes d'hydrogènes adjacents de l'indole.

## **V. Conclusion**

La synthèse de différentes chalcones dérivées de la 4-acétylpyridine a été décrite dans ce chapitre, ces molécules ne sont pas très étudiées. Nous les avons donc utilisées comme matières premières pour la synthèse de nouvelles chalcone-oximes non décrites dans la littérature. Nous avons également procédé à la synthèse du 3-(3-(pyridin-4-yl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)-1*H*-indole à partir du (2*E*)-3-(1*H*-indol-3-yl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-on. Les structures de tous les composés ont été confirmées par différentes techniques d'analyse.

Tous les réactifs et matières premières ont été achetés auprès de sources commerciales standard, étaient de qualité analytique et ont été utilisés sans purification supplémentaire. Les points de fusion ont été déterminés sur un appareil Stuart scientifique SPM3 équipé d'un microscope et ne sont pas corrigés. Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ont été enregistrés dans des solutions de DMSO- $d_6$  ou de  $\text{CDCl}_3$  sur un spectromètre Bruker Avance 300 (300,13 MHz pour le  $^1\text{H}$  et 75,47 MHz pour le  $^{13}\text{C}$ ) ou Bruker Avance Neo 500 (500,28 MHz pour le  $^1\text{H}$ , 125,8 MHz pour le  $^{13}\text{C}$ ). Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million ( $\delta$ , ppm). Ils ont été enregistrés par rapport au signal du solvant ou au signal du TMS. Les constantes de couplage ( $J$ ) sont données en hertz (Hz) et les abréviations des motifs de fractionnement sont : s, singulet; app s, singulet apparent; d, doublet; t, triplet; m, multiplet. Les spectres de masse sont obtenus avec ESI. Les spectres de masse ESI à ions positifs ont été acquis à l'aide d'un instrument Q-TOF 2, solution d'échantillon ( $10^{-5}$  M) dans 200  $\mu\text{L}$  d'acide trifluoroacétique/méthanol à 0,1%. L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation et l'argon comme gaz de collision. La tension de l'aiguille était réglée à 3000 V, avec la source d'ions à 80 °C et la température de désolvation à 150 °C. La tension du cône était de 35 V.

Les échantillons ont été analysés alternativement par la méthode HRMS ESI/Q-TOF. L'analyse MS a été réalisée sur un spectromètre de masse haute résolution SYNAPT G2-Si de Waters équipé d'une source d'ionisation par électrospray ESI (Waters Corp., Manchester, UK). La détection de masse a été réalisée en mode ion positif, la température de la source étant de 100°C, la tension capillaire et la tension du cône étant réglées à 3 kV et 40 V. Le gaz de désolvation a été optimisé à 600 L/h, le débit du gaz du cône à 50 L/h et la gamme de balayage était de 50 à 1600 m/z. Les analyses ont été réalisées en mode perfusion, la masse a été corrigée pendant l'acquisition en utilisant une référence externe (Lock-Spray) de 1 ng/ $\mu\text{L}$  de solution de leucine encéphaline à un débit de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Toutes les données recueillies ont été acquises à l'aide du logiciel MassLynx<sup>TM</sup> (V4,1) en mode centroïde.

## I. Procédure générale pour la synthèse des composés (3a-j)

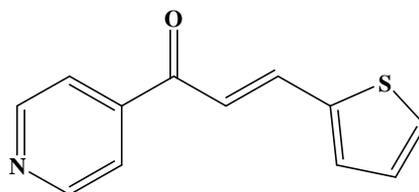
Méthode A <sup>[18]</sup> : À une solution refroidie de NaOH à 10 %, on ajoute 1,0 équivalent d'aldéhydes liquides. A cette solution, on a ajouté goutte à goutte 1,0 équivalent de 4-acétylpyridine sur une période de 30 minutes. La solution a été maintenue à 0°C pendant une heure, puis on l'a laissée sous agitation magnétique à température ambiante. Après un certain temps, un solide s'est séparé. La solution a été encore agitée pendant environ 1h. Le solide a

été filtré et ensuite recristallisé à partir de méthanol ou d'éthanol pour donner des cristaux de chalcones.

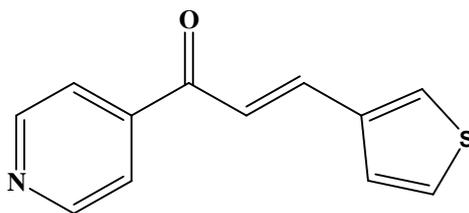
**Méthode B** <sup>[18]</sup> : Dans le cas des aldéhydes à l'état solide, l'aldéhyde (1 éq) a d'abord été dissous dans une quantité minimale d'éthanol ou de méthanol (environ 10 mL), puis une solution de NaOH à 10 % (environ 100 mL) a été ajoutée pour obtenir une solution claire. La solution a été refroidie jusqu'à 0°C en appliquant un bain de glace en dessous. Ensuite, 1 équivalent de 4-acétylpyridine a été ajoutée goutte à goutte en 30 minutes. La solution a été maintenue à 0°C pendant 1 heure et a ensuite été laissée à remuer à température ambiante. Après un certain temps, un solide a commencé à se séparer. Celui-ci a été agité pendant environ une heure. Le solide a été filtré et ensuite recristallisé à partir de méthanol ou d'éthanol pour donner des cristaux de chalcones.

**Méthode C** <sup>[19]</sup> : L'indole-3-carboxaldéhyde (1 éq) a été mis en réaction avec la 4-acétyl-pyridine (1 éq) en présence de pipéridine (0,5 éq) en utilisant le méthanol comme solvant. Le mélange réactionnel a été agité sous reflux pendant 16 heures. Après l'achèvement de la réaction, un précipité de couleur jaune-orange a été filtré, lavé, séché et recristallisé dans de l'éthanol-dichlorométhane pour fournir le précurseur (**3j**).

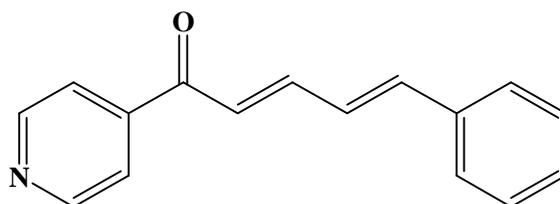
### I.1. (*E*)-1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophène-2-yl)prop-2-èn-1-one (**3a**)



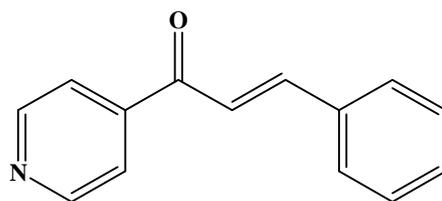
Poudre cristalline de couleur pistache; Rendement: 62 %; m.p: 103-105 °C (lit<sup>[21]</sup> mp : 98-100 °C) ; FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3075 (=C-H), 1662 (C=O), 1579 (C=C aromatique), 1413 (C=N), 965 (-CH=CH- trans), 709 (C-S); UV/Vis : λ<sub>abs</sub> (CHCl<sub>3</sub>)/nm 355- 242; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 7,23 (dd, *J*=3,7 Hz, *J*=5,0 Hz, 1H, ArH-thio), 7,51 (d, *J*= 15,4 Hz, 1H, =CH), 7,76 (m, 1H, ArH-thio), 7,86 (m, 1H, ArH-thio), 7,94 (m, 2H, ArH-py), 7,98 (m, 1H, =CH), 8,84 (m, 2H, ArH-py); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 119,84, 121,50, 128,88, 131,44, 133,76, 138,38, 139,41, 143,58, 150,74, 188,72 ; MS (ESI+) : *m/z* = 216,10 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**I.2. (*E*)-1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophèn-3-yl)prop-2-èn-1-one (3b)**

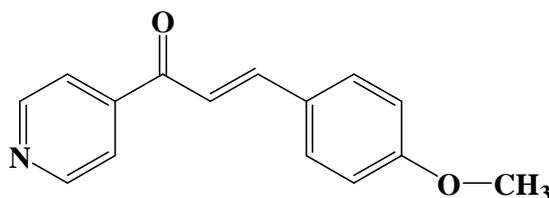
Poudre cristalline brune; Rendement: 70 %; m.p: 110-112 °C; FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3095 (=C-H), 1662 (C=O), 1585 (C=C aromatique), 1543 (C=N), 987 (-CH=CH-trans), 781 (C-S); UV/Vis: λ<sub>abs</sub>: (CHCl<sub>3</sub>)/nm 329-240 ; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7,70 (m, 1H, ArH-thio), 7,71 (d, *J*=15,4 Hz, 1H, =CH), 7,79 (m, 1H, ArH-thio) 7,83 (d, *J*=15,4 Hz, 1H, =CH), 7,97 (m, 2H, ArH-py), 8,19 (m, 1H, ArH-thio), 8,85 (m, 2H, ArH-py); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 120,92, 121,44, 125,16, 127,38, 130,36, 137,70, 140,00, 144,39, 150,75, 189,99; MS (ESI+): m/z = 216,10 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**I.3. (*2E,4E*)-1-phényl-5-(pyridin-4-yl)penta-2,4-dien-1-one (3c)**

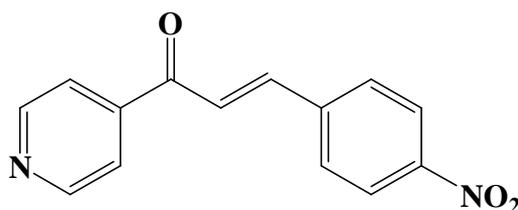
Poudre cristalline verte; Rendement: 72 %; m.p: 95-98 °C ; FT-IR (cm<sup>-1</sup>) 3046 (=C-H), 1651 (C=O), 1576 (C=C aromatique), 1417 (C=N), 1007 (-CH=CH- trans), 699 (C-H vibration de flexion de déformation du cycle benzénique 5 atomes d'hydrogènes adjacents); UV/Vis: λ<sub>abs</sub> (CHCl<sub>3</sub>)/nm 354-242 ; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7,26-7,35 (3H, (1H, =CH) (2H, Ar-H)), 7,37- 7,48 (m, 3H, (2H, =CH), (1H Ar-H)), 7,54- 7,66 (m, 3H, (1H, =CH) (2H Ar-H)), 7,85 (m, 2H, ArH-py), 8,84 (m, 2H, ArH-py) ; RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 121,35, 124,98, 127,03, 127,44, 128,98, 129,51, 135,84 , 143,04, 143,77, 146,20, 150,77, 189,29; MS (ESI+): m/z = 236,20 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**I.4. (E)-3-phényl-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (3d)**

Poudre fine jaunâtre; Rendement: 75 %; m.p: 175-177 °C (lit.<sup>[18]</sup> mp : 172-174 °C) ; FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3055 (=C-H), 1663 (C=O), 1595 (C=C aromatique), 1446 (C=N), 984 (-CH=CH- trans), 686 (C-H vibration de flexion de déformation du cycle benzénique des 5 atomes d'hydrogènes adjacents); UV/Vis: λ<sub>abs</sub> (CHCl<sub>3</sub>)/nm 316-242; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,42 (d, *J*=15,8Hz, 1H, =CH), 7,41-7,48 (m, 3H, ArH), 7,62- 7,68 (m, 2H, Ar-H), 7,79 (m, 2H, ArH-py), 7,83 (d, *J*= 15,8 Hz, 1H, =CH), 8,84 (m, 2H, ArH-py) ; RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 121,27, 121,80, 128,86, 129,25, 131,40, 134,40, 144,84, 147,14, 150,60, 189,87; HRMS (ESI+): *m/z* = 210,0920 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

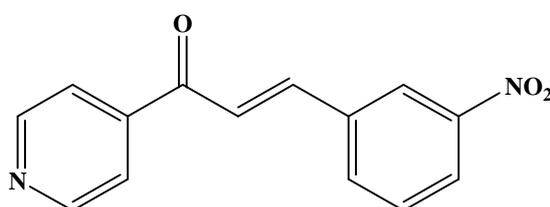
**I.5. (E)-3-(4-méthoxyphényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (3e)**

Poudre cristalline jaunâtre; Rendement: 75 %; m.p: 115-117 °C (lit.<sup>[18]</sup> mp : 104-106 °C) ; FT-IR (cm<sup>-1</sup>) : 3060 (=C-H), 1658 (C=O), 1588 (C=C aromatique), 1508 (C=N), 987 (-CH=CH- trans), 813 (C-H vibration de flexion du cycle benzénique p-substitué (-OCH<sub>3</sub>)); UV/Vis : λ<sub>abs</sub>(CHCl<sub>3</sub>)/nm 352-242; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3,84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7,04 (m, 2H, Ar-H), 7,77 (m, 2H, =CH), 7,89 (m, 2H, Ar-H), 7,99 (m, 2H, ArH-py), 8,84 (m, 2H, ArH-py) ; RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 55,44, 114,50, 119,03, 121,56, 127,00, 131,20, 143,90, 145,77, 150,72, 161,79, 188,92; MS (ESI+): *m/z* = 240,20 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**I.6. (E)-3-(4-nitrophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (3f)**

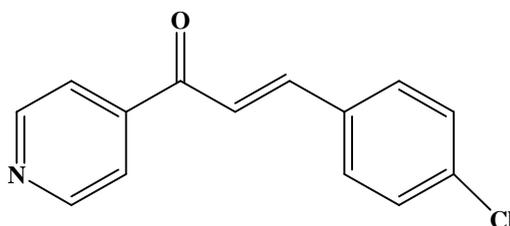
Poudre fine grise; Rendement: 83 %; m.p: 170-172 °C (lit.<sup>[22]</sup> mp: 187-189 °C); FT-IR (cm<sup>-1</sup>) : 3130 (=C-H), 1698 (C=O), 1581 (C=C aromatique), 1508 (C=N), 1000 (-CH=CH-trans), 1348 (C-NO<sub>2</sub>) , 816 (C-H vibration de flexion du cycle benzénique p-substitué); UV/Vis : λ<sub>abs</sub> (CHCl<sub>3</sub>)/nm 284; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 5,82 (m, 1H, =CH), 7,71 (d, *J*= 9,0 Hz, 2H, ArH-NO<sub>2</sub>), 7,83-7,86 (m, 2H, ArH-py), 8,19- 8,31 (m, 2H, ArH-NO<sub>2</sub>), 8,28 (m, 1H, =CH), 8,79- 8,81 (m, 2H, ArH-py); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 121,57, 123,75, 124,41, 127,68, 141,23, 143,17, 147,03, 151,24, 150,85, 192,04; MS (ESI+): m/z = 554,70 [2M+ 2 Na]<sup>+</sup> (100%).

### I.7. (E)-3-(3-nitrophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (3g)



Poudre fine de couleur blanc cassé; Rendement 73 %; m.p: 180-182 °C; FT-IR (cm<sup>-1</sup>) : 3036 (=C-H), 1667 (C=O), 1605 (C=C aromatique), 1520 (C=N), 995 (-CH=CH- trans), 1342 (C-NO<sub>2</sub>) , 813 (C-H vibration de déformation d'un cycle benzénique substitué); UV/Vis : λ<sub>abs</sub> (CHCl<sub>3</sub>)/nm 296- 241; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/drops of CH<sub>3</sub>OD): δ 7,55 (d, *J*=15,8 Hz, 1H, =CH), 7,63 (t, *J*=8,0 Hz, 1H, ArH-NO<sub>2</sub>), 7,85 (m, 2H, ArH-Py), 7,86 (m, 1H, =CH), 7,93 (d, *J*=8,0 Hz, 1H, ArH-NO<sub>2</sub>) 8,28 (m, 1H, ArH- NO<sub>2</sub>), 8,51 (m, 1H, ArH-NO<sub>2</sub>), 8,86 (m, 2H, ArH-Py) RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub> /drops of CH<sub>3</sub>OD): δ 121,94, 122,75, 123,57, 125,42, 130,36, 134,64, 136,06, 143,95, 144,34, 148,88, 150,45, 189,03 ; HRMS (ESI+) m/z calculée for C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>[M+H]<sup>+</sup> 255,0770 trouvée 255,0770.

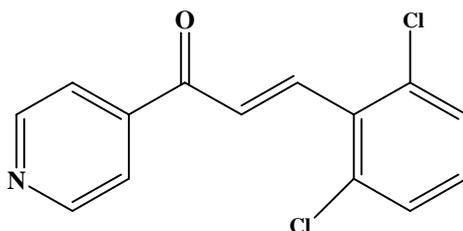
### I.8. (E)-3-(4-chlorophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (3h)



Poudre cristalline vert clair; Rendement: 72 %; m.p: 143-145 °C (lit.<sup>[23]</sup> mp : 139-141 °C) ; FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3027 (=C-H), 1671 (C=O), 1581 (C=C aromatique), 1486 (C=N), 978 (-CH=CH- trans), 811 (C-H vibration de flexion du cycle benzénique p-substitué (C-Cl));

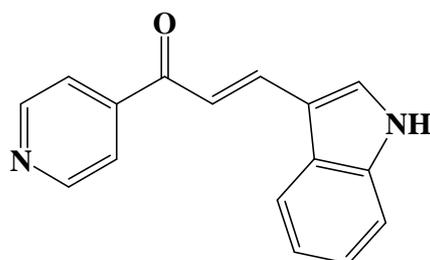
UV/Vis :  $\lambda_{\text{abs}}$  (CHCl<sub>3</sub>)/nm 320-242; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7,56 (d,  $J=8,5$  Hz, 2H, ArH-Cl), 7,80 (d,  $J=15,7$  Hz, 1H, =CH), 7,94 (d,  $J=15,7$  Hz, 1H (1H, =CH)), 7,97 (d,  $J=8,5$  Hz, 2H, ArH-Cl) 8,01 (m, 2H, ArH-py), 8,86 (m, 2H, ArH-py); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  122,08, 122,74, 129,49, 131,32, 133,80, 136,07, 143,89, 144,63, 151,26, 185,58; MS (ESI+):  $m/z = 244,1$  [M+H, <sup>35</sup>Cl]<sup>+</sup> (100%), 246,10 [M+H, Cl<sup>37</sup>]<sup>+</sup> (33,3%).

### I.9. (E)-3-(2,6-dichlorophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one (3i)



Poudre fine, blanc cassé; Rendement: 70%; m.p: 100-102 °C; FT-IR (cm<sup>-1</sup>) : 3087 (= C-H), 1679 (C=O), 1575 (C=C aromatique), 1376 (C=N), 969 (-CH=CH- trans), 825 (C-H vibration de flexion du cycle benzénique substitué (C-Cl)) ; UV/Vis :  $\lambda_{\text{abs}}$ (CHCl<sub>3</sub>)/nm : 260; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  7,47 (dd,  $J=7,4$  Hz,  $J=8,7$  Hz, 1H, ArH-Cl), 7,62 (m, 2H, ArH-Cl), 7,77 (app s, 2H,=CH), 7,92 (m, 2H, ArH-py), 8,87 (m, 2H, ArH-py); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  121,55, 129,18, 129,95, 131,36, 131,66, 134,20, 138,43, 142,80, 150,96, 189,26; MS (ESI+):  $m/z = 278,1$  [M+H, <sup>35</sup>Cl]<sup>+</sup> (100%), 280,1 [M+H, Cl<sup>37</sup>]<sup>+</sup> (63,9%).

### I.10. (2E)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-on (3j)

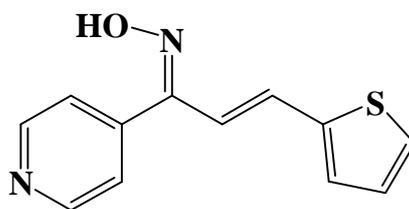


Poudre fine jaune orangé; Rendement: 90 %; m.p: 264-266 °C (lit.<sup>[19]</sup> mp : 266-268 °C); FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3039 (N-H), 1648 (C=O), 1607 (C=C); UV/Vis :  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 405; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 7,22- 7,29 (m, 2H, Indol), 7,50-7,53 (m, 1H, Indol), 7,60 (d, 1H,  $J=15,6$  Hz, =CH), 7,98 (m, 2H, ArH-py), 8,09-8,18 (m, 3H, (1H, =CH), (2H, Indol)), 8,83 (m, 2H, ArH-py), 12,02 (s, 1H, NH); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 113,04, 113,35, 115,21, 121,02, 121,88, 121,94, 123,39, 125,55, 134,89, 138,12, 141,33, 145,23, 151,07, 188,89; MS (ESI+):  $m/z = 249,10$  [M+1]<sup>+</sup>.

## II. Procédure générale pour la synthèse des composés 4a-c, e, h, i

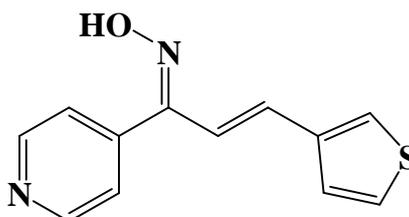
Un mélange de chalcones substituées **3** (2 mmoles), de chlorhydrate d'hydroxylamine (4 mmoles) et d'acétate de sodium anhydre (4 mmoles) dans de l'éthanol a été porté à reflux pendant 2 à 5 h. Une fois la réaction terminée, le mélange a été refroidi et versé dans de l'eau glacée. Le produit solide résultant **4** a été filtré, lavé avec suffisamment d'eau froide, séché et purifié par recristallisation à partir d'éthanol dilué (40%).

### II.1. (1Z,2E)-1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophène-2-yl)prop-2-èn-1-one oxime (4a)

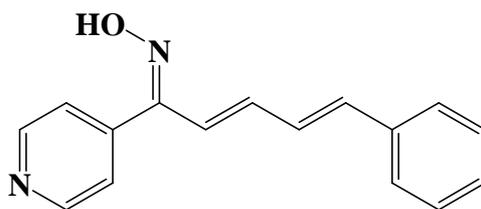


Poudre cristalline jaune; mp: 210-212 °C; Rendement: 42 % ; UV/Vis :  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 324; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,11 (dd,  $J=3.6$  Hz,  $J=5,0$  Hz, 1H, ArH-thio), 7,14-7,24 (m, 2H, =CH), 7,33 (m, 1H, ArH-thio), 7,65 (d,  $J= 5,0$  Hz, 1H, ArH-thio), 8,04 (m, 2H, ArH-py), 8,91 (m, 2H, ArH-py), 12,68 (s, 1H, NOH); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  114,07, 125,72, 128,27, 128,46, 130,18, 131,15, 140,86, 143,41, 150,08, 151,92; HRMS (ESI+) m/z calculée for  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{OS}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  231,0592 trouvée 231,0592

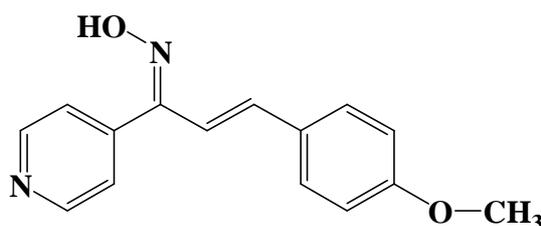
### II.2. (1Z,2E)-1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophène-3-yl)prop-2-èn-1-one oxime (4b)



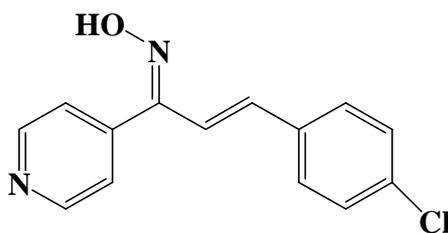
Poudre cristalline grise; mp: 203-205°C; Rendement: 47 % ; UV/Vis :  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 299; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,02 (d,  $J=16,9$  Hz, 1H, =CH), 7,32 (d,  $J= 16,9$  Hz, 1H, =CH), 7,54 (m, 1H, ArH-thio), 7,62 (m, 1H, ArH-thio), 7,76 (m, 1H, ArH-thio), 8,07 (m, 2H, ArH-py), 8,91 (m, 2H, ArH-py), 12,64 (s, 1H, NOH); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  115,15, 125,26, 125,66 , 127,20, 127,64, 132,45, 138,84, 143,16, 150,63, 152,23 ; HRMS (ESI+) m/z calculée for  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{OS}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  231,0592 trouvée 231,0594.

**II.3. (1Z,2E,4E)-5-phényl-1-(pyridin-4-yl)penta-2,4-dien-1-one oxime (4c)**

Poudre cristalline jaune clair, mp: 233-235 °C; Rendement: 40 % ; UV/Vis:  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 329; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  6,84(d,  $J=15,7\text{Hz}$ , 1H, =CH), 6,82 (m, 1H, =CH), 7,07 (d,  $J=16,0\text{ Hz}$ , 1H, =CH), 7,22 (dd,  $J=10,7\text{ Hz}$ ,  $J=15,5\text{Hz}$ , 1H, =CH), 7,29 (m, 1H, ArH), 7,37 (m, 2H, ArH), 7,53 (m, 2H ArH), 8,05 (m, 2H, ArH-py), 8,93 (m, 2H, ArH-py), 12,68 (s, 1H, NOH); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  118,86, 125,73, 126,90, 128,57, 128,80, 136,30, 137,57, 138,86, 142,90, 150,80, 152,15 ; HRMS (ESI+) m/z calculée for  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  251,1184 trouvée 251,1186.

**II.4. (1Z,2E)-3-(4-méthoxyphényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one oxime (4e)**

Poudre cristalline blanche, mp: 227-229 °C; Rendement: 47 %; UV/Vis:  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 319 ; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,78 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6,93 (d,  $J=17,0\text{ Hz}$ , 1H, =CH), 6,97 (m, 2H, ArH- $\text{OCH}_3$ ), 7,35 (d,  $J=17,0\text{ Hz}$ , 1H =CH), 7,57 (m, 2H, ArH- $\text{OCH}_3$ ), 8,08 (m, 2H, ArH-py), 8,92 (m, 2H, ArH-py), 12,60 (s, 1H, NOH); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  55,28, 113,18, 114,36, 125,79, 128,24, 129,04, 137,77, 142,90, 150,93, 152,34, 160,34; HRMS (ESI+) m/z calculée for  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  255,1134 trouvée 255,1133.

**II.5. (1Z,2E)-3-(4-chlorophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one oxime (4h)**

Poudre blanche; mp: 230-232 °C; Rendement: 46% ; UV/Vis:  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 301; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,02 (d,  $J= 16,9$  Hz, 1H, =CH), 7,46 (m, 2H, ArH-Cl), 7,48 (d,  $J=16,9$  Hz, 1H, =CH), 7,66 (m, 2H, ArH-Cl) 8,12 (m, 2H, ArH-py), 8,94 (m, 2H, ArH-py) 12,85 (s, 1H, NOH); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  116,24, 125,78, 128,91, 129,17, 133,82, 134,68, 136,75, 142,63, 150,86, 151,80; HRMS (ESI+) m/z calculée for  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OCl}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  259,0638 trouvée 259,0636.

## II.6. (2E)-3-(2,6-dichlorophényl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-èn-1-one oxime (4i)

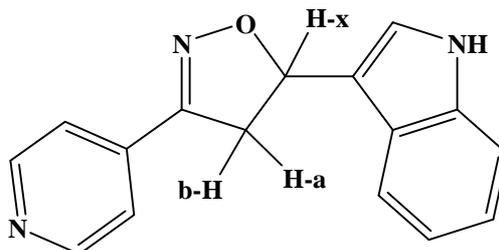


Mélange d'oximes (E) et (Z), poudre blanche; mp: 220-222 °C; Rendement: 44 % ; UV/Vis :  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 277; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  6,37 (d,  $J= 16,9$  Hz, 0,4H =CH $^{\text{oxim-b}}$ ), 6,96 (d,  $J=17,2$  Hz, 1H, =CH $^{\text{oxim-a}}$ ), 7,06 (d,  $J= 16,9$  Hz, 0,4H =CH $^{\text{oxim-b}}$ ), 7,34 (m, 0,4H, Ar-H $^{\text{oxim-b}}$ ), 7,37 (d,  $J=17,3$  Hz, 1H, =CH $^{\text{oxim-a}}$ ), 7,40 (m, 1H, ArH $^{\text{oxim-a}}$ ), 7,52 (m, 0,8H, Ar-H $^{\text{oxim-b}}$ ), 7,57 (m, 2H, Ar-H $^{\text{oxim-a}}$ ), 7,91(m, 0,8 H, ArH-py $^{\text{oxim-b}}$ ), 8,12 (m, 2H, ArH-py $^{\text{oxim-a}}$ ), 8,96 (m, 2H, ArH-py $^{\text{oxim-a}}$ ), 9,00 (m, 0,8 H, ArH-py $^{\text{oxim-b}}$ ), 12,26 (s, 0,4H, NOH $^{\text{oxim-b}}$ ), 13,00 (s, 1H, NOH $^{\text{oxim-a}}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  124,15, 125,29, 126,40, 128,86, 128,97, 129,01, 130,11, 130,51, 131,92, 132,59, 132,68, 132,92, 133,40, 133,55, 143,20, 144,14, 146,83, 149,83, 151,23, 152,80 ; HRMS (ESI+) m/z calculée for  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{OCl}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  293,0248 trouvée 293,0248.

## III. Procédure générale pour la synthèse du composé 5

Un mélange de chalcone substituée **3j** (2 mmoles), de chlorhydrate d'hydroxylamine (4 mmoles) et d'acétate de sodium (4 mmoles) dans de l'éthanol a été porté à reflux pendant 13 h. Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel a été refroidi. Le produit solide vert pâle résultant a été filtré, lavé avec suffisamment d'eau froide, séché et purifié par recristallisation à partir de méthanol.

## III.1. 3-(3-(pyridin-4-yl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)-1H-indole (5j)



Poudre vert clair; mp: 236-238 °C; Rendement: 93% ; UV/Vis :  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 278; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,74 (dd,  $J=9,5$  Hz,  $J=17,3$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3,88 (dd,  $J=11,3$  Hz,  $J=17,3$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 6,21 (dd,  $J=9,9$  Hz,  $J=11,1$  Hz, 1H, CH), 7,00 (m, 1H, Indol), 7,13 (m, 1H, Indol), 7,42 (m, 1H, indol), 7,44 (m, 1H, Indol), 7,56 (d,  $J=2,5$  Hz, 1H, Indol), 8,20 (m, 2H, ArH-py), 8,95 (m, 2H, ArH-py), 11,33 (s, 1H, NH); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  37,77, 79,83, 111,99, 112,61, 118,67, 119,22, 121,66, 123,12, 124,85, 125,21, 136,85, 143,78, 154,96; HRMS (ESI+)  $m/z$  calculée for  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  264,1137 trouvée 264,1136.

# Chapitre 2

*Evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante in-vitro des cétones  $\alpha,\beta$ -insaturées, des chalcone-oximes et de l'isoxazoline.*

*Docking moléculaire des nouvelles oximes comme ligands de l'acétylcholinestérase.*

## I. Introduction

Les dommages causés par les infections bactériennes et fongiques ont profondément augmenté ces dernières années [24]. Les maladies infectieuses causées par des agents pathogènes bactériens sont devenues un problème majeur de santé publique en raison de l'émergence de la résistance aux médicaments, qui a entraîné une augmentation de la mortalité et de la morbidité due à l'échec des traitements [25, 26]. Plusieurs souches bactériennes qui semblaient être sous contrôle causent à nouveau des décès chaque année en raison du manque d'antibiotiques appropriés [27]. Une attention particulière a été accordée à l'organisme à Gram positif *Staphylococcus aureus*, car de nombreuses souches sont désormais résistantes aux antibiotiques standard tels que la méthicilline et la vancomycine [28].

L'apparition de bactéries multirésistantes constitue un grave revers médical dans les hôpitaux et les collectivités [25]. Parmi elles, le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), le *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline (SPRP) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) sont les principales préoccupations [29, 30]. Bien que le SARM soit naturellement présent dans la flore humaine de la peau et surtout de la muqueuse nasale, il s'agit d'un agent pathogène opportuniste que l'on retrouve fréquemment dans les infections nosocomiales et qui peut entraîner des infections graves, notamment des septicémies [31]. Par conséquent, la synthèse de nouvelles structures et entités chimiques pour le développement d'agents antimicrobiens avec un mode d'action sans précédent est une tâche importante dans le domaine médical.

Les analogues naturels ou synthétiques de la chalcone, tels que les dérivés d'oximes, ont été signalés comme présentant diverses activités antimicrobiennes [32, 33] et inhibitrices de la tyrosinase, respectivement [34-35]. Comme indiqué précédemment, de nombreux composés avec des groupes oxime présentent des activités biologiques puissantes et une faible toxicité [35, 36]. Certains d'entre eux ont été utilisés comme agents médicaux cliniques et d'autres ont été signalés comme inhibiteurs de l'acétylcholinestérase [37].

Nous décrivons dans ce chapitre l'activité antimicrobienne, antioxydante *in-vitro* des chalcones et des nouvelles chalcone-oximes synthétisées ainsi que le docking moléculaire de ces dernières comme ligands de l'acétylcholinestérase.

## II. Activité antimicrobienne

Les activités biologiques des composés préparés ont été évaluées au regard des activités existantes pour des structures analogues. En effet, les chalcones sont des agents antibactériens et antifongiques potentiels selon la littérature [3, 4, 8], tandis que les oximes sont plutôt connues pour leur effet antifongique [38]. Pour cette raison, nous avons vérifié les chalcones contre les souches bactériennes et fongiques et les oximes uniquement contre une levure et un champignon filamenteux.

### II.1. Activité antibactérienne des chalcones (3a-i)

Les chalcones hétérocycliques synthétisées ont été testées pour leur activité antibactérienne contre deux bactéries Gram-négatif et une bactérie Gram-positif en utilisant la méthode de diffusion de disque [39]. Les échantillons ont été préparés dans du DMSO à une concentration de 5,12 mg/mL. Les diamètres de diffusion (mm) sont indiqués dans **tableau 3.28, Fig. 3.1**.

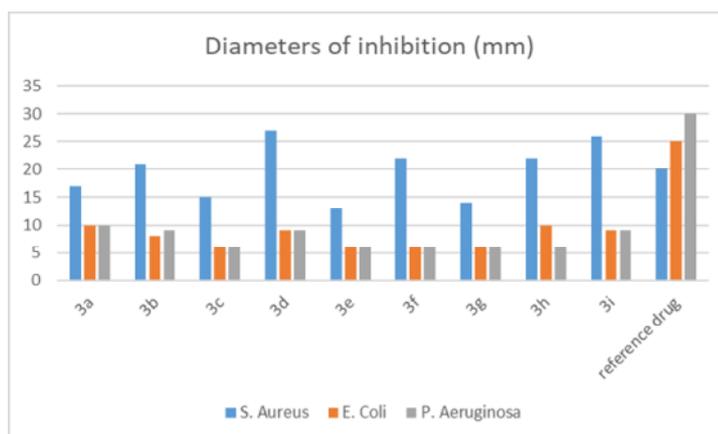
Dans le cas de la souche bactérienne Gram-positif (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923), il a été observé que tous les produits synthétisés avaient une activité antibactérienne excellente à modérée. Le composé **3d** a montré le meilleur pouvoir d'inhibition, suivi du composé **3i**, puis des composés **3h**, **3f**, **3b**. Leur activité était meilleure que celle de l'antibiotique de référence (Rifampicine). Cependant, le composé **3e** a montré une inhibition minimale. Nos composés se sont avérés significativement moins actifs contre les autres souches : **3a**, **3d**, **3i** ont montré une légère inhibition contre les deux bactéries Gram-négatif *Escherichia coli* (ATCC 25923) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), alors que **3h** a montré une faible inhibition seulement contre *E. coli*.

En ce qui concerne la relation structure-activité des produits synthétisés, il a été noté que **3i**, **3h**, **3f** ont montré une excellente activité contre la bactérie *Staphylococcus aureus*, ce qui indique que l'introduction de groupes forts attracteurs d'électrons (-NO<sub>2</sub>, Cl) dans le cycle benzénique augmente l'activité antibactérienne. Inversement, l'incorporation de groupes donneurs d'électrons (p-OCH<sub>3</sub>) sur le cycle benzénique réduit l'activité antibactérienne (composé **3e**) [40, 41]. En comparant les différentes positions de substitution du chlore, leur ordre était le suivant : 2,6-(Cl)<sub>2</sub> > p-Cl. Cela suggère que l'introduction de deux atomes d'halogène dans le composé peut jouer un rôle important dans l'augmentation des propriétés antibactériennes. L'ensemble des résultats sont illustrés dans la **figure.3.2** ci-dessous.

**Tableau 3.28 :** Diamètres des zones d'inhibition (mm) des composés (3a-i) et du médicament standard à 5,12 mg/mL.

| Souche bactérienne   | 3a<br>(3) | 3b<br>(8) | 3c<br>(4) | 3d<br>(5) | 3e<br>(7) | 3f<br>(11) | 3g<br>(12) | 3h<br>(6) | 3i<br>(10) | Médicament standard* |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|------------|----------------------|
| <i>S. aureus</i>     | 17<br>++  | 21<br>+++ | 15<br>++  | 27<br>+++ | 13<br>+   | 22<br>+++  | 14<br>+    | 22<br>+++ | 26<br>+++  | 20<br>+++            |
| <i>E. coli</i>       | 10<br>+   | 8<br>-    | 6<br>-    | 9<br>+    | 6<br>-    | 6<br>-     | 6<br>-     | 10<br>+   | 9<br>+     | 25<br>+++            |
| <i>P. aeruginosa</i> | 10<br>+   | 9<br>+    | 6<br>-    | 9<br>+    | 6<br>-    | 6<br>-     | 6<br>-     | 6<br>-    | 9<br>+     | 30<br>+++            |

\*Le médicament standard est la Rifampicine pour *S. aureus* (5,12 mg/mL), le Cotrimoxazole pour *E. coli* (5,12 mg/mL), la Colistine pour *P. aeruginosa* (5,12 mg/mL).



**Figure 3.1 :** Diamètres d'inhibition des composés (3a-i) et du médicament standard.



**Figure 3.2 :** Résultats de l'activité antibactérienne des chalcones (**3a-i**) testées contre *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*.

## II.2. Activité antifongique des chalcones (**3a-j**), des chalcone-oximes (**4a-c**, **4e**, **4h**, **4i**) et du composé **5j**

L'activité antifongique des composés synthétisés a été étudiée contre *A. niger* et *C. albicans*. L'inspection des données **tableau 3.29**, **tableau 3.30** a révélé que les composés **3a**, **3b**, **3d**, **3e** étaient significativement actifs contre la levure *C. albicans*, mais toujours inférieurs au standard fluconazole pris comme référence. Les chalcones **3c**, **3f**, **3h**, **3i** étaient moins actives, tandis que les autres chalcones **3g**, **3j** n'ont eu aucun effet sur la souche *C. albicans*. Pour *Aspergillus niger*, les deux composés **3c**, **3d** ont montré de très bons résultats avec une inhibition maximale par rapport aux médicaments standards, suivis du composé **3h** qui a également montré un diamètre d'inhibition favorable. Les autres composés tels que **3a**, **3e**, **3i** n'ont montré qu'une légère inhibition.

Contrairement aux résultats obtenus pour l'activité antibactérienne, nous avons observé que la présence du groupe nitro (-NO<sub>2</sub>) dans les composés diminue ou annihile l'activité antifongique. La variation de l'activité des chalcones testées contre les microorganismes dépend de l'imperméabilité de la cellule ou des différences dans les ribosomes des cellules microbiennes. La membrane lipidique entourant la cellule favorise le passage de tout matériau liposoluble et il est connu que la liposolubilité est un facteur important contrôlant l'activité antimicrobienne [41]. L'ensemble des résultats sont illustrés dans le **tableau 3.29** et la **figure.3.3** ci-dessous.

**Tableau 3.29:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) des composés (**3a-j**) et du médicament standard à 5,12 mg/mL.

| Souche fongique    | 3a<br>(3) | 3b<br>(4) | 3c<br>(6) | 3d<br>(9) | 3e<br>(5) | 3f<br>(7) | 3g<br>(8) | 3h<br>(2) | 3i<br>(1) | 3j<br>(10) | Médicament<br>standard* |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------------------|
| <i>A. niger</i>    | 6<br>-    | 10<br>+   | 19<br>+++ | 20<br>+++ | 11<br>+   | 6<br>-    | 6<br>-    | 15<br>++  | 11<br>+   | 6<br>-     | 6<br>-                  |
| <i>C. albicans</i> | 14<br>++  | 14<br>++  | 9<br>+    | 14<br>++  | 14<br>++  | 9<br>+    | 6<br>-    | 11<br>+   | 11<br>+   | 6<br>-     | 29<br>++++              |

\*médicament : Fluconazole (5,12 mg/mL) pour *C. albicans* et *A. niger*.



**Figure 3.3 :** Résultats de l'activité antifongique des chalcones (**3a-j**) synthétisées testées contre *Candida. albicans* et *Aspergillus. niger*.

Concernant les chalcone-oximes **4**, à l'exception du composé **4h** qui a montré une certaine activité contre *C. albicans* (CMI= 500 µg/mL), toutes les autres chalcone-oximes **4** et l'isoxazoline **5j** n'ont montré aucune activité antifongique contre les deux espèces testées. De ces résultats, on peut conclure que le pont carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturé reliant les deux cycles est important dans le mode d'action des composés contre les deux souches fongiques. Les résultats de l'activité antifongique sont présentés dans **tableau 3.30** et la **figure.3.4**.

**Tableau 3.30** : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des composés (**4**, **5j**) et du médicament standard à 5,12 mg/mL.

| Souche fongique    | 4a<br>(7) | 4b<br>(1) | 4c<br>(2) | 4e<br>(3) | 4h<br>(4) | 4i<br>(5) | 5j<br>(6) | Médicament<br>standard* |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------------|
| <i>A. niger</i>    | 6         | 6         | 6         | 6         | 6         | 6         | 6         | 6                       |
|                    | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -         | -                       |
| <i>C. albicans</i> | 6         | 6         | 6         | 6         | 13        | 6         | 6         | 29                      |
|                    | -         | -         | -         | -         | +         | -         | -         | ++++                    |

\*médicament= Fluconazole (5,12 mg/mL) pour *C. albicans* et *A. niger*.



**Figure 3.4** : Résultats de l'activité antifongique des chalcone-oximes (**4a-c**, **e**, **h**, **i**) et de l'isoxazoline **5j** synthétisées testées contre *Candida. albicans* et *Aspergillus. niger*.

Les produits les plus actifs ont été dilués pour évaluer leurs concentrations minimales inhibitrices. Contre *C. albicans*, le meilleur résultat a été obtenu pour les deux composés **3a** et **3b** (CMI= 62,5 µg/mL) suivi du composé **3d** (CMI= 125 µg/mL) et enfin du composé **3e** (CMI= 500 µg/mL). Les concentrations minimales inhibitrices des composés les plus actifs restent inférieures à celles du Fluconazole pris comme référence (CMI= 15,625 µg/mL).

Contre *A. niger*, le meilleur résultat a été obtenu avec le composé **3c** (CMI= 7,8125 µg/mL) suivi du composé **3d** (CMI= 15,625 µg/mL) puis du composé **3h** (CMI= 62,5 µg/mL).



Figure 3.5 : CMI de la chalcone **3a** contre *Candida. albicans*.



Figure 3.6 : CMI de la chalcone **3d** contre *Candida. albicans*.

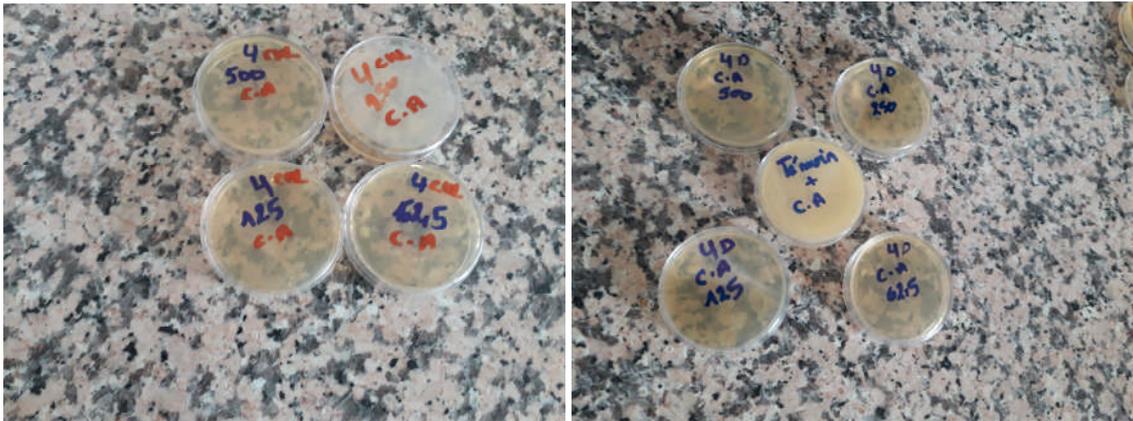


Figure 3.7 : CMI de la chalcone 3b contre *Candida. albicans*.

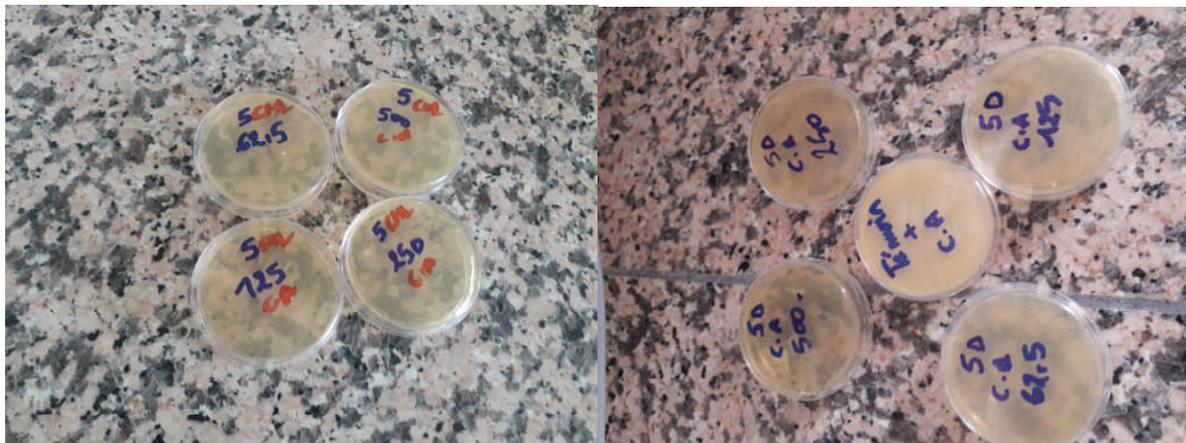


Figure 3.8 : CMI de la chalcone 3e contre *Candida. albicans*.



Figure 3.9 : CMI de la chalcone 3d contre *Aspergillus. niger*.

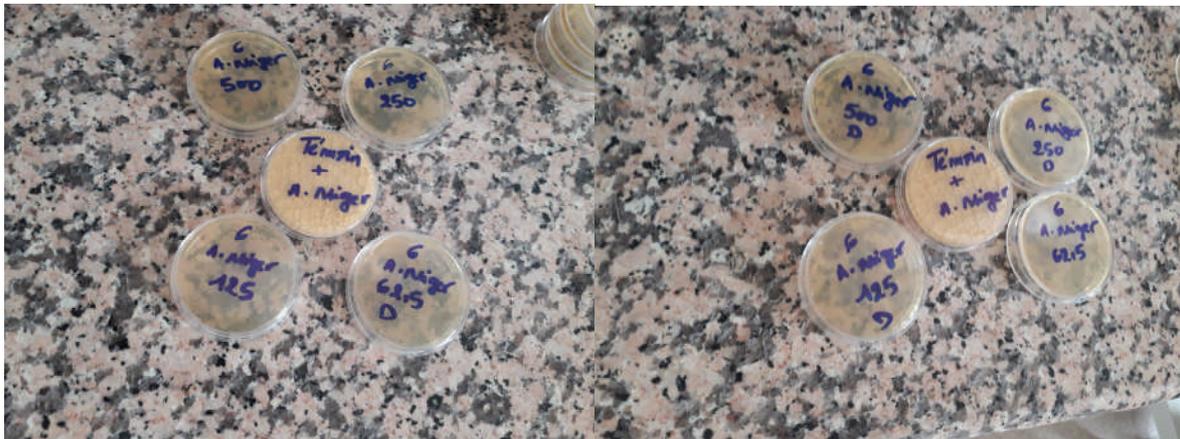




Figure 3.10 : CMI de la chalcone 3c contre *Aspergillus. niger*.

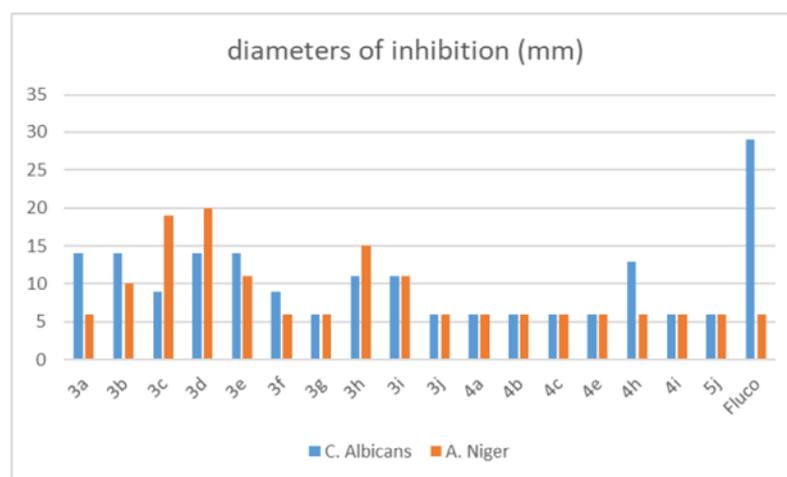


Figure 3.11 : CMI de la chalcone 3h contre *Aspergillus. niger*.



Figure 3.12 : CMI de la chalcone 4h contre *Candida. albicans*.

Des études précédentes [42, 43] ont montré que le Fluconazole, un médicament contenant des azoles, inhibe la prolifération de la levure *C. albicans*, mais est inactif contre *A. niger*. Dans ce travail, nous avons pu démontrer que six chalcones sont actives contre *A. niger*, trois d'entre elles présentant un excellent résultat. Sur la base de ces données, nous pouvons supposer que la présence de la fonction cétone ou du cycle pyridinyle confère à ces molécules une activité contre le champignon filamenteux *A. niger*.



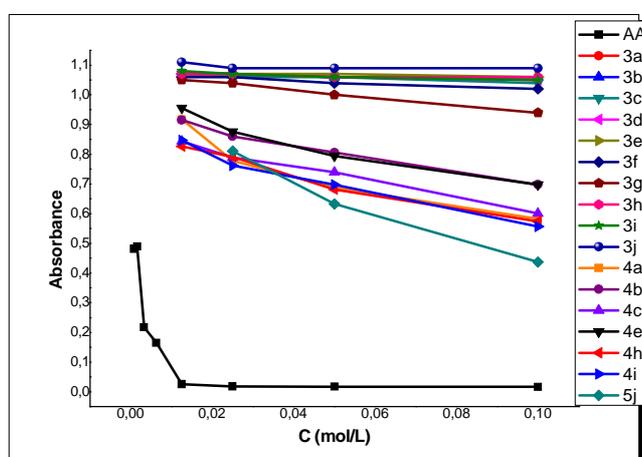
**Figure 3.13 :** Diamètres d'inhibition des composés synthétisés et de la référence (agent antifongique).

### III. Activité antioxydante des chalcones (3a-j), des chalcone-oximes (4a-c, 4e, 4h, 4i) et du composé (5j)

Les antioxydants réagissent avec le DPPH<sup>•</sup>, un radical libre stable qui est réduit en DPPH-H, par conséquent, l'absorbance du radical DPPH<sup>•</sup> diminue à la forme DPPH-H. Le degré de décoloration indique le potentiel de piégeage des composés antioxydants en termes de capacité à donner de l'hydrogène. Tous les composés synthétisés **3**, **4**, **5j** ont été évalués pour leur activité antioxydante *in-vitro* par le test de piégeage du radical DPPH [44, 45] à différentes concentrations. La **figure 3.14** montre la variation de l'absorbance en fonction de la concentration des différents composés **3**, **4**, **5j** et du standard qui est l'acide ascorbique. Une absorbance plus faible du mélange réactionnel indique une activité de piégeage des radicaux libres plus élevée. La capacité à piéger le DPPH<sup>•</sup> (ou % d'inhibition) a été calculée comme suit :  $RSA (\%) = [(Ac - As)/Ac] \times 100$ .

Où Ac est l'absorbance du contrôle (absorbance de la solution de DPPH<sup>•</sup> dans l'éthanol sans échantillon), et As est l'absorbance du composé testé après 60 min d'incubation.

Il est clair que toutes les chalcones synthétisées (**3a-j**) n'ont montré aucune activité antioxydante, contrairement aux oximes (**4a-c**, **4e**, **4h**, **4i**) et à l'isoxazoline **5j**, qui ont montré une activité modérée par rapport à l'acide ascorbique pris comme référence. L'absence de substituants donateurs d'électrons sur le cycle benzénique des chalcones, la présence de groupes halogènes attracteurs d'électrons ou de cycles thiophényles expliquent l'absence d'activité antioxydante de ces molécules.



**Figure 3.14** : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration des différents composés **3**, **4**, **5j** et **AA**.

D'après les résultats obtenus, le composé **5j** a montré la plus forte activité ( $IC_{50} = 16,31 \text{ mg/mL}$ ) suivi du composé **4h** puis **4i**. Le composé **4e** a montré la plus faible activité antioxydante. A partir de ces résultats nous avons pu constater que dans le cas du composé **5j** la cyclisation permet de libérer l'hydrogène de la fonction amine (-NH) présente sur l'indole, ce qui lui confère une activité moyenne contrairement à son précurseur **3j**. Il a également été observé que la position de l'hétéroatome (soufre) dans le cycle thiophène influence l'activité antioxydante. Le meilleur résultat a été obtenu lorsque le soufre occupe la position **2** dans l'hétérocycle. L'activité antioxydante du composé **4h** est meilleure que celle du composé **4i**, ce qui montre que la présence de chlore sur deux positions (**2** et **6**) réduit l'activité antioxydante.

#### IV. Prédiction en silico de la barrière hémato-encéphalique

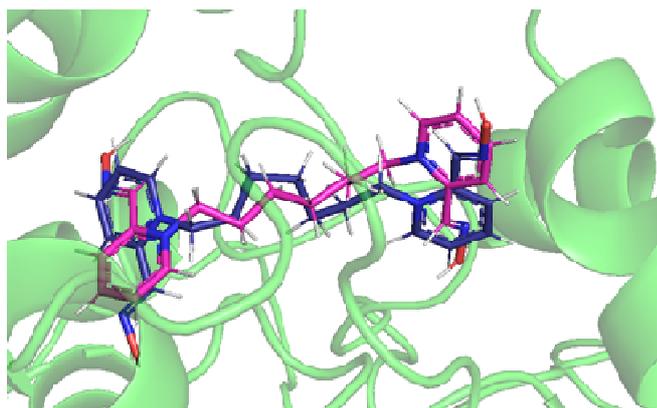
La pénétration de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est un paramètre utilisé pour déterminer si un composé va pénétrer et se distribuer dans le système nerveux central (SNC) ou s'il sera exclu du SNC. La traversée de la BHE est essentielle pour l'imagerie du parenchyme cérébral et le traitement des maladies neurologiques. Cependant, la puissance des oximes synthétisées pour traverser la BHE a été prédite sur la base de leurs propriétés physicochimiques et rapportée dans le **tableau 3.31**. Les résultats montrent que tous les composés synthétisés sont capables de pénétrer la barrière hémato-encéphalique. En outre, aucun des composés synthétisés n'a violé la règle des cinq de Lipinski, qui est considérée comme un principe important utilisé pour certifier la similarité d'un composé avec un médicament.

**Tableau 3.31** : Pénétration de la **BHE** et profil de la règle de Lipinski des composés étudiés.

| Composé   | BHE      | Règle de Lipinski |
|-----------|----------|-------------------|
| <b>4a</b> | Pénétrer | Pas d'infraction  |
| <b>4b</b> | Pénétrer | Pas d'infraction  |
| <b>4c</b> | Pénétrer | Pas d'infraction  |
| <b>4e</b> | Pénétrer | Pas d'infraction  |
| <b>4h</b> | Pénétrer | Pas d'infraction  |
| <b>4i</b> | Pénétrer | Pas d'infraction  |
| <b>5j</b> | Pénétrer | Pas d'infraction  |

#### V. Génération des paramètres d'amarrage

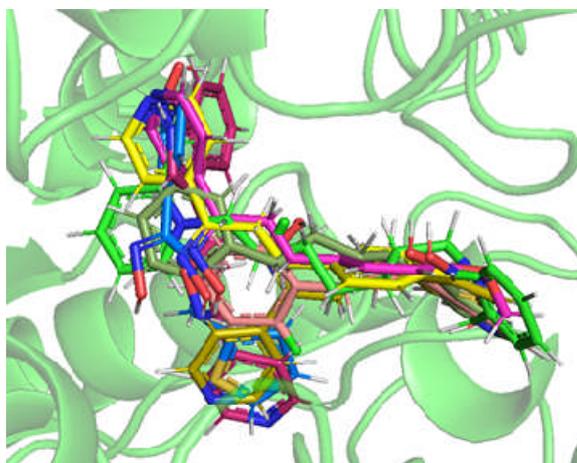
Le ligand co-cristallisé HBP a été extrait du complexe cristallographique **2WU4** et docké dans le site de liaison de la protéine **fep-mAChE**. Les paramètres conduisant à la conformation acceptable du ligand dans le site actif de la protéine, caractérisée par une faible RMSD par rapport à l'expérimental, une faible énergie d'arrimage <sup>[46]</sup> et un nombre élevé de liaisons hydrogène, ont été utilisés dans l'arrimage des composés synthétisés (**Fig. 3.15**).



**Figure 3.15 :** Superposition de la conformation dockée (bâtons bleus) sur la structure cristallographique du ligand HBP (bâtons rose). Le squelette de la protéine est représenté par un dessin vert.

## VI. Mode de liaison des composés étudiés

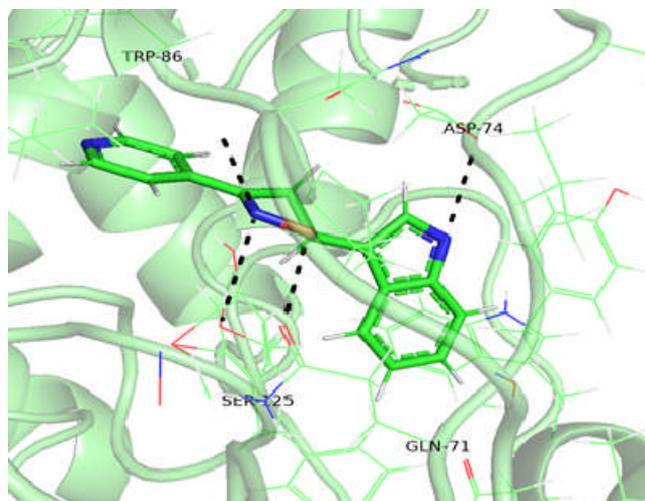
La visualisation des conformations dockées des composés synthétisés a révélé que tous les composés étudiés adoptent le même mode de liaison dans le site de liaison de la protéine 2WU4 [47], comme le montre la **figure. 3.16**.



**Figure 3.16 :** Superposition des conformations dockées des composés synthétisés sur le ligand cristallographique (bâtons verts).

Comme le montre la **figure.3.17** et le **tableau 3.32**, le composé **5j** a été impliqué dans des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes avec les résidus du site actif de la protéine **fep-mAChE**. L'atome d'azote de la partie indole était lié par une liaison hydrogène avec l'acide hydroxyle de la chaîne latérale de l'**Asp74** (3,1 Å), situé dans le site anionique. L'atome d'azote du cycle oxazole était impliqué dans deux liaisons hydrogène avec la protéine, l'une avec l'oxygène carbonyle du squelette protéique de **Trp86** (2,8 Å), situé dans

le site de liaison à la choline, et la seconde avec l'hydroxyle de **Ser125** (2,9 Å). De plus, l'atome d'oxygène de la partie oxazole était lié par hydrogène à l'amide carbonyle de **Gln71** (2,8 Å).



**Figure 3.17** : Vue de la conformation dockée du composé **5j** avec la protéine fep-mAChE.

**Tableau 3.32** : Interactions des liaisons hydrogène, résidus en interaction et énergies d'arrimage (kJ.mol<sup>-1</sup>), calculées pour les composés synthétisés avec la protéine fep-mAChE.

| Composé   | Liaison H  | Résidus en interaction (< 4 Å)   | Énergie d'arrimage |
|-----------|--|--|--------------------|
| <b>4e</b> | His447 (2,8 Å)<br>Asp74 (3,0 Å)<br>Tyr341 (3,1 Å)  | $\pi$ -alkyle : Ile294<br>$\pi$ - $\pi$ empilée : Tyr337<br>Van der Waals: Tyr72, Trp286, Tyr124, His447, Phe338, Tyr341, Leu76  | <b>-104,78</b>     |
| <b>4h</b> | His447 ( 2,9 Å)<br>Asp74 (3,1 Å)<br>Tyr341 (3,1 Å) | $\pi$ -alkyle : Tyr72<br>$\pi$ - $\pi$ empilée, $\pi$ - $\pi$ en forme T : Trp286, Tyr337<br>Van der Waals: Tyr124, Phe338, Leu76  | <b>-102,72</b>     |
| <b>4i</b> | His447 (3,1 Å)<br>Thr83 (2,7 Å)<br>Tyr337 (2,6 Å)  | $\pi$ -Sigma: Asp74<br>Halogène : Trp86<br>Van der Waals: Trp439, Tyr341, Gly121, Gly82, Leu130, Asn87, Gly126, Gln71, Ser125, Pro88, Tyr72, Val73, Tyr124, Ile294, Phe338 | -100,72            |
| <b>4a</b> | His447 (3,1 Å)<br>Tyr341 (2,6 Å)                   | $\pi$ -alkyl : Ile294<br>$\pi$ - $\pi$ empilée : Tyr337<br>Van der Waals: Tyr124, Gly121, Gln71, Ser125, Gly126, Leu130, Gly120, Ala127, Tyr133, Asp74, Phe338             | -96,08             |

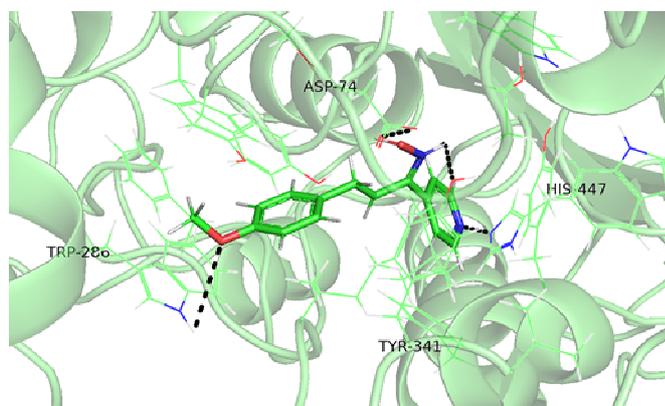
|           |   |   |                |
|-----------|---|---|----------------|
| <b>4b</b> | Tyr124 (2,0 Å,<br>3,1 Å)  | $\pi$ - $\pi$ empilée : Trp286<br>Van der Waals: Gln71, Val73, Asp74,<br>Pro88, Ser125, Asn87, Thr83, Trp86,<br>Tyr341, Ile294                              | -94,48         |
| <b>4c</b> | Asp74 (3,0 Å)<br>Tyr341 (2,8 Å)<br>His447 (2,6 Å)                 | $\pi$ - $\pi$ empilée, $\pi$ - $\pi$ en forme T : Tyr72,<br>Tyr124, Tyr337<br>Van der Waals: Trp286, Ile294, Thr83,<br>Trp86, Phe338, Glu202, Leu76, Gly448 | <b>-106,57</b> |
| <b>5j</b> | Asp74 (3,1 Å)<br>Gln71 (2,8 Å)<br>Ser125 (2,9 Å)<br>Trp86 (2,8 Å) | $\pi$ - $\pi$ empilée : Tyr72<br>$\pi$ - Alkyle: Tyr124<br>Van der Waals: Glu285, Trp286, Phe297,<br>Asn87, Pro88, Gly121, Gly126, Leu130,<br>Tyr133        | <b>-112,26</b> |

En outre, le composé **5j** a fait des interactions attractives et non covalentes  $\pi$ -alkyle et  $\pi$ - $\pi$  empilées entre l'atome de carbone de la fraction oxazole et le cycle phényle de la fraction indole de ce composé et les cycles phényles de **Tyr124** et **Tyr72**, respectivement. Le cycle phényle de **Trp86** est situé à 3,78 Å du cycle pyridine du composé **5j**, ce qui entraîne des interactions hydrophobes favorables. De plus, ce composé est entouré des résidus **Phe297**, **Trp286**, **Pro88** et **Leu130** conduisant à des interactions hydrophobes favorables, ce qui peut stabiliser le ligand dans le site actif et augmenter son affinité. Il est intéressant de noter que les résidus situés dans le site anionique périphérique à l'entrée de la gorge, à savoir **Tyr72**, **Asp74**, **Tyr124**, **Trp286** et **Tyr341**, constituent un site de liaison pour différents réactivateurs [48].

La visualisation des conformations dockées des composés **4e** et **4h** montre que seule la liaison hydrogène avec le résidu **Asp74** a été préservée par les deux composés (**Fig. 3.18**). En outre, les deux composés établissent des liaisons hydrogène avec l'azote de la chaîne latérale imidazole de **His447** et la chaîne latérale du groupe hydroxyle (OH) de **Tyr341** (2,8 Å et 2,9 Å, respectivement). Le composé **4i** avec deux groupes de chlore sur les positions ortho du cycle phényle ne conserve que la liaison hydrogène avec l'atome d'azote de la partie imidazole du résidu **His447** (3,1 Å). En effet, ce composé est impliqué dans deux liaisons hydrogène avec la chaîne latérale hydroxyle des résidus **Thr83** et **Tyr337** (2,7 Å et 2,6 Å).

Le remplacement du cycle phényle par un cycle hétérocyclique thiophényle, comme dans les composés **4a** et **4b**, conduit à une diminution des énergies d'arrimage. Ceci est dû à la perte de l'interaction par liaison hydrogène avec le résidu **Asp74** (comme dans le composé **4a**) et **His447** et **Tyr341** (composé **4b**). En revanche, le composé **4c** préserve toutes les liaisons

hydrogène et l'interaction non covalente  $\pi$ - $\pi$  empilée observée entre le composé **4e** et la protéine étudiée.



**Figure 3.18** : Vue de la conformation dockée du composé **4e** avec la protéine fep-mAChE.

De même, les cycles aromatiques des résidus **Ile294**, **Tyr72**, **Tyr124**, **Tyr337** et **Trp286** sont impliqués dans des interactions attractives et non covalentes,  $\pi$ -alkyle,  $\pi$ - $\pi$  empilée,  $\pi$ - $\pi$  en forme de T avec les composés **4e**, **4h**, **4c** et **5j**. En outre, les interactions attractives et non covalentes mentionnées ci-dessus ont été converties en interaction de Van der Waals dans la conformation dockée du composé **4i**. En outre, ce composé était impliqué dans une interaction  $\pi$ -sigma et halogène avec les résidus **asp74** et **Trp86**, ce qui peut améliorer la liaison du composé dans le site actif de la protéine. D'autre part, les composés **4a** et **4b** perdent toutes les interactions non covalentes et attractives observées dans les conformations dockées des autres composés et sont simplement impliqués dans des interactions de Van der Waals.

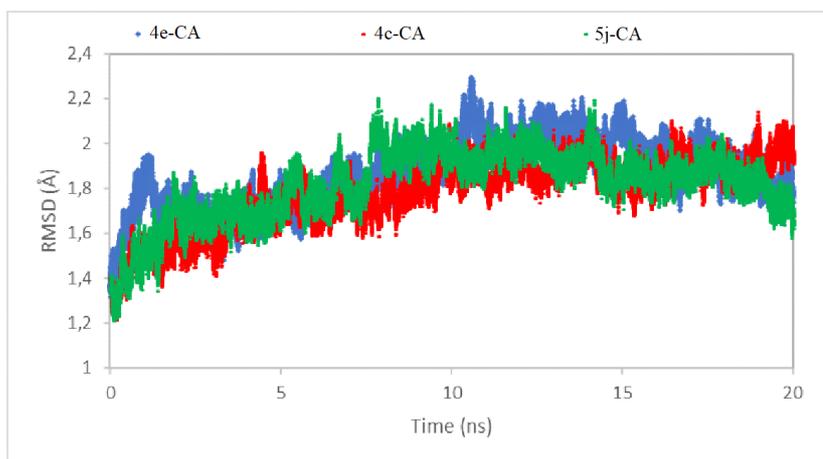
Ainsi, les résultats du docking ont révélé que les composés synthétisés étaient impliqués dans un grand nombre d'interactions favorables avec les résidus du site actif de la protéine **fep-mAChE**. Cependant, pour confirmer la stabilité des composés synthétisés dans le site actif de la protéine **fep-mAChE**, nous avons soumis toutes les conformations d'arrimage avec de faibles énergies d'arrimage à une simulation de dynamique moléculaire.

## VII. Simulations de dynamique moléculaire

Pour confirmer le mode de liaison et la stabilité des ligands dockés **4e**, **4c** et **5j** avec la protéine **fep-mAChE**, des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées. La stabilité des systèmes étudiés a été évaluée sur la base du changement de la RMSD des

ligands dans le site actif de la protéine, de la RMSD des carbones  $\alpha$  du squelette de la protéine et des énergies d'interaction de Van der Waals entre les composés et la protéine sélectionnée.

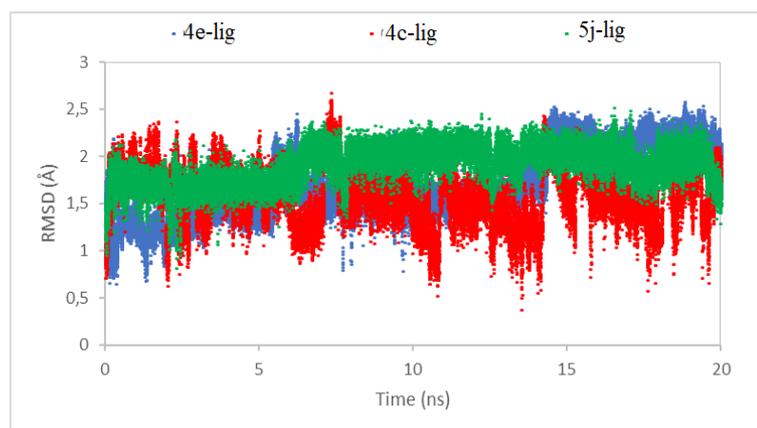
Les tracés RMSD calculés des atomes  $C\alpha$  du squelette de la protéine des systèmes étudiés (composé **4e**-fep-mAChE, composé **4c**-fep-mAChE et composé **5j**-fep-mAChE), à travers les 20 ns de dynamique moléculaire sont rapportés dans **figure. 3.19**.



**Figure 3.19** : Tracés RMSD des atomes  $C\alpha$  du squelette des complexes composés **4e**-fep-mAChE (bleu), composé **4c**-fep-mAChE (rouge) et composé **5j**-fep-mAChE (vert).

La **figure. 3.19** montre que le squelette  $C\alpha$  des complexes sélectionnés présente de petites fluctuations jusqu'à 8 ns, où les trois systèmes atteignent la stabilité à environ 1,8 Å de RMSD jusqu'à la fin de la simulation. Ces résultats indiquent que les trois complexes sont stables tout au long des 20 ns de simulations de dynamique moléculaire.

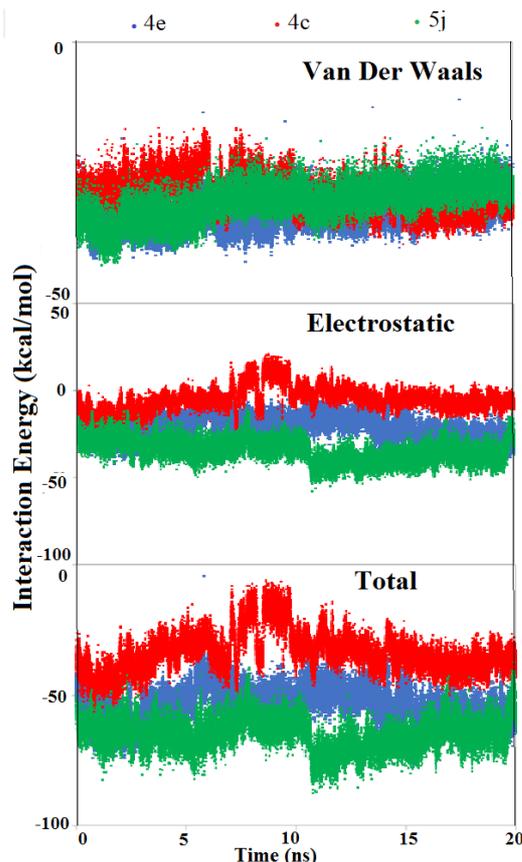
Les tracés RMSD calculés des trois ligands étudiés **4e**, **4c** et **5j**, dans le site de liaison de la protéine **fep-mAChE**, à travers les 20 ns de dynamique moléculaire sont rapportés dans **figure. 3.20**.



**Figure 3.20 :** Graphiques RMSD des composés étudiés **4e** (bleu), **4c** (rouge) et **5j** (vert) pendant les 20 ns de simulations de dynamique moléculaire.

L'analyse des résultats montre quelques différences entre les trois courbes indiquant certains mouvements des composés étudiés dans le site actif de la protéine **fep-mAChE**. Ainsi, la variation des valeurs RMSD des composés **4e** et **4c** allant de 0,5 Å à 2,3 Å, montre une flexibilité des ligands dans le site actif de la protéine **fep-mAChE** [46]. D'autre part, la forme de la courbe RMSD prédite pour le composé **5j** s'approche d'une ligne horizontale pendant toute la durée des simulations, avec une valeur moyenne de RMSD de 1,8 Å, indiquant que le composé atteint l'équilibre et que son changement de conformation est très léger.

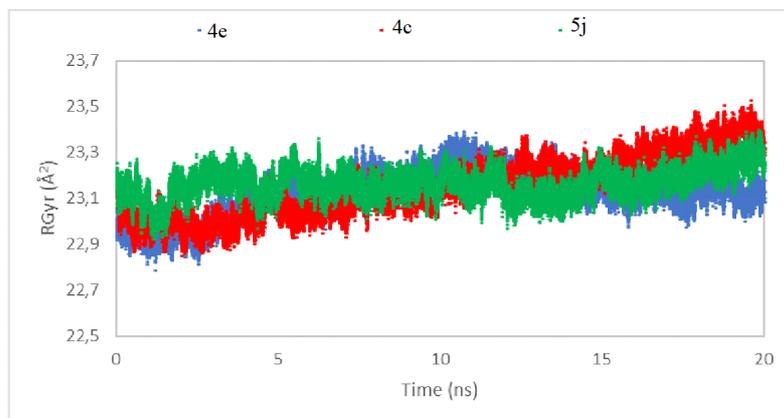
Afin de révéler plus de détails mécanistiques, nous avons calculé les énergies d'interaction entre les trois composés dynamisés et la protéine **fep-mAChE** et les avons décomposées en composantes Van der Waals (VDW) et électrostatiques comme le montre la **figure. 3.21**.



**Figure 3.21** : Tracé de l'énergie d'interaction entre **fep-mAChE** et les composés : **4e** (bleu), **4c** (rouge) et **5j** (vert) pendant les 20 ns de la simulation de dynamique moléculaire.

La **figure. 3.21** montre que les énergies VdW calculées pour les trois composés étudiés sont similaires avec quelques fluctuations dans les 10 premières ns avec le composé complexe **4c** et la protéine **fep-mAChE**. Sinon, la contribution électrostatique calculée pour le composé **5j** est importante. Par conséquent, la grande contribution électrostatique est principalement due aux interactions électrostatiques à longue portée plutôt qu'à la liaison hydrogène. En effet, la forme de la courbe électrostatique de ce composé s'approche d'une ligne horizontale à -34 kcal/mol dans les 12 premières ns de temps de simulation, où nous voyons une légère diminution. Ensuite, à 16 ns de simulation, le composé complexe **5j**- **fep-mAChE** protéine reprend la conformation de départ jusqu'à la fin du temps de simulation, où la contribution électrostatique s'approche de la valeur de -34 kcal/mol. D'autre part, les énergies d'interaction VdW calculées pour les composés **4e** et **4c** sont plus grandes que celles de l'interaction électrostatique. De plus, les valeurs des énergies d'interaction électrostatiques calculées pour ce composé montrent très peu de variation sous tous les temps de simulation et approchent la valeur de -20 kcal/mol. Par ailleurs, quelques fluctuations mineures ont été

observées dans la courbe de contribution électrostatique calculée pour le composé **4c**, entre 7 ns et 10 ns de temps de simulation.



**Figure 3.22 :** Courbes de rayon de giration prédites pour les trois complexes étudiés : composé **4e**- fep-mAChE (bleu), composé **4c**- fep-mAChE (rouge) et composé **5j**-fep-mAChE (vert).

Pour juger la structure secondaire du **fep-mAChE**, nous suivons l'évolution temporelle du rayon de giration (rGyr) pendant la durée de la simulation MD **figure. 3.22**. Les valeurs calculées de rGyr pour les complexes : composé **4e**-fep-mAChE, composé **4c**-fep-mAChE et composé **5j**-fep-mAChE présentent des fluctuations de moindre intensité, révélant que les systèmes composés des composés synthétisés **4e**, **4c**, **5j** et de la protéine **fep-mAChE** sont disposés selon une conformation plus compacte.

Ainsi, les résultats du docking moléculaire et de la dynamique moléculaire ont révélé que les composés synthétisés, **4e**, **4c** et **5j**, étaient impliqués dans un grand nombre d'interactions favorables avec les résidus du site actif de la protéine **fep-mAChE**, ce qui peut stabiliser les ligands dans le site actif et augmenter leurs affinités.

## **VIII. Conclusion**

Dans ce travail nous avons démontré que contrairement aux chalcone-oximes, la majorité des chalcones dérivées de la 4-acétylpyridine synthétisées ont une bonne activité antimicrobienne envers les souches testées. Les nouvelles oximes synthétisées présentent une meilleure activité antioxydante que les chalcones correspondantes bien qu'elle reste très faible par rapport à l'acide ascorbique pris comme référence. Nous avons observé que la cyclisation de l'oxime conduit à l'amélioration de l'activité antioxydante pour le composé **5j**. Les résultats du docking moléculaire ont montré que les nouveaux composés (**4c, e, h, 5j**) synthétisés peuvent agir de manière très intéressante comme réactivateurs de l'acétylcholinestérase de *Mus musculus* inhibé par l'insecticide fenamiphos (fep-mAChE).

## I. Activité antimicrobienne *in-vitro* des composés synthétisés

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

Les composés ont été testés *in-vitro* contre des micro-organismes par la méthode de diffusion des disques [39] vis-à-vis des germes *S. aureus* (ATCC 25923), bactérie à Gram positif, *E. Coli* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), bactéries à Gram négatif et les espèces fongiques *A. niger*, *C. albicans* (ATCC 7102). Les milieux Mueller Hinton agar et Sabouraud dextrose agar ont été utilisés pour l'activité antibactérienne et antifongique respectivement.

La concentration de 5,12 mg/mL des composés testés a été préparée dans du DMSO et 20 µL de chaque échantillon ont été prélevés et immergés dans des disques de papier de 6,0 mm de diamètre, les disques ont été placés sur des plaques préalablementensemencées. Les boîtes de Pétri inoculées ont été préparées en utilisant la suspension de spores de 10<sup>6</sup> cfu/mL (colony forming unit /mL) préalablement préparée dans de l'eau physiologique stérile à 0,9 %, avec une densité optique de 0,08 lue à 625 nm. Pour l'activité antibactérienne, le *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* ont été incubés à 35-37°C pendant 24-48 h. Tandis que pour les tests antifongiques, les plaques ont été inoculées avec le champignon filamenteux *A. niger* et incubées à 25°C pendant six jours, la levure, *C. albicans* a été incubée à 37°C pendant 24-48 h.

La zone claire autour de chaque disque a été mesurée en mm. Les disques standards de Rifampicine, de Cotrimoxazole, de Colistine (agents antibactériens) et de Fluconazole (agent antifongique) ont été utilisés comme témoins positifs. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata et les données représentent la valeur moyenne.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été mesurées pour les composés qui présentaient des zones d'inhibition significatives, en utilisant la technique de la double dilution en série. Les composés synthétisés ont été préparés dans une gamme de concentrations de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 et 3,91 µg/mL. Un test de sensibilité en microdilution a été effectué dans de la gélose Sabouraud dextrose pour l'activité antifongique.

La CMI est définie comme la concentration la plus faible qui n'a montré aucune croissance microbienne.

## II. Évaluation du piégeage des radicaux libres des chalcones (3a-j), des chalcone-oximes (4a-c, e, h, i) et de l'isoxazoline (5j)

La solution mère de DPPH<sup>\*</sup> a été préparée en dissolvant 4 mg de DPPH<sup>\*</sup> dans 100 mL d'éthanol. Les composés **3**, **4** et **5j** ont été dissous dans du DMSO pour obtenir une solution de 10<sup>-1</sup> M. Les composés à tester ont été dilués davantage avec du DMSO pour obtenir des concentrations finales de 0,05, 0,025 et 0,0125 mol/L pour tous les composés, tandis que l'étalon (acide ascorbique, AA) a été dilué à des solutions de 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125, 0,00625, 0,003125, 0,0015625 mol/L, respectivement. Les tubes ont été chargés avec 40 µL de l'échantillon testé et ensuite avec 2 mL de solution DPPH<sup>\*</sup>, tous les essais étant effectués en triplicata. Les tubes de contrôle négatif ont été remplis avec 40 µL de DMSO et 2 mL de solution de DPPH. Après agitation, les mélanges ont été incubés à température ambiante pendant 1 h dans l'obscurité à 25 °C, puis l'absorbance de chaque échantillon a été enregistrée à 517 nm.

## III. Prédiction *in silico* de la barrière hémato-encéphalique

Les composés oximes sont connus pour être les antidotes utilisés contre les agents neurotoxiques [49] en traversant la barrière hémato-encéphalique. Nous avons donc utilisé le serveur web SwissADME [50] pour estimer le pouvoir de pénétration de la barrière hémato-encéphalique de nos composés synthétisés. En outre, les composés étudiés ont été soumis à une étude des propriétés de similitude des médicaments en utilisant la règle des cinq de Lipinski.

## IV. Études de docking moléculaire

### IV.1. Préparation des données d'entrée

Il a été signalé précédemment que les insecticides organophosphorés et les agents neurotoxiques inhibent l'enzyme acétylcholinestérase en se liant de manière covalente au résidu sérine catalytique de l'enzyme. Le rôle des réactivateurs à base d'oxime est de restaurer l'activité enzymatique inhibée par les organophosphorés en clivant le conjugué phosphoré [48]. Ces composés agissent comme des agonistes de l'acétylcholinestérase. Nous avons souhaité évaluer le potentiel de nos propres oximes à agir de la sorte. La manière habituelle d'évaluer la possibilité pour une oxime donnée de déplacer un inhibiteur organophosphoré du site actif est un calcul *in silico* et des simulations de dynamique moléculaire. Ainsi, les structures

crystallines de l'acétylcholinestérase de *Mus musculus* inhibée par l'insecticide fenamiphos (**fep-mAChE**) avec PDB ID 2WU4 et une résolution de 2,40 Å ont été téléchargées de la banque de données des protéines RCSB et ont été utilisées pour l'étude de docking moléculaire. Ainsi, la protéine a été préparée en supprimant les cofacteurs du substrat, les molécules d'eau cristallographiques et le ligand Ortho-7 (HBP) co-cristallisé. Un seul monomère a été sélectionné et le site actif de la protéine a été identifié en sélectionnant tous les résidus situés à 6 Å du centre de la pose du cristal. Ainsi, les résidus **Trp86**, **Tyr341**, **His447**, **Phe338**, **Ile294**, **Asp74**, **Trp286**, **Tyr72**, **Glu285**, **Phe297** et **Tyr124** ont été traités comme des résidus catalytiques lors des simulations de docking [51]. D'autre part, les structures 2D des composés synthétisés et du ligand expérimental HBP ont été dessinées à l'aide du logiciel MarvinSketch [52] et ont été utilisées comme ligands flexibles pendant la simulation de docking moléculaire.

## IV.2. Procédure d'amarrage

Tous les composés synthétisés ont été arrimés au site actif de la protéine **fep-mAChE** sélectionnée à l'aide du programme iGEMDOCK [53]. Ainsi, une carte de grille avec 52×50×54 points autour de chacun des domaines modélisés a été utilisée avec un espacement des points de grille de 0,375 Å et le centre de la boîte de grille de (34,03, 23,36, 8,67). L'algorithme génétique lamarckien (LGA) a été utilisé dans la procédure d'accostage et 50 exécutions indépendantes avec 2500000 évaluations d'énergie et un nombre maximum de générations de 30000. La pose d'arrimage résultante de chaque ligand arrimé à la protéine a été analysée pour ses interactions de liaison hydrogène avec le récepteur et a été visualisée à l'aide des logiciels AutoDoTools [54] et Accelrys Discovery Studio Visualizer version 4,1 [55].

## V. Études de dynamique moléculaire

Afin d'évaluer la stabilité des composés étudiés, les conformations arrimées présentant de faibles énergies d'arrimage ont été soumises à 20 ns de simulations de dynamique moléculaire [56]. Ainsi, le logiciel Nano Molecular Dynamics NAMD 2,12 [57] avec le champ de force CHARMM 36 a été utilisé pendant les simulations MD. Les topologies et les paramètres des ligands ont été générés à l'aide du serveur web CHARMM General Force Field (CGenFF). Tous les complexes ont été solvatés dans une boîte à eau cubique TIP3P de longueur d'arête 7 Å, puis neutralisés et la concentration de NaCl a été fixée à la valeur physiologique de 0,15 mol/L [46]. Les interactions entre les contributions longues et les contributions courtes ont été modélisées à l'aide de la méthode Ewald à maillage de particules

(PME) <sup>[58]</sup> avec une coupure non liée de 12 Å et un espacement de grille de 1 Å. Des conditions aux limites périodiques (PBC) <sup>[59]</sup> ont été utilisées et la température et la pression ont été maintenues constantes en utilisant respectivement le thermostat de Langevin (310 K) et le barostat de Langevin (1 atm). Ensuite, les trois systèmes ont été soumis à 7000 étapes de minimisation de l'énergie par descente la plus raide afin d'éliminer les chevauchements atomiques ou les géométries inappropriées. Après cela, les systèmes étudiés ont été équilibrés pendant 100 ps sous le nombre constant de particules, la pression et la température (NPT). Enfin, les systèmes obtenus ont été soumis à 20 ns de dynamique moléculaire avec des pas de temps de 2 fs. Les résultats obtenus ont été visualisés et analysés à l'aide du logiciel VMD <sup>[60]</sup>.

# **Références bibliographiques**

- [<sup>1</sup>] Y. Zhang, J. Wu, S. Ying, G. Chen, B. Wu, T. Xu, Z. Liu, X. Liu, L. Huang, X. Shan, Y. Dai, G. Liang, Discovery of new MD2 inhibitor from chalcone derivatives with anti-inflammatory effects in LPS-induced acute lung injury, *sci. Rep.*, 6 (2016) 25130. <https://doi.org/10.1038/srep25130>.
- [<sup>2</sup>] Y. H. Chen, W. H. Wang, Y.H. Wang, Z. Y. Lin, C. C. Wen, C. Y. Chern, Evaluation of the anti-inflammatory effect of chalcone and chalcone analogues in zebrafish model, *Molecules*, 18 (2013) 2052-2060. <https://doi.org/10.3390/molecules18022052>.
- [<sup>3</sup>] S. A. Lahsasni, F. H. A. Korbi, N. A. Aljaber, Synthesis, characterization and evaluation of antioxidant activities of some novel chalcones analogues, *Chem. Cent. J.*, 8 32 (2014). <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-32>.
- [<sup>4</sup>] H. Iqbal, V. Prabhakar, A. Sangith, B. Chandrika, R. Balasubramanian, Synthesis, anti-inflammatory and antioxidant activity of ring-A-monosubstituted chalcone derivatives, *Med. Chem. Res.*, 23 (2014) 4383-4394. <https://doi.org/10.1007/s00044-014-1007-z>.
- [<sup>5</sup>] U. Sankappa Rai, A.M. Isloor, P. Shetty, K. S. R. Pai, H.K. Fun, Synthesis and *in vitro* biological evaluation of new pyrazole chalcones and heterocyclic diamides as potential anticancer agents, *Arab. J. Chem.*, 8 (2015) 317-321. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.01.018>.
- [<sup>6</sup>] D. K. Mahapatra, S. K. Bharti, V. Asati, Anticancer Chalcones: structural and molecular target perspectives, *Eur. J. Med. Chem.*, 98 (2015) 69-114. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.05.004>.
- [<sup>7</sup>] C. Hsieh, T. Hsieh, M. El-shazly, D. Chuang, Y. Tsai, C. Yen, S. Wu, Y. Wu, F. Chang, Synthesis of chalcone derivatives as potential anti-diabetic agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22 (2012) 3912-3915. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.108>.
- [<sup>8</sup>] X. Fang, B. Yang, Z. Cheng, D. Zhang, M. Yang, Synthesis and antimicrobial activity of novel chalcone derivatives, *Res. Chem. Intermed.*, (2014) 1715-1725. <https://doi.org/10.1007/s11164-013-1076-5>.
- [<sup>9</sup>] H. Suwito, A. N. Kristanti, N. N. T. Puspaningsih, Chalcones: synthesis structure diversity and pharmacological aspects, *J. Chem. Pharmaceut. Res.*, 6 5 (2014) 1076-1088.
- [<sup>10</sup>] G. G. Mandawad, R. D. Kamble, S. V. Hese, R. A. More, R. N. Gacche, K. M. Kodam, B. S. Dawane, An efficient synthesis of isoxazoline libraries of thiophene analogs and its antimycobacterial investigation, *Med. Chem. Res.*, 23 (2014) 4455-4463. <https://doi.org/10.1007/s00044-014-1016-y>.
- [<sup>11</sup>] S. N. Lopez, M. N. Castelli, S.A. Zacchino, J. N. Dominguez, G. Lobo, J. Charris- Charris, J. C. G. Cortes, J. C. Ribas, C. Devia, A.M. Rodriguez, R.D. Enriz, In viro antifungal evaluation and structure- activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall, *Bioorg. Med. Chem.*, 9 (2001) 1999-2013. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00116-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00116-X).
- [<sup>12</sup>] B. Baviskar, S. Patel, B. Baviskar, S.S. Khadabadi. Design and synthesis of some novel chalcone as potent antimicrobial agent, *Asian J. Res. Chem.*, 1 (2008) 67-69.
- [<sup>13</sup>] O. Nerya, R. Musa, S. Khatib, S. Tamir, J. Vaya. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors : the effect of hydroxyl positions and numbers, *Phytochemistry.*, 65 (2004) 1389-1395. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.016>.

- [14] J. Lia, C. Chen, F. Wu, L. Zhao, Microwave-assisted synthesis and tyrosinase inhibitory activity of chalcone derivatives, *Chem. Biol. Drug. Des.*, 82 (2013) 39-47. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12126>.
- [15] L. Ya-Ting, F. Tsorng-Harn, C. Hui-Min, C. Chao-Yuan, W. Yun-Hsin, C. Ching-Yuh, C. Yau- Hung. Toxicity assessments of chalcone and some synthetic chalcone analogues in a zebrafish model, *Molecules*, 19 (2014) 641-650. <https://doi.org/10.3390/molecules19010641>.
- [16] M. V. Jyothi, Y. Rajendra Prasad, P. Venkatesh, M. Sureshreddy, Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Novel Chalcones of 3-Acetyl Pyridine and their Pyrimidine Derivatives, *Chem. Sci. Trans.*, 1 3 (2012) 716-722.
- [17] R. S. Najem, Synthesis of some pyrimidine derivatives from-4- acetyl pyridine, *tikrit. J.of Pure. Sci.*, 23 3 (2018).
- [18] A. Agarwal, K. Srivastava, S. K. Puri, P. M. S. Chauhan, Synthesis of 2,4,6-trisubstituted pyrimidines as antimalarial agents, *Bioorg. Med. Chem.*, 13 (2005) 4645–4650. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.061>.
- [19] M. N. Peerzada, P. Khan, K. Ahmad, Md. I. Hassan, A. Azam, Synthesis, characterization and biological evaluation of tertiary sulfonamide derivatives of pyridyl-indole based heteroaryl chalcone as potential carbonic anhydrase IX inhibitors and anticancer agents, *Eur. J. of Med. Chem.*, 155 (2018) 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.034>.
- [20] A. Atilgan, Ş. Yurdakul, Y. Erdogdu, M. T. Güllüoğlu, DFT simulation, quantum chemical electronic structure, spectroscopic and structure-activity investigations of 4-acetylpyridine, *J. Mol. Struct.*, 1161 (2018) 55-65. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.01.080>.
- [21] N. Sunduru, A. Agarwal, S. B. Katiyar, N. N. Goyal, S. Gupta, P. M. S. Chauhan, Synthesis of 2,4,6-trisubstituted pyrimidine and triazine heterocycles as antileishmanial agents, *Bioorg. Med. Chem.*, 14 (2006) 7706–7715. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.08.009>.
- [22] S. Alam, R. Panda, M. Kachroo, Anti-tubercular, antioxidant an *in vitro* anti-inflammatory activity of some newly synthesized chalcones, *Ind. J. of Chem.*, 53B (2014) 440-443.
- [23] M. Kachroo, R. Panda, Y. Yadav, Synthesis and biological activities of some new pyrimidine derivatives from chalcones, *Der. Pharma. Chem.*, 6 2 (2014) 352-359.
- [24] K. Bush, P. Courvalin, G. Dantas, J. Davies, B. Eisenstein, P. Huovinen, G. A. Jacoby, R. Kishony, B. N. Kreiswirth, E. Kutter, S. A. Lerner, S. Levy, K. Lewis, O. Lomovskaya, J. H. Miller, S. Mobashery, L. J. Piddock, S. Projan, C.M. Thomas, A. Tomasz, P. M. Tulkens, T. R. Walsh, J. D. Watson, J. Witkowski, W. Witte, G. Wright, P. Yeh, H. I. Zgurskaya, Tackling antibiotic resistance, *Nat. Rev. Microbiol.*, 9 (2011) 894–896. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2693>.
- [25] S. B. Levy, B. Marshall, Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, *Nat. Med.*, 10 (2004) S122–S129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>.
- [26] C. Ghosh, J. Haldar, Membrane-active small molecules: designs inspired by antimicrobial peptides, *Chem. Med. Chem.*, 10 (2015) 1606–1624. <https://doi: 10.1002/cmdc.201500299>.
- [27] S. M. Lim, S. A. R. Webb, Nosocomial bacterial infections in intensive care units. I: organisms and mechanisms of antibiotic resistance, *Anaesthesia*, 60 (2005) 887-902.

- [28] H. Grundmann, M. Aires-de-Sousa, J. Boyce, E. Tiemersma, Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat, *Lancet*, 368 (2006) 874–885. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68853-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68853-3).
- [29] H. W. Boucher, G. H. Talbot, J. S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, J. Bartlett, Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America, *Clin. Infec. Dis.*, 48 (2009) 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>.
- [30] T. B. Emran, M.A. Rahman, M.M.N. Uddin, R. Dash, M.F. Hossen, M. Mohiuddin, M. R. Alam, Molecular docking and inhibition studies on the interactions of *Bacopa monnieri*'s potent phytochemicals against pathogenic *Staphylococcus aureus*, *DARU. J. Pharma. Sci.*, 23 (2015) 26. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0106-9>.
- [31] S. Y. C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, V. G. Fowler Jr, *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management, *Clin. Microbio. Rev.*, 28 3 (2015) 603-661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>.
- [32] B. J. Berger, M. H. Knodel, Pyrimidium Oxime Compounds as Antimicrobial Agents, DRDC Suffield TM 2007-176, Defence R&D Canada.
- [33] T. Sharma, R. Kumar, S. C. Sahoo, J. Sindhu, J. Singh, B. Singh, S. K. Mehta, A. Umar, T. S. Saini, V. Kumar, R. Kataria, Synthesis, structural and pharmacological exploration of 2-(3, 5-dimethyl-1Hpyrazol-1-yl)-acetophenone oximes and their silver complexes, *Polyhedron*, 195 (2020) 114972. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2020.114972>.
- [34] I. Cabezudo, I. A. Ramallo, V. L. Alonso, R. L.E. Furlan, Effect directed synthesis of a new tyrosinase inhibitor with anti-browning activity, *F. Chem.*, 341 1 (2021) 128232.
- [35] S. K. Radhakrishnan, R. G. Shimmon, C. Conn, A. T. Baker, Evaluation of Novel Chalcone Oximes as Inhibitors of Tyrosinase and Melanin Formation in B16 Cells, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 349 (2016) 20–29. <https://doi.org/10.1002/ardp.201500298>.
- [36] A. D. Latif, T. Gonda, M. Vágvölgyi, N. Kúsz, Á. Kulmány, I. Ocsovszki, Z. P. Zomborszki, I. Zupkó, A. Hunyadi, Synthesis and *In Vitro* Antitumor Activity of Naringenin Oxime and Oxime Ether Derivatives, *Int. J. Mol. Sci.*, 20 (2019) 2184.
- [37] J. M. Oh, T. M. Rangarajan, R. Chaudhary, R. P. Singh, M. Singh, R. P. Singh, A. R. Tondo, N. Gambacorta, O. Nicolotti, B. Mathew, H. Kim, Novel Class of Chalcone Oxime Ethers as Potent Monoamine Oxidase-B and Acetylcholinesterase Inhibitors, *Molecules*, 25 (2020) 2356. <https://doi:10.3390/molecules25102356>.
- [38] Q. Zhang, W. Duan, S. Zhao, J. He, F. Lei, Synthesis, Antifungal Activity and 3D-QSAR Study of Novel (*E*)-Longifolene-Derived Tetralone Oxime Ethers, *Chem. Select.*, 6 18 (2021) 4515-4520. <https://doi.org/10.1002/slct.202100898>.
- [39] A. W. Bauer, C. E. Roberts, W. M. Kirby. Single disc versus multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing, *Antibiot. Annu.*, 7 (1959-1960) 574-580.
- [40] M. Xu, P. Wu, F. Shen, J. Ji, K. P. Rakesh, Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development, *Bioorg. Chem.*, 91 (2019) 103-133. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103133>.

- [41] M. K. Vekariya, D. B. Patel, P. A. Pandya, R. H. Vekariya, P.U. Shah, D. P. Rajani, N.K. Shah, Novel *N*-thioamide analogues of Pyrazolylpyrimidine based Piperazine: Design, Synthesis, Characterization, *In-silico* molecular docking study and Biological evaluation, *J. of Mol. Struc.*, 1175 (2019) 551-565. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.08.018>.
- [42] M. Mallié, J. M. Bastide, A. Blancard, A. Bonnin, S. Bretagne, M. Cambon, J. Chandener, V. Chauveau, B. Couprie, A. Datry, M. Feuilhade, R. Grillot, C. Guiguen, V. Lavarde, V. Letscher, M. D. Linas, A. Michel, O. Morin, A. Wade, *In vitro* susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* spp. to voriconazole and other antifungal agents using Etest®: results of a French multicentre study, *Int. J. of Antimi., Agen.* 25 4 (2005) 321-328. <https://doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.11.010>.
- [43] K. M. Moghaddam, M. Arfan, J. Rafique, S. Rezaee, P. J. Fesharaki, A. R. Gohari, A. R. Shahverdi, The Antifungal Activity of *Sarcococca saligna* Ethanol Extract and its Combination Effect with Fluconazole against Different Resistant *Aspergillus* Species, *Appl Biochem Biotechnol.*, 162 (2010) 127–133. <https://doi 10.1007/s12010-009-8737-2>.
- [44] L. L. Mensor, F. S. Menezes, G. G. Leit~ao, A. S. Reis, C. T.dos Santos , S. C. Coube, S. G. Leitão, Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, *Phytother. Res.*, 15 (2001) 127-130. <https://doi.org/10.1002/ptr.687>.
- [45] J. S. Lee, H. J. Kim, H. Park, Y. S. Lee, New Diarylheptanoids from the Stems of *Carpinus cordata*, *J. Nat. Prod.*, 65 (2002) 1367-1370. <https://doi.org/10.1021/np020048l>.
- [46] S. Hammad, S. Bouaziz-Terrachet, R. Meghnem, D. Meziane, Pharmacophore Development, Drug-Likeness Analysis, Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations for New CK2 Inhibitors Identification, *J.of. Mol. Model.*, 26 160 (2020) 1-17. <https://doi : 10.1007/s00894-020-04408-2>.
- [47] S. Bouaziz-Terrachet, R. Terrachet, S. Tairi-Kellou, Receptor and ligand-based 3D-QSAR study on a series of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Med. Chem. Res.*, 22 4 (2013) 1529–1537. <https://doi.org/10.1007/s00044-0120174-z>.
- [48] A. Hornberg, E. Artursson, R. Warne, Y.-P. Pang, F. Ekstrom, Crystal Structures of Oxime-Bound Fenamiphos-Acetylcholinesterases: Reactivation Involving Flipping of the His447 Ring to Form a Reactive Glu334-His447-Oxime Triad, *Biochem. Pharmacol.*, 79 3 (2010) 507-515. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.08.027>.
- [49] F. R. de Souza, D. R. Garcia, T. Cuya, A.S. Pimentel, A. da Silva Gonçalves, R. Bicca de Alencastro, T. C. C. França, Molecular Modeling Study of Uncharged Oximes Compared to HI-6 and 2-PAM Inside Human AChE Sarin and VX Conjugates, *ACS. Omega.*, 5 9 (2020) 4490-4500. <https://doi: 10.1021/acsomega.9b03737>.
- [50] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.*, 7 (2017) 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.

- [51] S. Bouaziz-Terrachet, A. Toumi-Maouche, B. Maouche, S. Taïri-Kellou, Modeling the binding modes of stilbene analogs to cyclooxygenase-2: a molecular docking study, *J. Mol. Model.*, 16 12 (2010) 1919–1929. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0679-7>.
- [52] Marvin Sketch program, Chemaxon, <http://www.chemaxon.com>, 2009.
- [53] H. Kai-Cheng, C. Yen-Fu, L. Shen-Rong, Y. Jinn-Moon, iGEMDOCK: a graphical environment of enhancing GEMDOCK using pharmacological interactions and post-screening analysis, *BMC. Bioinf.*, 12 (2011) 1–11. <https://doi:10.1186/1471-2105-12-S1-S33>.
- [54] M. F. Sanner, Python: a programming language for software integration and development, *J. Mol. Graphics. Mod.*, 17 (1999) 57–61.
- [55] <http://www.accelrys.com>
- [56] K. Ould Lamara, M. Makhloufi-Chebli, A. Benazzouz-Touami, S. Terrachet-Bouaziz, Nejla Hamdi, A.M.S. Silva, J. B. Behr, Selectivity control in the reaction between 2-hydroxyarylaldehydes and 4-hydroxycoumarin. Antioxidant activities and computational studies of the formed products, *J. of. Mol. Struc.*, 1231 (2021) 129936. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.129936>.
- [57] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten, Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.*, 26 16 (2005) 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
- [58] U. Essman, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.*, 103 (1995) 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- [59] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.*, 79 (1983) 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- [60] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamic, *J. Mol. Graph.*, 14 33 (1996) 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).

# Conclusion générale

## Conclusion générale

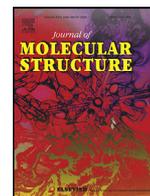
- ❖ Les premiers résultats entrepris dans le cadre de cette thèse sont très encourageants. Il a été montré que la synthèse des coumarines et *bis*-coumarines ont révélé une forte dépendance vis-à-vis des paramètres expérimentaux explorés.
- D'après les résultats de l'activité antioxydante *in-vitro* des composés préparés **4a-g** et **5a-c, 5f-g**, on peut souligner que le dérivé **5b** portant un groupe catéchol présente une activité plus élevée à faible concentration.
- Les études de docking et de dynamique moléculaire ont permis de mieux comprendre la stabilité moléculaire des composés synthétisés **4a** et **5a**, elles ont également montré que ces composés se lient au site de liaison à l'ATP du p38 MAPK, de la même manière que les inhibiteurs polyaromatiques puissants connus.

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

- ❖ A l'inverse des chalcone-oximes, la majorité des chalcones dérivées de la 4-acétylpyridine synthétisées ont une bonne activité antimicrobienne envers les souches testées. Les nouvelles oximes synthétisées présentent une meilleure activité antioxydante que les chalcones correspondantes bien qu'elle reste très faible par rapport à l'acide ascorbique pris comme référence.
- Nous avons observé que la cyclisation de l'oxime conduit à l'amélioration de l'activité antioxydante pour le composé **5j**.
- Les résultats de docking et de simulations moléculaire ont montré que les nouveaux composés (**4c, 4e, 5j**) synthétisés peuvent agir de manière très intéressante comme réactivateurs de l'acétylcholinestérase de *Mus musculus* inhibé par l'insecticide fenamiphos (fep-mAChE).

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

# Annexe



# Selectivity control in the reaction between 2-hydroxyarylaldehydes and 4-hydroxycoumarin. Antioxidant activities and computational studies of the formed products



Kamilia Ould Lamara<sup>a</sup>, Malika Makhloufi-Chebli<sup>a</sup>, Amina Benazzouz-Touami<sup>a</sup>, Souhila Terrachet-Bouaziz<sup>b,c</sup>, Nejla Hamdi<sup>d,e</sup>, Artur M.S. Silva<sup>f</sup>, Jean-Bernard Behr<sup>g,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Physique et Chimie des Matériaux LPCM, Faculté des Sciences, Université Mouloud Mammeri, 15000 Tizi Ouzou, Algeria

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University Mohamed Bouguerra, Boumerdes, Algeria

<sup>c</sup> Laboratoire de Physico-Chimie Théorique et de Chimie Informatique, Faculté de Chimie, USTHB, BP 32 El Alia, 16111 Bab-Ezzouar, Algiers, Algeria

<sup>d</sup> Centre de Recherche Nucléaire de Draria (CRND), BP 43 Sebala, Draria, Algeria

<sup>e</sup> Département du Génie de l'environnement, Ecole Nationale Polytechnique, 10 Avenue des Frères Ouadek, Hassen Badi, BP 182, 16200 El Harrach, Algiers, Algeria

<sup>f</sup> QOPNA & LAQV-REQUIMTE, Department of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

<sup>g</sup> Université de Reims Champagne Ardenne, CNRS, ICMR UMR 7312, 51097 Reims, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 3 December 2020

Accepted 8 January 2021

Available online 15 January 2021

### Keywords:

Coumarin

Antioxidant activity

Molecular docking

Molecular dynamics

Cancer

p38 MAPK protein

## ABSTRACT

A series of 6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-ones 4a-g and 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-ones 5a-g derivatives were synthesized by reaction of 4-hydroxycoumarin with 2-hydroxyarylaldehydes 2a-f or 2-hydroxynaphthaldehyde 2g using different solvents and acid/base catalysts. The approach relies on a regioselective cascade reaction involving one/two molar equiv of the 4-hydroxy coumarin iteratively acting as active methylene substrate in a Knoevenagel condensation and in a Michael addition. The structures of all compounds were established by IR, mass spectrometry, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR. Antioxidant activity of the synthesized compounds were determined using the DPPH scavenging assay, best results being obtained with 5b (IC<sub>50</sub> = 236 µg/mL). Computational studies showed that the compounds bind in the ATP-binding site of p38 MAPK, in a same manner than known polyaromatic potent inhibitors. The synthesized compounds might be considered further for cancer therapy.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

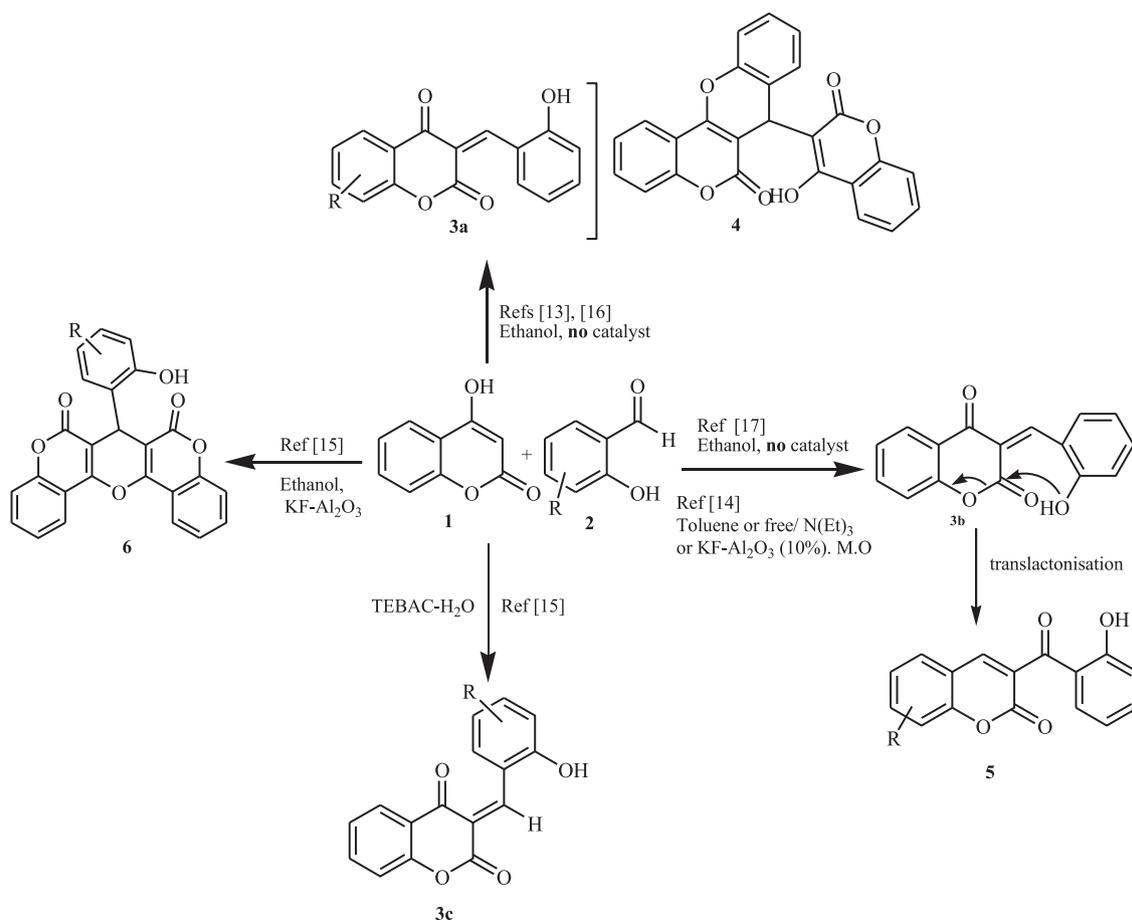
## 1. Introduction

Due to its versatile properties, the coumarinyl substructure is a privileged scaffold in the design of organic compounds. Notwithstanding its particular physico-chemical behavior as a powerful fluorogenic conjugate, the 2-chromenone moiety is also found in natural products and highly bioactive compounds. Indeed, coumarin-derived drugs exhibit broad biological activity with, for example, antioxidant, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, or hypnotic properties [1–10]. Anticancer properties of chromenones have also been reported. Recently, Batran and collaborators demonstrated that coumarin derivatives act as potent anti-breast and anti-cervical cancer agents [11]. In this domain, one of the possible targets of coumarin-derived compounds is the p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) that regulates a large num-

ber of cellular pathways and plays an important role in cell survival and apoptosis. This was confirmed by other studies reporting the intervention of p38 MAPK inhibitors on cancer cell death [12]. Thus, coumarin appears as an attractive chemical scaffold for the development of new anticancer agents, which would target p38 MAPK-kinase as the biological receptor. Numerous methods have been devised for the functionalization of coumarin, among which the reaction with 2-hydroxybenzaldehydes appears of broad versatility. Although very few number of investigations have been carried out on the reactivity of 4-hydroxycoumarin 1 vis-à-vis ortho-hydroxy arylaldehydes 2, the outcome of the reaction seemed particularly dependent on the reaction conditions. In their pioneering work in 1943 W. R. Sullivan and coworkers [13] reported the condensation of 4-hydroxycoumarin with o-hydroxybenzaldehyde in refluxing ethanol affording two products, to which they attributed the structures of the 1:1 adduct 3a and of the 2:1 adduct 4 as shown on Scheme 1. However, the chemical structure of 3a was unambiguously corrected in 1984 to its regioisomer 5. Formation of

\* Corresponding author.

E-mail address: [jb.behr@univ-reims.fr](mailto:jb.behr@univ-reims.fr) (J.-B. Behr).



**Scheme 1.** Selectivity of the reaction of o-hydroxyaldehydes with the 4-hydroxycoumarin.

5 can be explained by a subsequent intramolecular translactonization from unstable intermediate 3a, which occurs spontaneously in absence of any catalyst. This translactonization has already been revisited and described in our laboratory by M. Makhloufi and all [14]. The authors used apolar medium (toluene) in the presence of triethylamine (NEt<sub>3</sub>) or KF-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10%) to initiate the transformation.

Years later, Xiang-Shan Wang and all [15] experienced the condensation of o-hydroxyarylaldehydes with an excess of 4-hydroxycoumarin (2:1) in ethanol, using KF-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> as a catalyst. Surprisingly, in these conditions the 2:1 adduct 6 was obtained almost exclusively, with no traces of the expected 2:1 adduct 4. Whereas 4 results from intramolecular addition/elimination between OH from the salicylaldehyde moiety and coumarinyl C=O, an identical reaction between both the coumarinyl moieties accounts for the formation of 6. Even more astounding was the result obtained in an aqueous medium when triethylbenzylammonium chloride hydrate (TEBAC-H<sub>2</sub>O) was used as catalyst. In this case the 1:1 adduct 5 was obtained as a stable product in good yields (84%). According to these results, the reaction of o-hydroxyaldehydes with 4-hydroxycoumarin appears as a highly versatile option to prepare new series of coumarin-based conjugates. The variety of products which might be accessed under various conditions justifies the idea of revisiting this reaction to probe chemico- and regioselectivity [16,17]. In this study, the reaction of 4-hydroxycoumarin with a series of o-hydroxyarylaldehydes was performed under various solvent, catalyst or activation conditions to control the formation of the two possible poly-heterocyclic products. We also report the evaluation of the antiradical activity of the synthesized compounds using the DPPH scavenging assay. In addition, molecular

docking and molecular dynamics studies were performed for compounds 4a and 5a in order to evaluate their potential as p38 MAPK inhibitors.

## 2. Experimental section

### 2.1. General

Melting points were determined on a Stuart scientific SPM3 apparatus fitted with a microscope and are uncorrected. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in DMSO-d<sub>6</sub> solutions on Bruker Avance 300 (300.13 MHz for <sup>1</sup>H and 75.47 MHz for <sup>13</sup>C) spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (δ, ppm) using TMS as internal reference and coupling constants (J) are given in hertz (Hz). Mass spectra are obtained with ESI. Positive-ion ESI mass spectra were acquired using a Q-TOF 2 instrument [diluting 1 mL of the sample chloroform solution (10<sup>-5</sup> M) in 200 μL of 0.1% trifluoroacetic acid/methanol solution. Nitrogen was used as nebulizer gas and argon as collision gas. The needle voltage was set at 3000 V, with the ion source at 80°C and desolvation temperature at 150°C. Cone voltage was 35 V]. The elemental microanalysis (C, H, N) was carried out by the Truspec 630-200-200 Elementary Analysis-Equipment.

### 2.2. Procedure for the synthesis of 5-iodosalicylaldehyde

To a dry 500 ml round bottom flask, 14 ml (0.134 mol) of salicylaldehyde and 300 ml of methanol were added and stirred until complete dissolution. While maintaining magnetic stirring 20.07 g (0.134 mol) of sodium iodide (NaI) were added. After complete dis-

**Table 1**

Synthesis of 6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one 4a and 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-ones 5a under different reaction conditions.a

| Entry | Solvent     | Yields %    |             |
|-------|-------------|-------------|-------------|
|       |             | 5a          | 4a          |
| 1     | Ethanol     | 40          | 5           |
| 2     | Methanol    | 33          | 21          |
| 3     | Propanol    | 25          | 11          |
| 4     | Isopropanol | 26          | -           |
| 5     | Butan-2-ol  | 35          | -           |
| 6     | Isobutanol  | 34          | 11          |
| 7     | ACN         | 7           | 2           |
| 8     | THF         | 14          | 2           |
| 9     | Toluene     | No reaction | No reaction |

a Reaction conditions: 4-hydroxycoumarin 1 (1 equiv), salicylaldehyde 2a (1 equiv), refluxing solvent, 1.5 hours.

b Isolated yields.

**Table 2**

Synthesis of 5a and 4a under different catalysts in ethanol and methanol.

| Entry | Solvent  | Catalyst (amount)  | Yields (%) |    | Time (min) |
|-------|----------|--|------------|----|------------|
|       |          |  | 5a         | 4a |            |
| 1     | Ethanol  | H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> (1%)              | 3          | 18 | 90         |
| 2     |          | H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> (2%)              | 4          | 22 | 90         |
| 3     |          | H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> (5%)              | 6          | 36 | 90         |
| 4     |          | H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> (8%)              | traces     | 32 | 90         |
| 5     |          | Triethylamine  | 53         | -  | 20         |
| 6     | Methanol | H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> (1%)              | 5          | 38 | 90         |
| 7     |          | H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> (2%)              | 2          | 39 | 90         |
| 8     |          | H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> (5%)              | traces     | 40 | 90         |
| 9     |          | H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> (8%)              | traces     | 40 | 90         |
| 10    |          | Triethylamine  | 78         | -  | 20         |
| 11    |          | H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> (5%) <sup>c</sup> | -          | 65 | 90         |

<sup>c</sup> Reaction conditions: 4-hydroxycoumarin 1 (2 equiv), salicylaldehyde 2a (1 equiv), refluxing methanol, H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub> (5%), 1.5 hours.

solution of the NaI the beaker was placed on an ice/water bath. Carefully 1eq of chloramine T was added to the reaction mixture, magnetic stirring was maintained for 60 minutes keeping the temperature at 0°C. After removal of the ice bath, 100 ml of a 10% (w/w) aqueous solution of sodium thiosulfate was added while stirring for further 5 minutes. Under magnetic stirring, acidification of the reaction mixture was carried out with an HCl solution (2M, about 10 ml) until a yellow precipitate formed (PH 3-4). The solid obtained was filtered, washed with cold distilled water, dried and then recrystallized from dilute ethanol (v/v) to obtain the iodosalicylaldehyde as light yellow crystals. Yield 60 %, mp 98°C, IR (KBr): 3220 (broad, OH), 2974 (CH aliphatic), 1668 (C=O), 1604 (C=C aromatic), 557 (C-I). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 10.93 (s, 1H, OH), 10.16 (s, 1H, CHO), 7.87 (d, J=2.5, 1H, HAr), 7.77 (dd, J=9.0, J=2.5, 1H, HAr), 6.85 (d, J=9.0, 1H, ArH).

### 2.3. General procedure for the synthesis of 6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-ones (4a-g) and 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-ones (5a-g)

A dry flask was charged with 4-hydroxy-2H-chromen-2-one **1** [(1 equiv, 5 mmol) or (2 equiv, 0.1 mmol)], the appropriate salicylaldehyde derivative (and 2-hydroxynaphthaldehyde) **2a-g** (1 equiv, 5 mmol) and in free or in the presence of an amount of catalyst (see **Tables 1** and **2**), in solvent (20 mL). The mixture was stirred and refluxed. The obtained solid was filtered off and washed with hot methanol and was identified as compound **4a-g** (solid not soluble in hot methanol obtained by filtration before cooling) and **5a-g** (obtained from the filtrate after cooling).

6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one (**4a**)

White powder, mp 241-243°C; IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2972, 1699, 1645, 1610, 1567, 1488, 1455, 1390, 1276, 1242, 1221, 1106, 1044, 979,

905, 866, 757 cm<sup>-1</sup>, <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 5.75 (s, 1H, H\*), 7.15-7.68 (m, 11H, ArH), 8.09-8.12 (d, J=8.1 Hz, 1H, ArH), 12.20 (br s, OH-pyr); RMN <sup>13</sup>C (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 28.7 (C\*), 100.6, 106.1, 113.9, 116.1, 116.2, 116.5, 122.2, 122.6, 123.9, 124.5, 125.3, 128.3, 128.6, 132.2, 132.5, 149.2, 151.7, 152.2, 156.3, 160.4. ms (ESI): m/z (% relative intensity): 433.2 (100 %) (M+Na<sup>+</sup>). Elemental analysis: Calcd. For C<sub>25</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>: C 73.17; H 3.44; Found: C 73.20; H 3.50.

10-Hydroxy-6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one (**4b**)

White powder, mp 265-267°C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 5.71 (s, 1H, CH), 6.61 (d, J=6.63Hz, 1H, ArH) 6.82 (d, J= 6.8 Hz, 1H, ArH), 7.32-7.50 (m, 5H, ArH), 7.52 (t, 1H, ArH), 7.76 (t, 1H, ArH), 8.31 (d, J=8.3 Hz, 1H, ArH), 9.85 (br s, OH-Ar), 12.20 (br s, OH-pyr.); RMN <sup>13</sup>C (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 28.7 (C\*), 107.3, 114.0, 115.5, 116.1,116.2,116.3, 118.3,123.2, 123.9, 124.4, 125.2, 132.2, 132.4, 145.1, 151.9, 152.1, 160.5. ms (ESI): m/z (% relative intensity): 449.2 (100%) (M+Na<sup>+</sup>). Elemental analysis: Calcd. For: C<sub>25</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>: C 70.42; H 3.31; Found: C 70.50; H 3.39.

11-Hydroxy-6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one (**4c**)

Pink powder, mp 235-237°C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 5.62 (s, 1H, CH), 6.57 (d, J=6.6 Hz, 1H, ArH), 6.71 (d, J= 6.7 Hz, 1H, ArH), 6.98 (d, J= 7.0 Hz, 1H, ArH), 7.31-7.73 (m, 7H, ArH), 8.08 (d, J=8.1 Hz, 1H, ArH), 9.79 (br s, OH-Ar), 12.12 (br s, OH-pyr); RMN <sup>13</sup>C (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 28.1 (C\*), 102.7, 112.9, 113.8, 116.2, 116.4, 122.7, 123.9, 124.5, 129.1, 132.1, 132.4, 149.7, 151.9, 152.1, 157.3, 160.5. ms (ESI): m/z (% relative intensity): 449.2 (100%) (M+Na<sup>+</sup>). Elemental analysis: Calcd. For C<sub>25</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>: C 70.42; H 3.31; Found: C 70.50; H 3.39.

9-Hydroxy-6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one (**4d**)

Gray powder, mp 292-294°C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-D<sub>6</sub>): δ 5.67 (s, 1H, H\*), 6.60 (s, 1H, ArH) 6.68 (d, J= 6.70 Hz, 1H, ArH), 7.1 (d, J=

7.17 Hz, 1H, ArH), 7.33–7.48 (m, 5H, ArH), 7.59 (t, 1H, ArH), 7.67 (t, 1H, ArH), 8.05 (d,  $J = 8.06$  Hz, 1H, ArH), 9.39 (br s, OH-Ar), 12.24 (br s, OH-pyr.); RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  28.7 ( $C^*$ ), 98.8, 113.9, 114.0, 115.2, 116.1, 116.4, 117.1, 122.6, 123.9, 124.5, 132.2, 132.4, 142.0, 142.1, 151.9, 152.2, 154.5, 160.5. ms (ESI):  $m/z$  (% relative intensity): 449.1 (100%) ( $M+Na^+$ ). Elemental analysis: Calcd. For  $C_{25}H_{14}O_7$ : C 70.42; H 3.31; Found: C 70.50; H 3.39.

9-Nitro-6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one(4e)

White powder, mp 312–315°C; I.R  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3309, 3072, 1703, 1670, 1646, 1629, 1609, 1523, 1496, 1455, 1392, 1337, 1286, 1243, 1218, 1185, 1111, 1090, 1059, 904, 848, 754.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  6.20 (s, 1H,  $H^*$ ), 6.79 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, ArH) 7.22–7.26 (m, 4H, ArH), 7.48–7.52 (m, 2H, ArH), 7.82 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H, ArH), 7.93 (dd,  $J = 8.8$  Hz,  $J' = 2.8$  Hz, 1H, ArH), 8.04 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH); RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  28.6 ( $C^*$ ), 102.5, 112.5, 113.3, 116.1, 116.6, 117.6, 122.7, 123.1, 124.3, 124.4, 124.7, 125.0, 132.5, 132.9, 133.3, 138.3, 144.2, 152.0, 152.3, 154.3, 159.7, 160.1. ms (ESI):  $m/z$  (% relative intensity): 478.1 (100%) ( $M+Na^+$ ). Elemental analysis: Calcd. for  $C_{25}H_{13}O_8N$ : C 65.94, H 2.88, N 3.08, Found: C 66.02, H 2.96, N 3.04.

9-Iodo-6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one(4f)

White powder, mp 295–297°C;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  5.69 (s, 1H, CH), 7.16 (d,  $J = 7.19$  Hz, 1H, ArH), 7.31–7.48 (m, 5H, ArH), 7.57–7.71 (m, 3H, ArH), 8.05 (dd,  $J = 8.07$  Hz,  $J' = 2.1$  Hz, 2H, ArH), 8.07 (d,  $J = 8.09$  Hz, 1H, ArH), 12.33 (s, br, OH-pyr.); RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $D_6$ , 400 MHz):  $\delta$  28.9, 102.80, 116.5, 116.6, 118.2, 118.9, 122.6, 124.5, 125.4, 126.3, 132.7, 132.8, 134.5, 137.4, 144.5, 152.4, 152.7, 152.8, 160.7. ms (ESI):  $m/z$  (% relative intensity): 558.9 (100%) ( $M+Na^+$ ). Elemental analysis: Calcd. for  $C_{25}H_{13}IO_6$ : C 55.99, H 2.44, Found: C 56.02, H 2.56.

6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzo[f]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one (4g)

Pink powder, mp 298–300°C;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  6.19 (s, 1H, CH), 7.26 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, ArH) 7.42–7.63 (m, 7H, ArH), 7.69–7.74 (m, 1H, ArH), 7.93–7.99 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H, ArH), 8.16 (dd, 1H,  $J = 8.2$  Hz,  $J' = 2.1$  Hz), 12.66 (br s, OH-pyr.); RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  27.0 ( $C^*$ ), 101.3, 113.7, 115.8, 116.2, 116.5, 117.0, 122.7, 123.9, 124.5, 125.0, 127.2, 128.7, 129.2, 132.3, 132.6, 138.4, 152.0, 152.2, 160.5; ms (ESI):  $m/z$  (% relative intensity): 483.2 (100%) ( $M+Na^+$ ). Elemental analysis: Calcd. For:  $C_{29}H_{16}O_6$ : C 75.65; H 3.50; Found: C 75.86; H 3.65.

3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one (5a)

Yellow powder, mp 175–177°C; I.R  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3403 (OH), 1716 ( $O=C-O$ );  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  6.90–6.97 (m, 2H, HAr), 7.40–7.50 (m, 3H, HAr), 7.67–7.74 (m, 2H, HAr), 7.86 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, HAr), 8.34 (s, 1H, H-4), 10.69 (s, br, OH-11);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  116.1, 116.9, 118.3, 119.2, 123.4, 124.8, 128.1, 128.8, 129.7, 130.8, 133.2, 135.2, 142.7, 153.7, 158.5, 191.8. Ms (ESI):  $m/z$  (% relative intensity): 267 ( $M+H^+$ ) (100). Elemental analysis: Calcd. for  $C_{16}H_{10}O_4$ : C 72.18; H 3.79; Found: C 72.02; H 3.60.

8-hydroxy-3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one (5b)

Yellow powder, mp 252–254°C;  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  7.18 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, HAr), 7.20 (t, 1H, HAr), 7.34 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, HAr), 8.34 (s, 1H, H-4), 10.40 (s, 1H, OH-8), 10.77 (s, 1H, OH-11);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  116.9, 118.3, 119.2, 123.4, 124.9, 128.1, 120.8, 129.7, 130.8, 133.2, 135.2, 144.4, 146.5, 153.7, 158.5, 191.8. Ms (ESI):  $m/z$  (% relative intensity): 305 ( $M+Na^+$ ) (100). Elemental analysis: Calcd. for  $C_{16}H_{10}O_5$ : C 68.09; H 3.57; Found: C 68.12; H 3.60.

7-hydroxy-3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one (5c)

Yellow powder, mp 254–256°C; RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  6.78 (s, 1H, HAr), 6.84 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, HAr), 6.87 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, HAr), 6.90 (t, 1H, HAr), 7.71 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, HAr), 7.42 (t, 1H, HAr), 7.59 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, HAr), 8.28 (s, 1H, H-4), 9.93 (s, 1H, OH-7), 10.64 (s, 1H, OH-11); RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  102.0, 110.9, 113.9, 116.8, 119.2, 123.5, 124.3, 130.9, 131.6, 134.7, 144.7, 156.4, 158.3, 158.5, 163.6, 192.5. Ms (ESI):  $m/z$  (% relative intensity): 305 ( $M+Na^+$ )

(100). Elemental analysis: Calcd. for  $C_{16}H_{10}O_5$ : C 68.09; H 3.57 Found: C 68.22; H 3.50.

3-(2-hydroxybenzoyl)-6-iodo-2H-chromen-2-one (5f)

Yellow powder, mp 252–234°C;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  6.92–6.96 (m, 2H, ArH), 7.29 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, HAr), 7.47–7.52 (m, 1H, ArH), 7.69 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, HAr), 7.97 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, HAr), 8.26 (s, 1H, HAr), 8.27 (s, 1H, H-4), 10.74 (s, br, OH-11);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  117.4, 117.5, 119.0, 119.9, 121.1, 123.8, 127.0, 130.2, 131.3, 136.0, 138.0, 141.7, 153.9, 158.1, 159.2, 192.0, 160.89. ms (ESI):  $m/z$  (% relative intensity): 414.9 (100) ( $M+Na^+$ ). Elemental analysis: Calcd. for  $C_{16}H_9IO_4$ : C 49.01; H 2.31 Found: C 48.92; H 2.40.

3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-benzo[f]chromen-2-one (5g)

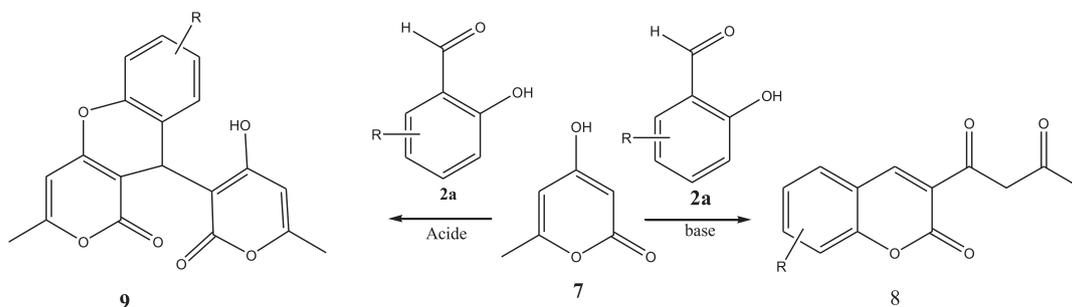
Yellow powder, mp 254–256°C; I.R (KBr): 3486 (OH), 1571 ( $C=C$ -aromatic);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  6.93 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H, HAr), 7.49 (t, 2H, HAr), 7.72 (t, 2H, HAr), 7.65 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, HAr), 8.10 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, HAr), 8.30 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, HAr), 8.63 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, HAr), 9.13 (s, 1H, H-4), 10.78 (s, 1H, OH-11);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $D_6$ ):  $\delta$  112.3, 116.2, 116.9, 119.0, 122.1, 123.3, 126.0, 127.1, 128.4, 128.6, 128.9, 129.7, 131.1, 134.4, 135.3, 138.7, 153.9, 157.6, 159.0, 192.8; ms (ESI):  $m/z$  (% relative intensity): 339.09 (100) ( $M+Na^+$ ). Elemental analysis: Calculated for:  $C_{20}H_{12}O_4$ : C 75.94; H 3.82; Found: C 75.80; H 3.75.

#### 2.4. Evaluation of the free-radical scavenging properties of 4a-g and 5a-g

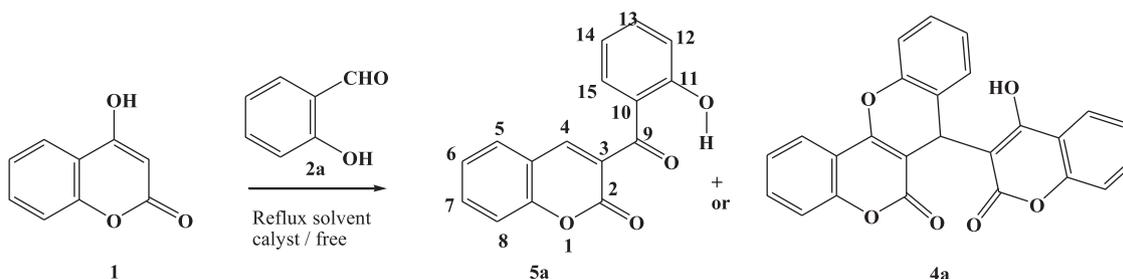
The DPPH radical scavenging capacity was measured from the bleaching of purple coloured ethanol solution of DPPH $\cdot$  according to the method described by L.L. Mensor et al, J.S. Lee et al [18,19]. DPPH $\cdot$  stock solution was prepared by dissolving 4 mg DPPH $\cdot$  in 100 mL ethanol. Compounds 4 and 5 were dissolved in DMSO to obtain a solution of  $10^{-1}$  M. Test compounds were diluted further with DMSO to get final concentrations of 0.05, 0.025 and 0.0125 mol/l for all the compounds, whereas the standard (ascorbic acid) was diluted to 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.003125, 0.0015625 mol/l solutions respectively. Wells were loaded with 40  $\mu\text{L}$  of tested sample and then with 2 mL of DPPH $\cdot$  solution, all assays being carried out in triplicate. Negative control wells were loaded with 40  $\mu\text{L}$  of DMSO and 2 mL of DPPH $\cdot$  solution. After vortexing, the mixtures were incubated at room temperature for 1 h in darkness at 25°C, and then the absorbance of the plate was recorded at 517 nm. Ascorbic acid (AA) was used as standard for the antioxidant activity screening. A blank containing only ethanol with DMSO was used as the control. Each measurement was performed in triplicate.

#### 2.5. Molecular docking studies

Molecular docking studies were conducted next to evaluate the potential of compounds 4a,5a to inhibit p38 MAPK, an anticancer target enzyme. To this aim, 4a,5a as well as the known inhibitor SB2, structurally belonging to the pyridinyl-imidazole family, were docked in the p38 MAPK active site, using iGEMDOCK v 2.1 program [20], to predict their binding mode, their interactions and their binding energies with this protein. Structures were drawn using MarvinSketch software [21] and the corresponding PDB files were imported in iGEMDOCK v2.1 software as ligands. The protein coordinates of p38 MAPK was downloaded from the Protein Data Bank [22] (PDB: 1a9u with resolution of 2.50 Å, corresponding to p38 MAPK protein complexed with inhibitor SB2). The active site was identified as a distance of 8 Å from the center of bound ligand SB2. All docking simulations were performed with standard docking, population size of 200, 70 generations and number of solutions of 2. Obtained binding modes and docking energies of 4a,5a were compared with those of the potent inhibitor SB2.



**Scheme 2.** Synthesis of 3-acetoacetylcoumarins 8 [29] and pyranyl-pyranpchromene 9. [30].



**Scheme 3.** Synthesis of 6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one 4a and 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-ones 5a.

## 2.6. Molecular dynamics studies

In order to evaluate the stability of docked complexes, 4a-p38 MAPK, 5a-p38 MAPK and SB2-p38 MAPK, we submitted them to 10 ns of molecular dynamics simulations, using the same protocol of molecular dynamics as in our previous work [23]. Thus, we used the Nano Molecular Dynamics software NAMD 2.12 [24] with CHARMM 36 force field. Ligands topologies were generated using the CHARMM General Force Field (CGenFF) web server. All complexes were solvated in a cubic water box of edge length 10 Å and then neutralized with NaCl. The particle mesh Ewald (PME) method [25] was used with a 12 Å nonbonded cutoff and a grid spacing of 1 Å to include the contribution of short/long-range interactions. Periodic boundary conditions (PBCs) [26] were used and temperature and pressure were maintained constant using Langevin thermostat (310 K) and Langevin barostat (1 atm), respectively. Then, the three systems underwent 5000 steps of steepest-descent energy minimization to remove atomic overlaps or improper geometries. After this, studied systems were equilibrated for 100 ps under the constant number of particles, pressure and temperature (NPT). Finally, the obtained systems were submitted to 10 ns of molecular dynamics using 2 fs time steps. Obtained results were visualized and analyzed using VMD software [27] and Discovery Studio visualizer [28].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Chemistry

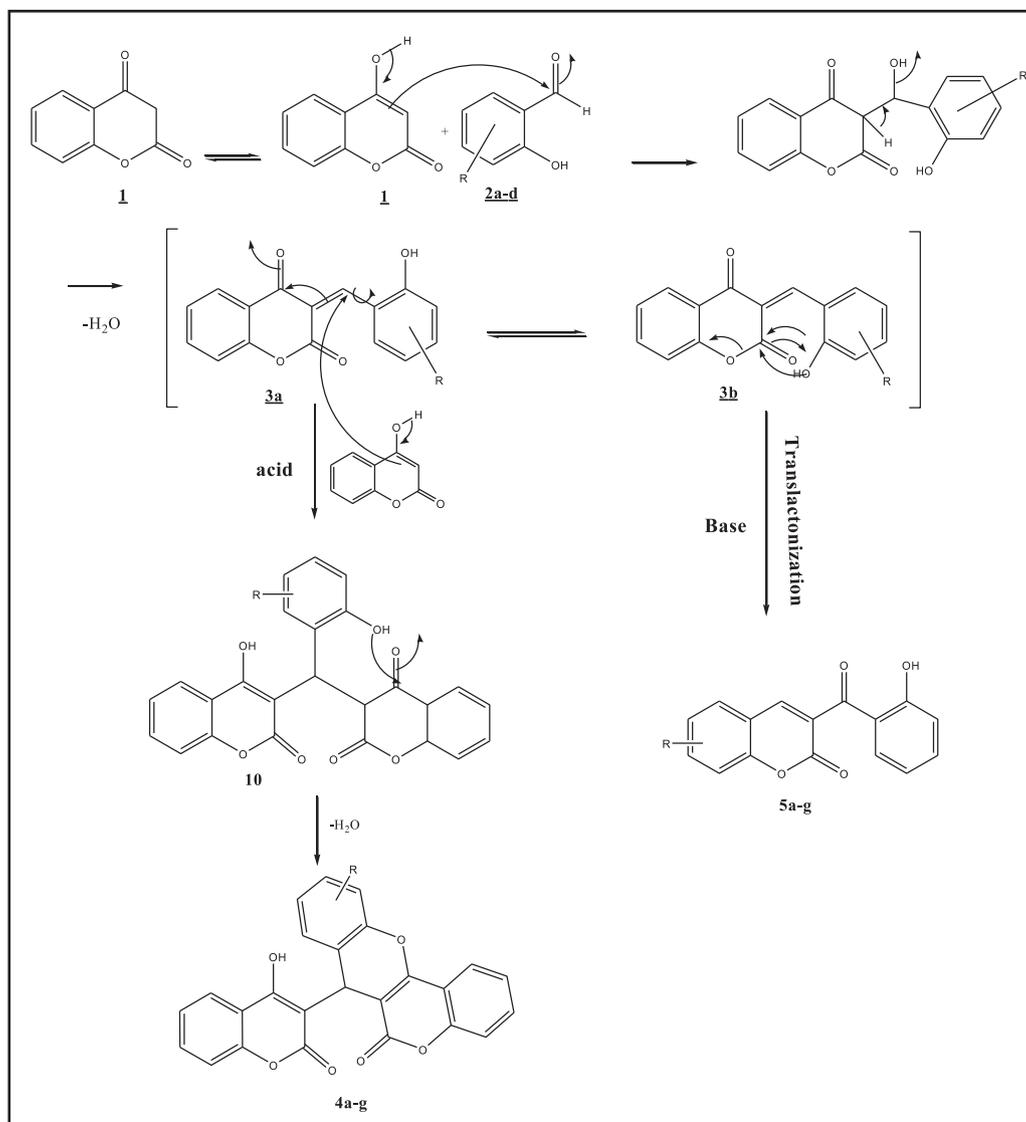
In our previous studies, we have shown that the condensation of 4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-one (TAL) 7 with salicylaldehyde derivatives 2a, in a range of different solvents (reflux) and using different catalysts, afforded 3-acetoacetylcoumarins 8 in basic medium [29] and 10-(4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2H-pyran-3-yl)-3-methyl-1H,10H-pyrano[4,3-b]chromen-1-ones 9 in the presence of heteropolyacids (HPA) [30] (Scheme 2). 4-hydroxycoumarin (or 4-hydroxybenzopyran-2-one) 1 might react in the same manner than its homologue 7, via the strongly nucleophilic carbon at position C3. To investigate the reactivity of 1 in a Knoevenagel con-

densation with 2, a first set of experiments was devoted to study the influence of the solvent and of a catalyst in the reaction outcome.

We have started our work by revisiting the condensation of equimolar amounts of 4-hydroxycoumarin 1 and salicylaldehyde 2a in refluxing ethanol, for 1.5 hours in the absence of any catalyst. This reaction led mainly to the formation of a yellowish solid after cooling and recrystallisation from methanol, in moderate yield though (entry 1 of Table 1). MS ( $m/z$  267  $[M+H]^+$ ) and  $^1H$  NMR [10.69 ppm (br s, 1H, OH phenolic), 8.34 ppm (s, 1H, H-4), 6.90–7.82 ppm (9H, Har)] analyses were consistent with the formation of compound 5a, a 1:1 adduct of 1 and 2a ( $m/z$  267  $[M+H]^+$ ) (Scheme 1). One can explain the formation of this compound by a Knoevenagel condensation of 1 with 2a leading to compound 5a after subsequent intramolecular transactonization (Scheme 3).

The reaction of salicylaldehyde 2a with 4-hydroxycoumarin 1 was used as a model and was studied in different solvents (methanol, propanol, isopropanol, butan-2-ol, isobutanol, acetonitrile, THF and toluene) without any catalyst. Under these conditions, the reaction yielded a mixture of dicoumarol 4a and transactonised product 5a, which could be separated by simple recrystallisation in hot methanol. An optimized yield of 40 % was obtained in the presence of ethanol (Table 1, entry 1), protic solvents appearing as the most suitable for this transformation. In all these assays, transactonized compound 5a was obtained as the major product, and was even formed in an exclusive manner in *i*PrOH or 2-butanol.

To investigate the influence of a catalyst in the reaction outcome, the same transformation was carried out under acid- (heteropolyacid,  $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) and base-catalyzed conditions (triethylamine) in refluxing ethanol/methanol. Under all these conditions, the reaction afforded two products 4a and 5a (Table 2) as well. However, acid catalysis mostly promotes the formation of dicoumarol 4a, whereas  $NEt_3$  affords exclusively the transactonization product 5a. The formation of compound 4a can be explained by a regioselective cascade reaction involving an acid/base catalyzed Knoevenagel condensation of 1 with 2a leading to compound 3, which undergoes a Michael addition in a specific position (3a) of another molecule of 4-



**Scheme 4.** Mechanism proposal for the synthesis of 6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1] benzopyran-6-one 4a and 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-ones 5a.

hydroxycoumarin 1 affording intermediate 10. A further cyclodehydration of 10 yielded the isolated 6H,7H-7-(4-Hydroxy-3-coumarinyl)[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6-one 4a. Formation of 4a is sensitive to nature of the solvent used and to the amount of HPA. The yield of 4a increases with the increasing amount of H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub> (Table 2), best yield being obtained in the presence of 5 mol % catalyst in methanol.

When the reaction was performed using two equiv of 1 and one equiv of salicylaldehyde 2a in the presence of 5 mol % of H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub> in methanol, 4a was obtained in good yield (65%) (Table 2).

Subsequently, the reaction was applied to 2-hydroxyarylaldehydes 2b-f and 2-hydroxynaphthaldehyde 2g, which feature a range of electron-donating or electron-withdrawing substituents (Table 3). The reactions were carried out in MeOH or EtOH, without any catalyst or in the presence of H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub> (5 mol%). Alternatively, the molar ratio of both reagents 1 and 2a-g was varied from 1:1 to 2:1 to study the impact of an excess of 1 on ratio or yield. The transformation proved efficient in all cases, yielding the expected benzoylchromenes 5b-g and fused chromeno-chromens 4b-4g. Better yields were

obtained when using 2eq of 4-hydroxycoumarin 1 and 1eq of 2-hydroxyarylaldehydes 2b-f and 2-hydroxy-naphthaldehyde 2g. Unlike other salicylaldehyde derivatives, it was observed that 5-hydroxysalicylaldehyde 2d leads to the formation of the same product 4d in the presence or absence of the catalyst.

An increase in reaction time (TLC monitoring), led to total selectivity (towards compounds 4) with better yields than those observed when the reaction time was 90 minutes and the best yield was observed with 2-hydroxynaphthaldehyde 2g (4g: 83%) (see Table 4).

### 3.2. Mechanism of reaction

The first step of the proposal mechanism (Scheme 4) is a Knoevenagel condensation followed by dehydration, resulting in the formation of a stable chromone 3, which might exist in two tautomeric forms 3a and 3b. In the last step, the chromone conjugate 3 undergoes two types of reactions according to the conformation of the intermediate: intramolecular translactonisation, which passes through the form 3b, gives the compounds 5 and a Michael

**Table 3**

Synthesis of 5a-g and/or 4a-g in the absence of catalyst (in ethanol) and in the presence of  $H_3PMO_{12}O_{40}$  (5 mol %) (in methanol), 4-hydroxycoumarin 1/ 2-hydroxyarylaldehydes 2b-f (and 2-hydroxy-naphthaldehyde 2g) (1:1 and 2:1 eq.), 1.5 hours.

| Entry | Solvent                   | (amount of products) | Aldehyde                    | Conditions                    | Yields (%)  |             |
|-------|---------------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|
|       |                           |                      |                             |                               | 5a-g        | 4a-g        |
| 1     | Ethanol                   | (1:1)                | Salicylaldehyde 2a          | no catalyst                   | 40          | 5           |
| 2     |                           |                      | 3-hydroxysalicylaldehyde 2b |                               | 22          | 10          |
| 3     |                           |                      | 4-hydroxysalicylaldehyde 2c |                               | 40          | -           |
| 4     |                           |                      | 5-hydroxysalicylaldehyde 2d |                               | -           | 24          |
| 5     | Methanol                  | (1:1)                | 5-nitrosalicylaldehyde 2e   | $H_3PMO_{12}O_{40}$ (5 mol %) | No reaction | No reaction |
| 6     |                           |                      | 5-Iodosalicylaldehyde 2f    |                               | 68          | 16          |
| 7     |                           |                      | 2-hydroxynaphthaldehyde 2g  |                               | 51          | -           |
| 8     |                           |                      | Salicylaldehyde 2a          |                               | 6           | 36          |
| 9     |                           |                      | 3-hydroxysalicylaldehyde 2b |                               | -           | 32          |
| 10    |                           |                      | 4-hydroxysalicylaldehyde 2c |                               | -           | 40          |
| 11    |                           |                      | 5-hydroxysalicylaldehyde 2d |                               | -           | 43          |
| 12    | 5-nitrosalicylaldehyde 2e |                      | -                           | 37                            |             |             |
| 13    | 5-Iodosalicylaldehyde 2f  |                      | 10                          | 41                            |             |             |
| 14    |                           |                      |                             | -                             | 48          |             |
| 15    |                           |                      | 2-hydroxynaphthaldehyde 2g  |                               | -           |             |
| 16    | (2:1)                     | (1:1)                | Salicylaldehyde 2a          | $H_3PMO_{12}O_{40}$ (5 mol %) | traces      | 65          |
| 17    |                           |                      | 3-hydroxysalicylaldehyde 2b |                               | -           | 53          |
| 18    |                           |                      | 4-hydroxysalicylaldehyde 2c |                               | -           | 64          |
| 19    |                           |                      | 5-hydroxysalicylaldehyde 2d |                               | -           | 60          |
| 20    |                           |                      | 5-nitrosalicylaldehyde 2e   |                               | -           | 32          |
| 21    |                           |                      | 5-Iodosalicylaldehyde 2f    |                               | traces      | 48          |
|       |                           |                      | 2-hydroxynaphthaldehyde 2g  |                               | -           | 65          |

**Table 4**

Synthesis of 4a-g in the presence of  $H_3PMO_{12}O_{40}$  (5 mol %), methanol and ratio of 4-hydroxycoumarin 1/ 2a-g (2:1 eq.).

| Entry | Aldehydes                   | Compound | Time (h) | Yields (%) |
|-------|-----------------------------|----------|----------|------------|
| 1     | Salicylaldehyde 2a          | 4a       | 5        | 73         |
| 2     | 3-hydroxysalicylaldehyde 2b | 4b       | 4        | 62         |
| 3     | 4-hydroxysalicylaldehyde 2c | 4c       | 4        | 78         |
| 4     | 5-hydroxysalicylaldehyde 2d | 4d       | 3        | 76         |
| 5     | 5-nitrosalicylaldehyde 2e   | 4e       | 6        | 40         |
| 6     | 5-Iodosalicylaldehyde 2f    | 4f       | 4        | 63         |
| 7     | 2-hydroxynaphthaldehyde 2g  | 4g       | 6        | 83         |

addition of a second molecule of 4-hydroxycoumarin on the form 3a, gives dicoumaroles 4.

In order to explain the formation of the two products, we carried out the theoretical calculations of the formation enthalpies  $\Delta H_f$  and the electrostatic potential of the charges (Table 5) for the two rotamers 3a and 3b at B3LYP/6-31G\* level of theory using ORCA software [31,32].

According to (Table 5), with almost all substrates (R=H, OH,  $NO_2$ , I) the endo-OH conformation 3b is of lower energy than its exo-OH counterpart 3a. This result might account for the increasing yield in product 5, which results from intramolecular attack of proximal OH to coumarinyl carbonyl such as observed in structure 3a.

On the other hand, if we look at the Mulliken charge values of the carbon atom of the C=O bond in position 2 of the coumarin nucleus, the latter is more positive in the 3b form than in the 3a, which favors the approach of the polar solvent and facilitates the transesterification unlike the apolar solvent.

### 3.3. Antioxidant activity assessment

The antioxidant activity (free radical scavenging activity) of the synthesized 5 and 4 was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) scavenging assay [18,19]. Fig. 1 shows the variation of absorbance versus concentration of the different compounds 4a-g, 5a-c, 5f-g and of the standard ascorbic acid

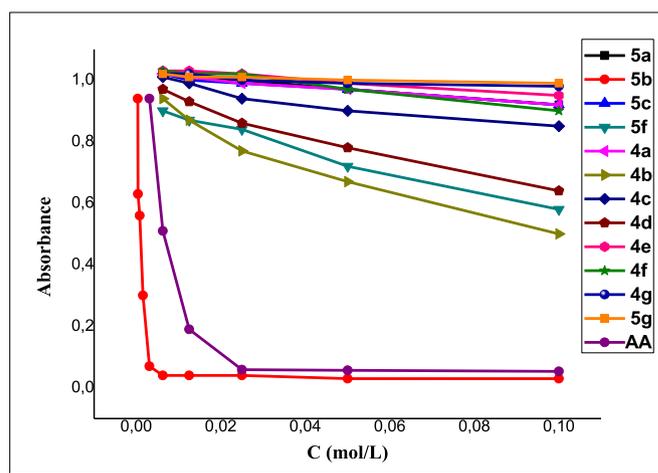


Fig. 1. The variation of absorbance versus concentration of the different compounds 4, 5 and AA.

AA. Lower absorbance of the reaction mixture indicates higher free radical scavenging activity. The  $IC_{50}$  of the most active compounds are shown in Fig. 2. The capability to scavenge the DPPH $\cdot$  (or inhibition %) was calculated as follows: RSA (%) = [(Ac - As)/Ac] x 100

Where Ac is the absorbance of the control (absorbance of DPPH-ethanol solution without sample), and As is the absorbance of the tested compound after 60 min incubation.

These assays reveal that compound 5b has excellent antioxidant activity ( $IC_{50}$  = 0.2357 mg/ml) followed by compound 4b and 5f. However, the other coumarinyl derivatives 5a, 5g, 4e, 4g do not show any significant activity. According to the results obtained, we notice that the condensation of a second molecule of 4-hydroxycoumarin (compound 4b, 4f) leads to a decrease in antioxidant activity (SAR (%) 5b > 4b, 5f > 4f).

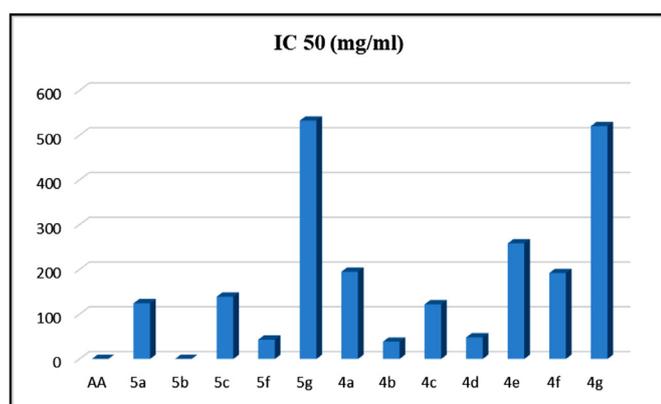
The results showed that the position of the hydroxyl groups has a significant impact on antioxidant activity. The best inhibition was

**Table 5**  
Calculated Gibbs energy of the two rotamers 3a and 3b.

| R                 | Solvent              | $\Delta H_f$ Kcal/mol $\times 10^{-3}$ |         |         |         |         |         |
|-------------------|----------------------|--|---------|---------|---------|---------|---------|
|                   |                      | 3a                                     |         |         | 3b      |         |         |
| H                 | Ethanol Methanol THF | -575.45                                | -576.93 | -573.61 | -577.24 | -579.05 | -571.14 |
| 3-OH              | Ethanol Methanol THF | -622.78                                | -621.39 | -620.59 | -624.46 | -619.00 | -618.07 |
| 4-OH              | Ethanol Methanol HF  | -620.19                                | -617.63 | -621.81 | -619.08 | -622.61 | -616.99 |
| 5-OH              | Ethanol Methanol THF | -620.99                                | -626.90 | -624.96 | -618.48 | -629.16 | -624.79 |
| 5-NO <sub>2</sub> | Ethanol Methanol THF | -703.53                                | -708.40 | -700.45 | -707.32 | -708.22 | -706.41 |
| 5-I               | Ethanol Methanol THF | 578.63                                 | -578.33 | -582.64 | -579.52 | -579.52 | -577.72 |
| Benzo[f]          | Ethanol Methanol THF | -670.28                                | -669.76 | -670.23 | -670.51 | -669.99 | -670.68 |

**Table 6**  
Interacting residues, hydrogen bonds, and binding energies of studied compounds as predicted by iGEMDOCK software.

| Compound | Hydrogen bonds           | Interacting residues   | Binding energy |
|----------|--------------------------|--|----------------|
| 4a       | Asp168 (2 Hbonds), Lys53 | Asp168, Glu71, Leu167, Leu104, Lys53, Ala51, Met109,                       | -104.37        |
| 5a       | Ala51, Lys53             | Asp168, Leu167, Leu104, Lys53, Val38, Ala51                                | -77.13         |
| SB2      | Met109, Lys53            | Asp168, Met109, His107, Thr106, Val105, Ala51, Leu104, Lys53, Val38, Tyr35 | -98.80         |

**Fig. 2.** IC50 values of the antioxidant activity for compounds 5b, 4b and the standard AA.

observed when the OH group is in the meta position. Compared to the two compounds 5a and 4a, the introduction of a halogen substituent (Iodine) in the compounds 5f, 4f has led to an increase in activity.

### 3.4. Molecular docking

In order to evaluate the potential of our synthesized compounds against cancer pathology, we studied herein their binding mode, interaction and binding energies with p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK). The results show that almost all of the docked compounds bind at the same binding site in the active site of p38 MAPK as determined experimentally. Our docking method was first validated with the known ligand SB2, a potent inhibitor of p38 MAPK, by using the structure of protein-ligand complex PDB: 1a9u. Satisfyingly, comparison between the calculated and experimental positioning of SB2 into the protein shows that the docked conformation was close to the crystal one (as shown in Fig. 3A). The RMSD between the two conformations was 0.75 Å, which is quite satisfactory as previously demonstrated [33].

Superposition of the docked conformations of synthesized compounds 4a and 5a on the X-ray structure of SB2 shows that binding modes of 4a and 5a are indeed most closely related to that observed in the crystallographic complex 1a9u, as shown in (Fig. 3B).

Visualization of docked conformations of 4a and 5a shows that, the synthesized compounds are involved in hydrogen bonds and hydrophobic interactions with the residues of the protein active site. Compound 4a interacted with different amino acids as shown

in (Fig. 3C) and Table 6. It makes two hydrogen bonds with residue Asp168 and one with Lys53. On the other hand, compound 5a makes one hydrogen bond with residue Ala51 and one with Lys53 (Fig. 3C and Table 6).

In Table 6, we reported 4a and 5a binding energies, hydrogen bonds and interacting residues of the active site (< 4 Å). The binding energies between synthesized compounds and p38 MAPK protein are negative. It is worth noting that, the negative value of binding energy change reveals that the binding process is spontaneous and that the compound might be accepted as a drug.

On the other hand, the calculated binding energy of compound 4a is lower than that of experimental ligand SB2 (Table 6). Based on this result, it can be assumed that the synthesized compound 4a shows higher affinities for p38 MAPK protein. In addition, interacting residues namely Asp168, Leu104, Lys53 and Ala51 are predicted by our docking model to be conserved in three studied compounds.

### 3.5. Molecular dynamics studies

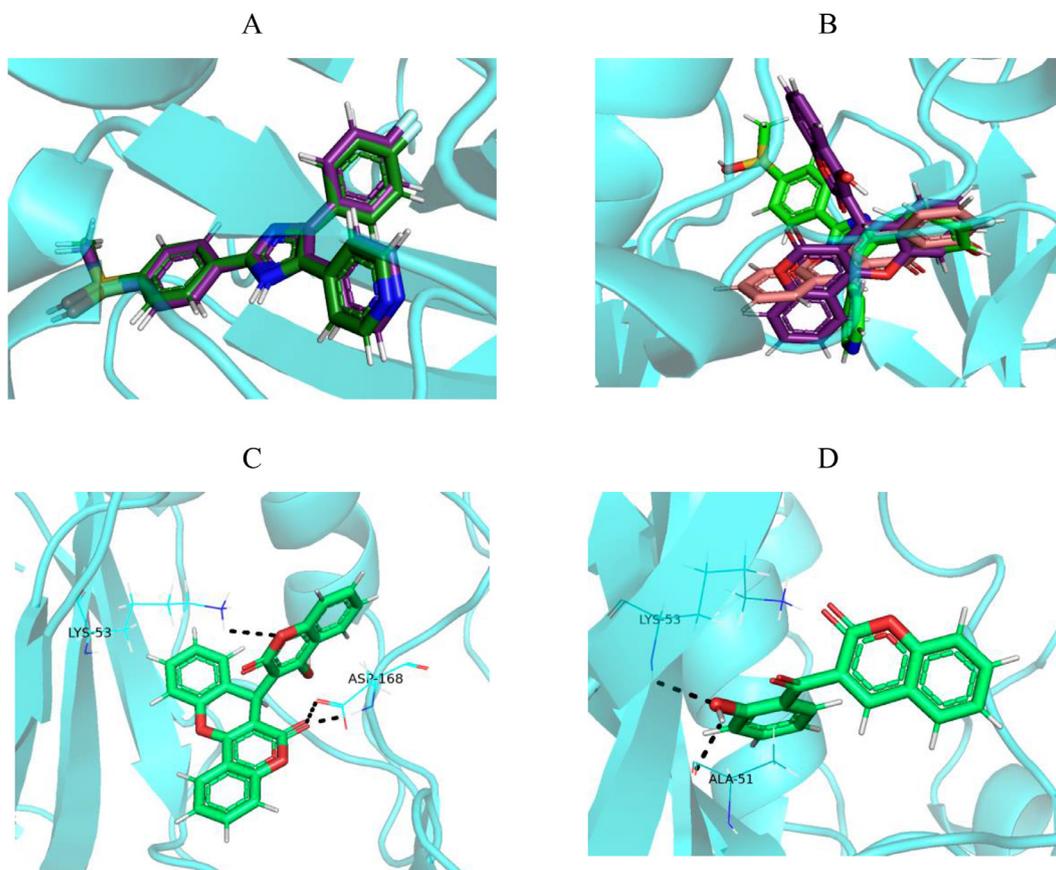
To confirm the binding mode and the stability of docked ligands 4a and 5a with p38 MAPK, molecular dynamics simulations were conducted. The stability of studied systems was evaluated based on change in RMSD of ligands in the protein active site and RMSD of carbons  $\alpha$  of protein backbone and compared to those of experimental ligand SB2.

Calculated RMSD plots of protein backbone  $C\alpha$  atoms of studied systems (4a-p38 MAPK, 5a-p38 MAPK and SB2-p38 MAPK), through the 10 ns of molecular dynamics are reported in (Fig. 4).

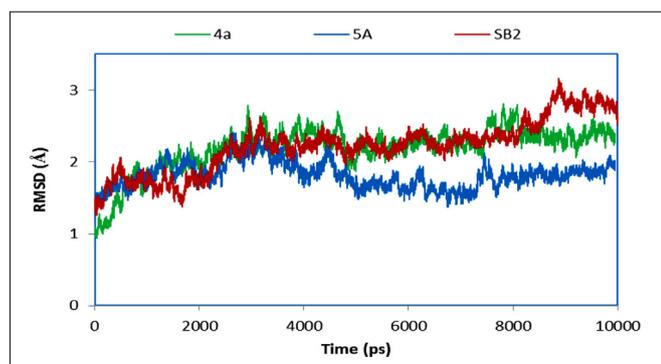
This figure shows that the backbone  $C\alpha$  of 5a-p38 and 4a-p38 complexes show small fluctuations until 5 ns, where the complex reach stability at around 1.5 Å and 2.2 Å of RMSD, respectively, until the end of simulation. The RMSD of backbone  $C\alpha$  of SB2-p38 increases until 8.3 Å, after which it stabilizes at 2.8 Å until the end of simulation.

Calculated RMSD plots of the three studied ligands 4a, 5a and SB2, through the 10 ns of molecular dynamics are reported in (Fig. 5).

Analysis of results shows some differences between the three curves indicating some movements of studied compounds in the p38 active site. The calculated RMSD values of compound 4a decreases from 1 Å to 0.5 Å till 0.5 ns, and stays constant until the end of simulation time. This result confirms that the compound 4a reach equilibrium at 0.5 ns, revealing that it has converged during the simulation. On the other hand, the RMSD curve shape calculated for compound 5a approaches a horizontal line during all the



**Fig. 3.** Superimposition of A- docked (green) and experimental (magenta) structures of SB2; B- compounds 4a (magenta), 5a (pink) and experimental (green) structures of SB2); C and D- Hydrogen bond interactions between p38 MAPK active site residues and synthesized compounds C- 4a, D- 5a. The protein backbone was presented in blue ribbon.

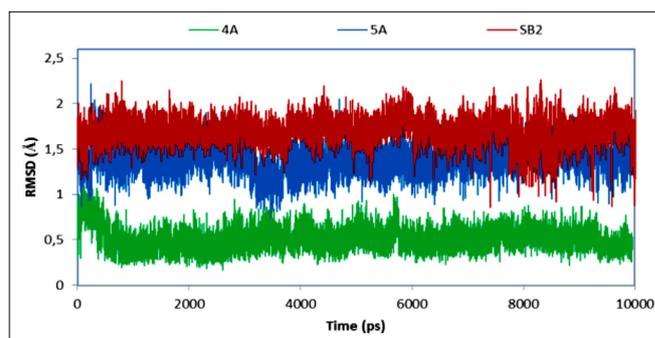


**Fig. 4.** RMSD plots of backbone C $\alpha$  atoms of complexes 4a-p38 (green), 5a-p38 (blue) and SB2-p38 (red).

time of simulation, at the average value of RMSD of 1.4 Å, indicating that the compound reaches equilibrium and its change of conformation is very little. In contrary, the experimental compound SB2 is stable until 7 ns, after which some fluctuations were observed.

The solvent accessible surface area (SASA) and the radius of gyration (rGyr) were calculated for the three studied complexes during the 10 ns of molecular dynamics simulation to illustrate the structural change of the protein and reported in (Fig. 6). These two parameters are widely used as the criterion of equilibrium [23,34].

The average values of total SASA calculated for SB2-p38 MAPK, 4a-p38 MAPK, and 5a-p38 MAPK complexes are 19178.6 Å<sup>2</sup>,



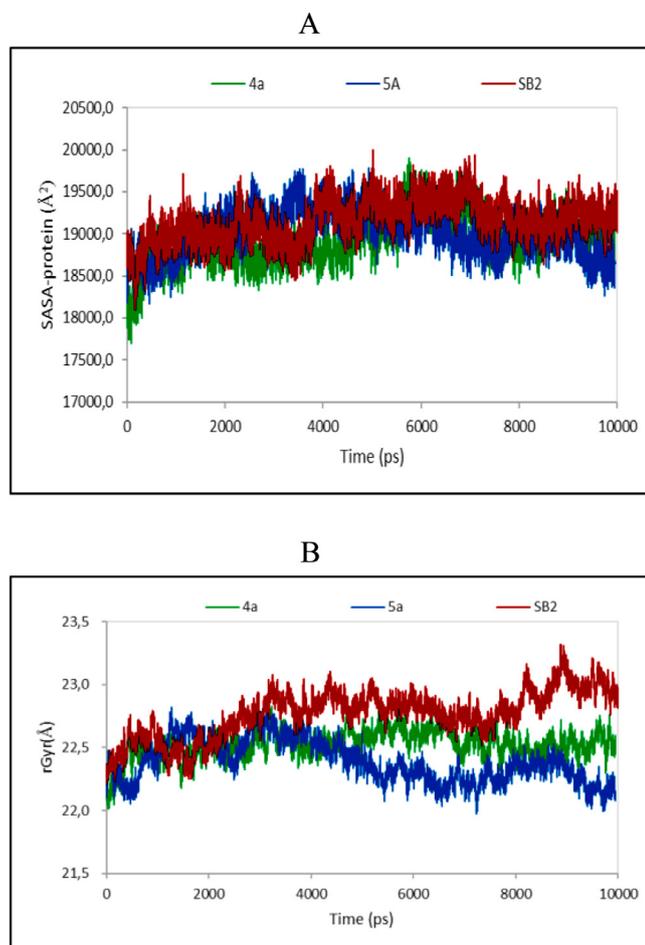
**Fig. 5.** RMSD plots of the studied compounds 4a (green), 5a (blue) and SB2 (red) through the 10 ns of molecular dynamics simulations.

18926.0 Å<sup>2</sup> and 19018.58 Å<sup>2</sup>, respectively (Fig. 6A). The SASA of 4a-p38 MAPK and 5a-p38 MAPK complexes exhibit similar behavior as the experimental one up to 6 ns, following that a slight decrease in SASA of 5a-p38 MAPK complex was observed.

The calculated radius of gyration (rGyr) for 4a-p38 MAPK, and 5a-p38 MAPK complexes exhibits lesser fluctuations relative to the SB2-p38 MAPK revealing that the systems composed of our synthesized compounds 4a and 5a and p38 MAPK protein arranged to a more compact conformation.

#### 4. Conclusion

In this work, we have established a simple and efficient methodology to control the selectivity of the reaction of salicy-



**Fig. 6.** Calculated Plots of A- protein SASA; B- radius of gyration for the three studied complexes 4a-p38 (green), 5a-p38 (blue) and SB2-p-38 (red) through the 10 ns of molecular dynamics simulation.

aldehyde derivatives with 4-hydroxycoumarin in different conditions. It has been shown that the synthesis of coumarin and biscoumarin derivatives using 2-hydroxyarylaldehydes is highly dependent on the operating conditions used (nature of the solvent, absence/presence of the catalyst, the amount and the nature of the catalyst, nature of the substituent, reaction time). The absence of catalyst and the presence of a basic catalyst (triethylamine) favoured the formation of the compounds 5. On the other hand, an acid catalyst ( $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$ , 5 mol %) in the presence of 2 eq of 4-hydroxycoumarin 1, using a protic polar solvent (methanol), led to a total selectivity towards compounds 4. The best yields were obtained for compounds 4 after increasing the reaction time.

From the antioxidant activity evaluation of the prepared compounds 4a-g and 5a-g one can highlight that derivative 5b bearing a catechol group displayed the higher activity at low concentration. At higher concentration it became a pro-oxidant agent.

Molecular docking and molecular dynamics studies provided an insight into the molecular stability of synthesized compounds 4a and 5a in the p38 MAPK active site. Work is in progress to prepare a larger series of coumarinyl derivatives to enter SAR-studies aimed at evaluating their potential as anticancer agents.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

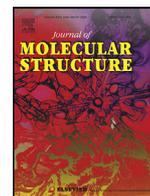
#### Acknowledgments

Thanks are due to the Portuguese NMR Network. We thank Hilário Tavares (Department of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal) for performing the mass and NMR spectra.

#### References

- [1] S.M. Sethna, N.M. Shah, The chemistry of coumarins, *Chem. Rev.* 36 (1) (1945) 1–62, doi:[10.1021/cr60113a001](https://doi.org/10.1021/cr60113a001).
- [2] M.E. Riveiro, N. De Kimpe, A. Moglioni, R. Vazquez, F. Monczor, C. Shayo, C. Davio, Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 1325–1338, doi:[10.2174/092986710790936284](https://doi.org/10.2174/092986710790936284).
- [3] M.E. Riveiro, D. Maes, R. Vazquez, M. Vermeulen, S. Manginckx, J. Jacobs, S. Debenedetti, C. Shayo, N. De Kimpe, C. Davio, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 6547–6559, doi:[10.1016/j.bmc.2009.08.002](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.08.002).
- [4] R.O. Kennedy, R.D. Thornes, *Coumarins: Biology, Applications, and Mode of Action*, Wiley, ChichesterUK, 1997.
- [5] D.L. Yu, M. Suzuki, L. Xie, S.L. Morris-Natschke, K.H. Lee, Recent progress in the development of coumarin derivatives as potent anti-HIV agents, *Med. Res. Rev.* 23 (2003) 322–345, doi:[10.1002/med.10034](https://doi.org/10.1002/med.10034).
- [6] Q.Y. Zhang, L.P. Qin, W.D. He, L. Van Puyweldel, D. Maes, A. Adams, N. De Kimpe, Coumarins from Cnidium monnieri and their antiosteoporotic activity, *Planta. Medica.* 73 (2007) 13–19, doi:[10.1055/s-2006-951724](https://doi.org/10.1055/s-2006-951724).
- [7] M.E. Riveiro, C. Shayo, F. Monczor, N. Fernandez, A. Baldi, N. De Kimpe, J. Rossi, S. Debenedetti, C. Davio, Induction of cell differentiation in human leukemia U-937 cells by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon polystachyum*, *Cancer. Lett.* 210 (2004) 179–188, doi:[10.1016/j.canlet.2004.03.015](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.03.015).
- [8] R.D.H. Murray, J. Mendez, S.A. Brown, *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry, and Biochemistry*, Wiley, ChichesterUK, 1982.
- [9] V.T. Nguyen, S. Debenedetti, N.D. Kimpe, Synthesis of coumarins by ring-closing metathesis using Grubbs' catalyst, *Tetrahedron. Lett.* 44 (2003) 4199–4201, doi:[10.1016/S0040-4039\(03\)00902-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)00902-X).
- [10] D. Maes, S. Vervisch, S. Debenedetti, C. Davio, S. Manginckx, N. Giubellina, N. De Kimpe, Synthesis and structural revision of naturally occurring ayapin derivatives, *Tetrahedron* 61 (2005) 2505–2511, doi:[10.1016/j.tet.2004.12.061](https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.12.061).
- [11] R.Z. Batran, D.H. Dawood, S.A. El-Seginy, M.M. Ali, T.J. Maher, K.S. Gugnani, A.N. Rondon-Ortiz, New Coumarin derivatives as anti-breast and anti-cervical cancer agents targeting VEGFR-2 and p38 $\alpha$  MAPK, *Arch. Pharm. Chem. Life. Sci.* 350 (9) (2017) 1–19, doi:[10.1002/ardp.201700064](https://doi.org/10.1002/ardp.201700064).
- [12] X. Jin, Q. Mo, Y. Zhang, Y. Gao, Y. Wu, J. Li, X. Hao, D. Ma, Q. Gao, P. Chen, The p38 MAPK inhibitor BIRB796 enhances the antitumor effects of VX680 in cervical cancer, *Cancer. Biol. Ther.* 17 (5) (2016) 566–576, doi:[10.1080/15384047.2016.1177676](https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1177676).
- [13] W.R. Sullivan, C.F. Huebner, M.A. Stahmann, K.P. Link, Studies on 4-hydroxycoumarins. II. The condensation of aldehydes with 4-hydroxycoumarins, *J. Am. Chem. Soc.* 65 (1943) 2288–2291, doi:[10.1021/ja01252a008](https://doi.org/10.1021/ja01252a008).
- [14] M. Makhloufi-Chebli, M. Hamdi, A.M. Silva, S.F. Balegrone, Translactonisation intramoléculaire assistée par micro-ondes. Synthèse des coumarines, *J. Soc. Alger. Chim.* 18 (2008) 91–101.
- [15] X.S. Wang, J. Zhou, K. Yang, M.M. Zhang, Divergent products obtained from the reactions of salicylaldehyde and 4-hydroxycoumarin in  $\text{TEBAC-H}_2\text{O}$ ,  $\text{KF-Al}_2\text{O}_3\text{-EtOH}$ , and ionic liquid, *Synth. Commun.* 40 (2010) 3332–3345, doi:[10.1080/00397910903419837](https://doi.org/10.1080/00397910903419837).
- [16] J. Riboulleau, C. Deschamps-Vallet, D. Molho, C. Mentzer, Benzopyrylium salts. I. Preparation and reductive heterocyclization of several 3-(o-hydroxybenzylidene) - 2, 4- dioxochromanes, *Bull. Soc. Chim. France* 8-9 (1970) 3138–3144.
- [17] P. de March, M. Moreno-Manas, J.L. Roca, The reactions of 4-hydroxy-2-pyrone with 2-hydroxybenzaldehydes. A note of warning, *J. Het. Chem.* 21 (5) (1984) 1371–1372, doi:[10.1002/jhet.5570210525](https://doi.org/10.1002/jhet.5570210525).
- [18] L.L. Mensor, F.S. Menezes, G.G. Leit-ao, A.S. Reis, C. T.dos Santos, S.C. Coube, S.G. Leitão, Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, *Phytother. Res.* 15 (2001) 127–130, doi:[10.1002/ptr.687](https://doi.org/10.1002/ptr.687).
- [19] J.S. Lee, H.J. Kim, H. Park, Y.S. Lee, New Diarylheptanoids from the stems of *Carpinus cordata*, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 1367–1370, doi:[10.1021/np0200481](https://doi.org/10.1021/np0200481).
- [20] H. Kai-Cheng, C. Yen-Fu, L. Shen-Rong, Y. Jinn-Moon, iGEMDOCK: a graphical environment of enhancing GEMDOCK using pharmacological interactions and post-screening analysis, *BMC Bioinf.* 12 (2011) 1–11, doi:[10.1186/1471-2105-12-S1-S33](https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S1-S33).
- [21] Marvin Sketch program, Chemaxon, <http://www.chemaxon.com>, (2009).
- [22] <http://www.rcsb.org/>
- [23] S. Hammad, S. Bouaziz-Terrachet, R. Meghnam, D. Meziane, Pharmacophore development, drug-likeness analysis, molecular docking, and molecular dynamics simulations for identification of new CK2 inhibitors, *J. Mol. Model.* 26 (2020) 160, doi:[10.1007/s00894-020-04408-2](https://doi.org/10.1007/s00894-020-04408-2).
- [24] J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten, Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.* 26 (16) (2005) 1781–1802, doi:[10.1002/jcc.20289](https://doi.org/10.1002/jcc.20289).

- [25] U. Essman, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.* 103 (1995) 8577–8593, doi:[10.1063/1.470117](https://doi.org/10.1063/1.470117).
- [26] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 926–935, doi:[10.1063/1.445869](https://doi.org/10.1063/1.445869).
- [27] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1) (1996) 33–38 27–38, doi:[10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [28] <http://www.accelrys.com>.
- [29] A. Benazzouz, M. Makhloufi-Chebli, N. Khatir-Hamdi, B. Boutemur-Khedis, A.M.S. Silva, M. Hamdi, A facile synthesis of new coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones dyads, *Tetrahedron* 71 (2015) 3890–3894, doi:[10.1016/j.tet.2015.04.028](https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.04.028).
- [30] L. Saher, M. Makhloufi-Chebli, L. Dermeche, S. Dermeche, B. Boutemur-Khedis, C. Rabia, M. Hamdi, A.M.S. Silva, 10-(4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2H-pyran-3-yl)-3-methyl-1H,10H pyrano[4,3-b]chromen-1-ones from a pseudo-multicomponent reaction and evaluation of their antioxidant activity, *Tetrahedron* 74 (2018) 872–879, doi:[10.1016/j.tet.2018.01.009](https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.01.009).
- [31] F. Neese, The ORCA program system, *Wiley interdiscip. WIREs. Comput. Mol. Sci.* 2 (2012) 73–78, doi:[10.1002/wcms.81](https://doi.org/10.1002/wcms.81).
- [32] F. Neese, Calculation of the zero-field splitting tensor on the basis of hybrid density functional and Hartree-Fock theory, *J. Chem. Phys.* 127 (16) (2007) 164112–164119, doi:[10.1063/1.2772857](https://doi.org/10.1063/1.2772857).
- [33] S. Bouaziz-Terrachet, A. Toumi-Maouche, B. Maouche, S. Taïri-Kellou, Modeling the binding modes of stilbene analogs to cyclooxygenase-2: a molecular docking study, *J. Mol. Model.* 16 (12) (2010) 1919–1929, doi:[10.1007/s00894-010-0679-7](https://doi.org/10.1007/s00894-010-0679-7).
- [34] D. Roccatano, I. Daidone, M.A. Ceruso, C. Bossa, A.D. Nolan, Selective excitation of native fluctuation during thermal unfolding simulations: horse heart Cytochrom C as a case study, *Biophys. J.* 84 (2003) 1876–1883, doi:[10.1016/S0006-3495\(03\)74995-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74995-9).



# Synthesis, biological activities of chalcones and novel 4-acetylpyridine oximes, molecular docking of the synthesized products as acetylcholinesterase ligands



Kamilia Ould Lamara<sup>a</sup>, Malika Makhloufi-Chebli<sup>a,\*</sup>, Amina Benazzouz-Touami<sup>a</sup>, Souhila Terrachet-Bouaziz<sup>b,c</sup>, Anthony Robert<sup>d</sup>, Carine Machado-Rodrigues<sup>d</sup>, Jean-Bernard Behr<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire LPCM, Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Mouloud Mammeri, 15000 Tizi-Ouzou, Algeria

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University Mohamed Bouguerra, Boumerdes, Algeria

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

<sup>d</sup> Université de Reims Champagne –Ardenne, Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR), CNRS UMR 7312, UFR Sciences Exactes et Naturelles, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 20 October 2021

Revised 7 December 2021

Accepted 8 December 2021

Available online 11 December 2021

### Keywords:

Heterocyclic chalcones

Oximes

Antioxidant capacity

Antimicrobial activity

Molecular docking

Acetylcholinesterase inhibitors

fep-mAChE protein

## ABSTRACT

Heterocyclic chalcones were synthesized by reaction of 4-acetylpyridine with the corresponding aromatic aldehydes under *Claisen Schmidt* conditions. These chalcones were used as starting material for the synthesis of oximes in the presence of hydroxylamine hydrochloride. The structures of the synthesized compounds were confirmed by IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and ESI-MS, HRMS spectral analyses. All the synthesized compounds were evaluated for their antioxidant activity by DPPH<sup>•</sup> method and their *in vitro* antimicrobial activity by disk diffusion method against two Gram-negative bacteria, one Gram-positive bacteria and two fungal strains (*C. albicans* and *A. niger*). The results showed that the synthesized compounds did not display significant antioxidant activity. However, compounds **3b**, **3d**, **3f**, **3h**, **3i** showed excellent antibacterial activity better than the standard drug against the bacterial strain *S. aureus* (ATCC 25923). The two compounds **3c**, **3d** proved very active against the fungal strain *A. niger* (MIC= 7.81 µg/mL, 15.62 µg/mL respectively) while the antifungal drug used as reference (Fluconazole) was inactive. Molecular docking and molecular dynamics results revealed that the synthesized compounds, **4e**, **4c**, and **5j**, were involved in a large number of favorable interactions with the active site residues of the acetylcholinesterase protein, which can stabilize the ligands in the active site and increase their affinities.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The damage caused by bacterial and fungal infections has deeply increased in recent years [1]. Infectious diseases caused by bacterial pathogens have become a major public health issue due to the emergence of drug resistance, which resulted in increased mortality and morbidity due to treatment failure [2,3]. Several bacterial strains that seemed to be under control are again causing deaths each year due to the lack of appropriate antibiotic drugs [4]. Particular attention has focused on the Gram-positive organism *Staphylococcus aureus* because many strains are now resistant to standard antibiotics such as methicillin and vancomycin [5]. The occurrence of multi-drug resistant bacteria becomes a severe med-

ical setback in hospital and community settings [2]. Among them, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP), and vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) are leading concerns [6,7]. Even though the MRSA occurs naturally in the human flora of skin and especially nasal mucosa, it is an opportunistic pathogen frequently found in nosocomial infections that may lead to severe infections, including septicemias [8]. Therefore, the synthesis of new lead structures and chemical entities for the development of antimicrobial agents with unprecedented mode of actions is an important task in medical field.

Chalcones are a plethora of natural and synthetic compounds, which present a reactive  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl system into their structures. This particularity generates a wide spectrum of biological activities including anti-inflammatory [9,10], antioxidant [11,12], antitumor [13–15], antidiabetic [16], or antimicrobial [17]. As electrophilic scaffolds, chalcones are easily converted into

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [makhloufi\\_malika@yahoo.fr](mailto:makhloufi_malika@yahoo.fr) (M. Makhloufi-Chebli), [jb.behr@univ-reims.fr](mailto:jb.behr@univ-reims.fr) (J.-B. Behr).

more elaborated therapeutically important heterocyclic molecules [12,18]. Natural or synthetic analogues of chalcone, such as oxime-like derivatives, have been reported to exhibit various antimicrobial [19,20], antifungal [20] and tyrosinase inhibitory activities, respectively [21,22]. As previously reported, many compounds with oxime groups display potent biological activities and low toxicities [22,23]. Some of them have been used as clinical medical agents and some have been reported as acetylcholinesterase inhibitors [24].

Based on our previous work [25], we investigated further the potential of biological active molecules of natural origin. Therefore, in this work, we describe the synthesis of a series of chalcones from 4-acetylpyridine and a new series of chalcone-oximes and their evaluation as antimicrobial agents against a series of bacterial and fungal strains, in view of existing activities for analogous structures. Most of the chalcones are known compounds [26], however, their biological activity was not evaluated yet. Furthermore, all of the oximes are unknown. In addition, the synthesized compounds were evaluated for their antioxidant activity by the DPPH<sup>•</sup> method. Finally, since oximes are known to counteract the negative effects of nerve agents by means of their potent affinity for acetylcholinesterase, molecular docking and molecular dynamics experiments were conducted with new oximes **4** to assess their affinities with an acetylcholinesterase and predict their potential to restore the enzymatic activity.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials and methods

All reagents were purchased from Aldrich. They were of analytical grade and were used without further purification. Melting points were determined on a Stuart scientific SPM3 apparatus fitted with a microscope and are uncorrected. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in DMSO-d<sub>6</sub> or in CDCl<sub>3</sub> solutions on Bruker Avance 300 (300.13 MHz for <sup>1</sup>H and 75.47 MHz for <sup>13</sup>C) or on Bruker Avance Neo 500 (500.28 MHz for <sup>1</sup>H, 125.8 MHz for <sup>13</sup>C) spectrometer. Chemical shifts are expressed in parts per million ( $\delta$ , ppm). They were recorded relative to solvent signal or TMS signal. The coupling constants (*J*) are given in hertz (Hz) and splitting pattern abbreviations are: s, singlet; app s, apparent singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet. Mass spectra are obtained with ESI. Positive-ion ESI mass spectra were acquired using a Q-TOF 2 instrument, sample solution (10<sup>-5</sup> M) in 200  $\mu$ L of 0.1% trifluoroacetic acid/methanol. Nitrogen was used as nebulizer gas and argon as collision gas. The needle voltage was set at 3000 V, with the ion source at 80°C and desolvation temperature at 150°C. Cone voltage was 35 V. Samples were alternatively analyzed by ESI/Q-TOF HRMS method. The MS analysis was performed on a Waters SYNAPT G2-Si High Resolution Mass Spectrometry equipped with electrospray ionization source ESI (Waters Corp., Manchester, UK). Mass detection was conducted in positive ion mode, with the source temperature at 100°C, capillary voltage and cone voltage were set at 3 kV and 40 V. The desolvation gas was optimized to 600 L/h, the cone gas flow at 50 L/h and the scan range was from 50 to 1600 m/z. Analysis were realized in infusion mode, mass was corrected during acquisition using external reference (Lock-Spray) of 1 ng/ $\mu$ L solution of leucine enkephalin at a flow rate of 10  $\mu$ L/min. All data collected were acquired using MassLynxTM (V4.1) software in centroid mode.

### 2.2. General procedure for the synthesis of compounds (3a-j)

**Method A** [26]: To a cooled solution of 10 % NaOH, 1.0 equiv of liquid aldehydes was added. To this solution 1.0 equiv of 4-acetylpyridine was added dropwise over a 30 min period. The solution

was maintained at 0°C for an hour and then was allowed to stir at rt. After some time a solid separated out. The solution was further stirred for about 1h. The solid was filtered off and then recrystallized from methanol or ethanol to give crystals of the chalcone.

**Method B** [26]: In the case of aldehydes in a solid state, the aldehyde (1 equiv) was first dissolved in minimum quantity of ethanol or methanol (approx 10 mL) and then 10 % NaOH solution (approx 100 mL) was added to give a clear solution. The solution was cooled up to 0°C by applying ice bath below it. Then 1 equiv of 4-acetylpyridine was added dropwise over 30 min. The solution was maintained at 0°C for 1h and then was allowed to stir at room temperature. After some time a solid started separating out. This was stirred for about an hour. The solid was filtered off and then recrystallized from methanol or ethanol to give crystals of the chalcones.

**Method C** [27]: Indole-3-carboxaldehyde (1 equiv) was reacted with 4-acetylpyridine (1 equiv) in presence of piperidine (0.5 equiv) using methanol as solvent. The reaction mixture was stirred under reflux for 16 hours. After the completion of the reaction, yellow-orange colored precipitate was filtered, washed, dried and recrystallized from ethanol-dichloromethane to furnish precursor (**3j**).

#### 2.2.1. (E)-1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophen-2-yl)prop-2-en-1-one (3a)

Compound **3a** was obtained from 4-acetylpyridine and thiophene-2-carbaldehyde, using procedure A.

Pistachio crystalline powder; Yield: 62 %; m.p: 103-105°C (lit.[28] mp: 98-100°C); FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3075 (aromatic C-H), 1662 (C=O), 1579 (aromatic C=C), 1413 (C=N), 965 (-CH=CH- trans), 709 (C-S); UV/Vis:  $\lambda$ abs (CHCl<sub>3</sub>)/nm 355- 242; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7.23 (dd, *J*=3.7Hz, *J*=5.0Hz, 1H, ArH-thio), 7.51 (d, *J*=15.4 Hz, 1H, =CH), 7.76 (m, 1H, ArH-thio), 7.86 (m, 1H, ArH-thio), 7.94 (m, 2H, ArH-py), 7.98 (m, 1H, =CH), 8.84 (m, 2H, ArH-py); <sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  119.84, 121.50, 128.88, 131.44, 133.76, 138.38, 139.41, 143.58, 150.74, 188.72; MS (ESI+): m/z = 216,10 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

#### 2.2.2. (E)-1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophen-3-yl)prop-2-en-1-one (3b)

Compound **3b** was obtained from 4-acetylpyridine and thiophene-3-carbaldehyde, using procedure A.

Brown crystalline powder; Yield: 70 %; m.p: 110-112°C; FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3095 (aromatic C-H), 1662 (C=O), 1585 (aromatic C=C), 1543 (C=N), 987 (-CH=CH-trans), 781 (C-S); UV/Vis:  $\lambda$ abs: (CHCl<sub>3</sub>)/nm 329-240; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7.70 (m, 1H, ArH-thio), 7.71 (d, *J*=15.4 Hz, 1H, =CH), 7.79 (m, 1H, ArH-thio) 7.83 (d, *J*=15.4 Hz, 1H, =CH), 7.97 (m, 2H, ArH-py), 8.19 (m, 1H, ArH-thio), 8.85 (m, 2H, ArH-py); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  120.92, 121.44, 125.16, 127.38, 130.36, 137.70, 140.00, 144.39, 150.75, 189.99; MS (ESI+): m/z = 216,10 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

#### 2.2.3. (2E,4E)-1-phenyl-5-(pyridin-4-yl)penta-2,4-dien-1-one (3c)

Compound **3c** was obtained from 4-acetylpyridine and 3-phenylacrylaldehyde, using procedure A.

Green crystalline powder; Yield: 72 %; m.p: 95-98°C; FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3046 (aromatic C-H), 1651 (C=O), 1576 (aromatic C=C), 1417 (C=N), 1007 (-CH=CH- trans), 699 (C-H bending vibration of deformation of benzene ring 5 adjacent hydrogens atoms); UV/Vis:  $\lambda$ abs (CHCl<sub>3</sub>)/nm 354-242; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7.26-7.35 (3H, (1H, =CH) (2H, Ar-H)), 7.37- 7.48 (m, 3H, (2H, =CH), (1H Ar-H)), 7.54- 7.66 (m, 3H, (1H, =CH) (2H Ar-H)), 7.85 (m, 2H, ArH-py), 8.84 (m, 2H, ArH-py); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  121.35, 124.98, 127.03, 127.44, 128.98, 129.51, 135.84, 143.04, 143.77, 146.20, 150.77, 189.29; MS (ESI+): m/z = 236,20 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

#### 2.2.4. (E)-3-phenyl-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one (3d)

Compound **3d** was obtained from 4-acetylpyridine and benzaldehyde, using procedure A.

Fine yellowish powder; Yield: 75 %; m.p: 175-177°C (lit.[26] mp: 172-174°C); FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3055 (aromatic C-H), 1663 (C=O), 1595 (aromatic C=C), 1446 (C=N), 984 (-CH=CH- trans), 686 (C-H bending vibration of deformation of benzene ring 5 adjacent hydrogens atoms); UV/Vis: λ<sub>abs</sub>(CHCl<sub>3</sub>)/nm 316-242; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.42 (d, J=15.8Hz, 1H, =CH), 7.41-7.48 (m, 3H, ArH), 7.62- 7.68 (m, 2H, Ar-H), 7.79 (m, 2H, ArH-py), 7.83 (d, J= 15.8 Hz, 1H, =CH), 8.84 (m, 2H, ArH-py); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 121.27, 121.80, 128.86, 129.25, 131.40, 134.40, 144.84, 147.14, 150.60, 189.87; HRMS (ESI+): m/z = 210,0920 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

#### 2.2.5. (E)-3-(4-methoxyphenyl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one (3e)

Compound **3e** was obtained from 4-acetylpyridine and 4-methoxybenzaldehyde, using procedure B.

Yellow crystalline powder; Yield: 75 %; m.p: 115-117°C (lit.[26] mp: 104-106°C); FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3060 (aromatic C-H), 1658 (C=O), 1588 (aromatic C=C), 1508 (C=N), 987 (-CH=CH- trans), 813 (C-H bending vibration of p-disubstituted benzene ring (-OCH<sub>3</sub>)); UV/Vis: λ<sub>abs</sub>(CHCl<sub>3</sub>)/nm 352-242; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.04 (m, 2H, Ar-H), 7.77 (m, 2H, =CH), 7.89 (m, 2H, Ar-H), 7.99 (m, 2H, ArH-py), 8.84 (m, 2H, ArH-py); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 55.44, 114.50, 119.03, 121.56, 127.00, 131.20, 143.90, 145.77, 150.72, 161.79, 188.92; MS (ESI+): m/z = 240,20 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

#### 2.2.6. (E)-3-(4-nitrophenyl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one (3f)

Compound **3f** was obtained from 4-acetylpyridine and 4-nitrobenzaldehyde, using procedure B.

Fine grey powder ; Yield: 83 %; m.p: 170-172°C (lit.[29] mp: 187-189°C); FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3130 (aromatic C-H), 1698 (C=O), 1581 (aromatic C=C), 1508 (C=N), 1000 (-CH=CH- trans), 1348 (C-NO<sub>2</sub>), 816 (C-H bending vibration of p-disubstituted benzene ring); UV/Vis: λ<sub>abs</sub> (CHCl<sub>3</sub>)/nm 284; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 5.82 (m, 1H, =CH), 7.71 (d, J= 9.0 Hz, 2H, ArH-NO<sub>2</sub>), 7.83-7.86 (m, 2H, ArH-py), 8.19- 8.31 (m, 2H, ArH-NO<sub>2</sub>), 8.28 (m, 1H, =CH), 8.79- 8.81 (m, 2H, ArH-py); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 121.57, 123.75, 124.41, 127.68, 141.23, 143.17, 147.03, 151.24, 150.85, 192.04; MS (ESI+): m/z = 554.70 [2M+ 2 Na]<sup>+</sup> (100%).

#### 2.2.7. (E)-3-(3-nitrophenyl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one (3g)

Compound **3g** was obtained from 4-acetylpyridine and 3-nitrobenzaldehyde, using procedure B.

Fine off-white powder; Yield 73 %; m.p: 180-182°C; FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3036 (aromatic C-H), 1667 (C=O), 1605 (aromatic C=C), 1520 (C=N), 995 (-CH=CH- trans), 1342 (C-NO<sub>2</sub>), 813 (C-H bending vibration of deformation of disubstituted benzene ring); UV/Vis: λ<sub>abs</sub> (CHCl<sub>3</sub>)/nm 296- 241; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/drops of CH<sub>3</sub>OD): δ 7.55 (d, J=15.8Hz, 1H, =CH), 7.63 (t, J=8.0Hz, 1H, ArH-NO<sub>2</sub>), 7.85 (m, 2H, ArH-Py), 7.86 (m, 1H, =CH), 7.93 (d, J=8.0 Hz, 1H, ArH-NO<sub>2</sub>) 8.28 (m, 1H, ArH- NO<sub>2</sub>), 8.51 (m, 1H, ArH-NO<sub>2</sub>), 8.86 (m, 2H, ArH-Py) <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>/drops of CH<sub>3</sub>OD): δ 121.94, 122.75, 123.57, 125.42, 130.36, 134.64, 136.06, 143.95, 144.34, 148.88, 150.45, 189.03 ; HRMS (ESI+) m/z calcd for C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>[M+H]<sup>+</sup> 255.0770 found 255.0770.

#### 2.2.8. (E)-3-(4-chlorophenyl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one (3h)

Compound **3h** was obtained from 4-acetylpyridine and 4-chlorobenzaldehyde, using procedure B.

Light green crystalline powder; Yield: 72 %; m.p: 143-145°C (lit.[30] mp: 139-141°C); FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3027 (aromatic C-H), 1671 (C=O), 1581 (aromatic C=C), 1486 (C=N), 978 (-CH=CH- trans), 811 (C-H bending vibration of p-disubstituted benzene ring (C-Cl)); UV/Vis: λ<sub>abs</sub> (CHCl<sub>3</sub>)/nm 320-242; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):

δ 7.56 (d, J=8.5Hz, 2H, ArH-Cl), 7.80 (d, J=15.7Hz, 1H, =CH), 7.94 (d, J=15.7Hz, 1H (1H, =CH)), 7.97 (d, J=8.5Hz, 2H, ArH-Cl) 8.01 (m, 2H, ArH-py), 8.86 (m, 2H, ArH-py); <sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 122.08, 122.74, 129.49, 131.32, 133.80, 136.07, 143.89, 144.63, 151.26, 185.58; MS (ESI+): m/z = 244.1 [M+H, <sup>35</sup>Cl]<sup>+</sup> (100%) , 246.10 [M+H, Cl<sup>37</sup>]<sup>+</sup> (33.3%).

#### 2.2.9. (E)-3-(2,6-dichlorophenyl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one (3i)

Compound **3i** was obtained from 4-acetylpyridine and 2,6-dichlorobenzaldehyde, using procedure B.

Fine off-white powder; Yield: 70%; m.p: 100-102°C; FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3087 (aromatic C-H), 1679 (C=O), 1575 (aromatic C=C), 1376 (C=N), 969 (-CH=CH- trans), 825 (C-H bending vibration of disubstituted benzene ring (C-Cl)); UV/Vis: λ<sub>abs</sub>(CHCl<sub>3</sub>)/nm : 260; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.47 (dd, J=7.4Hz, J=8.7Hz, 1H, ArH-Cl), 7.62 (m, 2H, ArH-Cl), 7.77 (app s, 2H,=CH), 7.92 (m, 2H, ArH-py), 8.87 (m, 2H, ArH-py); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 121.55, 129.18, 129.95, 131.36, 131.66, 134.20, 138.43, 142.80, 150.96, 189.26; MS (ESI+): m/z = 278.1 [M+H, <sup>35</sup>Cl]<sup>+</sup> (100%), 280.1 [M+H, Cl<sup>37</sup>]<sup>+</sup> (63.9%).

#### 2.2.10. (2E)-3-(1H-indol-3-yl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-on (3j)

Compound **3j** was obtained from 4-acetylpyridine and 1H-indole-2-carbaldehyde, using procedure C.

Fine orange-yellow powder; Yield: 90 %; m.p: 264-266°C (lit.[27] mp: 266-268°C); FT-IR (cm<sup>-1</sup>): 3039 (N-H), 1648 (C=O), 1607 (C=C); UV/Vis: λ<sub>abs</sub> (DMSO)/nm : 405; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 7.22- 7.29 (m, 2H, Indol), 7.50-7.53 (m, 1H, Indol), 7.60 (d, 1H, J=15.6 Hz, =CH), 7.98 (m, 2H, ArH-py), 8.09-8.18 (m, 3H, (1H, =CH), (2H, Indol)), 8.83 (m, 2H, ArH-py), 12.02 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 113.04, 113.35, 115.21, 121.02, 121.88, 121.94, 123.39, 125.55, 134.89, 138.12, 141.33, 145.23, 151.07, 188.89; MS (ESI+): m/z = 249.10 [M+1]<sup>+</sup>.

### 2.3. General procedure for the synthesis of compounds 4

A mixture of substituted chalcones **3** (2 mmol), hydroxylamine hydrochloride (4 mmol) and anhydrous sodium acetate (4 mmol) in ethanol was refluxed for 2-5 h. After completion of the reaction, the mixture was cooled and poured into ice cold water. The resulting solid product **4** was filtered, washed with sufficient cold water, dried and purified by recrystallization from diluted ethanol (40%).

#### 2.3.1. (1Z,2E)-1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophen-2-yl)prop-2-en-1-one oxime (4a)

Compound **4a** was obtained from 1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophen-2-yl)prop-2-en-1-one and hydroxylamine hydrochloride, using the procedure described above.

Yellow crystalline powder; mp: 210-212°C; Yield : 42 % ; UV/Vis: λ<sub>abs</sub> (DMSO)/nm : 324; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.11 (dd, J=3.6Hz, J=5.0 Hz, 1H, ArH-thio), 7.14-7.24 (m, 2H, =CH), 7.33 (m, 1H, ArH-thio), 7.65 (d, J= 5.0 Hz, 1H, ArH-thio), 8.04 (m, 2H, ArH-py), 8.91 (m, 2H, ArH-py), 12.68 (s, 1H, NOH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 114.07, 125.72, 128.27, 128.46, 130.18, 131.15, 140.86, 143.41, 150.08, 151.92; HRMS (ESI+) m/z calcd for C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 231.0592 found 231.0592

#### 2.3.2. (1Z,2E)-1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophen-3-yl)prop-2-en-1-one oxime (4b)

Compound **4b** was obtained from 1-(pyridin-4-yl)-3-(thiophen-3-yl)prop-2-en-1-one and hydroxylamine hydrochloride, using the procedure described above.

Grey crystalline powder; mp: 203-205°C; Yield : 47 % ; UV/Vis: λ<sub>abs</sub> (DMSO)/nm : 299; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.02 (d, J=16.9 Hz, 1H, =CH), 7.32 (d, J= 16.9 Hz, 1H, =CH), 7.54 (m, 1H, ArH-thio), 7.62 (m, 1H, ArH-thio), 7.76 (m, 1H, ArH-thio), 8.07

(m, 2H, ArH-py), 8.91 (m, 2H, ArH-py), 12.64 (s, 1H, NOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  115.15, 125.26, 125.66, 127.20, 127.64, 132.45, 138.84, 143.16, 150.63, 152.23; HRMS (ESI+)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{OS}$  [M+H] $^+$  231.0592 found 231.0594.

### 2.3.3. (1Z,2E,4E)-5-phenyl-1-(pyridin-4-yl)penta-2,4-dien-1-one oxime (4c)

Compound **4c** was obtained from 1-phenyl-5-(pyridin-4-yl)penta-2,4-dien-1-one and hydroxylamine hydrochloride, using the procedure described above.

Light yellow crystalline powder, mp: 233-235°C; Yield: 40 %; UV/Vis:  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 329;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  6.84(d,  $J=15.7\text{Hz}$ , 1H, =CH), 6.82 (m, 1H, =CH), 7.07 (d,  $J=16.0\text{Hz}$ , 1H, =CH), 7.22 (dd,  $J=10.7\text{Hz}$ ,  $J=15.5\text{Hz}$ , 1H, =CH), 7.29 (m, 1H, ArH), 7.37 (m, 2H, ArH), 7.53 (m, 2H ArH), 8.05 (m, 2H, ArH-py), 8.93 (m, 2H, ArH-py), 12.68 (s, 1H, NOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  118.86, 125.73, 126.90, 128.57, 128.80, 136.30, 137.57, 138.86, 142.90, 150.80, 152.15; HRMS (ESI+)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$  [M+H] $^+$  251.1184 found 251.1186.

### 2.3.4. (1Z,2E)-3-(4-methoxyphenyl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one oxime (4e)

Compound **4e** was obtained from 3-(4-methoxyphenyl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one and hydroxylamine hydrochloride, using the procedure described above.

White crystalline powder, mp: 227-229°C; Yield: 47 %; UV/Vis:  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 319;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3.78 (s, 3H, OCH $_3$ ), 6.93 (d,  $J=17.0\text{Hz}$ , 1H, =CH), 6.97 (m, 2H, ArH-OCH $_3$ ), 7.35 (d,  $J=17.0\text{Hz}$ , 1H =CH), 7.57 (m, 2H, ArH-OCH $_3$ ), 8.08 (m, 2H, ArH-py), 8.92 (m, 2H, ArH-py), 12.60 (s, 1H, NOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  55.28, 113.18, 114.36, 125.79, 128.24, 129.04, 137.77, 142.90, 150.93, 152.34, 160.34; HRMS (ESI+)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$  [M+H] $^+$  255.1134 found 255.1133.

### 2.3.5. (1Z,2E)-3-(4-chlorophenyl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one oxime (4h)

Compound **4h** was obtained from 3-(4-chlorophenyl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one and hydroxylamine hydrochloride, using the procedure described above.

White powder; mp: 230-232°C; Yield: 46 %; UV/Vis:  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 301;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.02 (d,  $J=16.9\text{Hz}$ , 1H, =CH), 7.46 (m, 2H, ArH-Cl), 7.48 (d,  $J=16.9\text{Hz}$ , 1H, =CH), 7.66 (m, 2H, ArH-Cl) 8.12 (m, 2H, ArH-py), 8.94 (m, 2H, ArH-py) 12.85 (s, 1H, NOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  116.24, 125.78, 128.91, 129.17, 133.82, 134.68, 136.75, 142.63, 150.86, 151.80; HRMS (ESI+)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OCl}$  [M+H] $^+$  259.0638 found 259.0636.

### 2.3.6. (2E)-3-(2,6-dichlorophenyl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one oxime (4i)

Compound **4i** was obtained from 3-(2,6-dichlorophenyl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one and hydroxylamine hydrochloride, using the procedure described above.

Mixture of (E) and (Z) oximes, white powder; mp: 220-222°C; Yield: 44 %; UV/Vis:  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 277;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  6.37 (d,  $J=16.9\text{Hz}$ , 0.4H =CH $^{\text{oxim-b}}$ ), 6.96 (d,  $J=17.2\text{Hz}$ , 1H, =CH $^{\text{oxim-a}}$ ), 7.06 (d,  $J=16.9\text{Hz}$ , 0.4H =CH $^{\text{oxim-b}}$ ), 7.34 (m, 0.4H, Ar-H $^{\text{oxim-b}}$ ), 7.37 (d,  $J=17.3\text{Hz}$ , 1H, =CH $^{\text{oxim-a}}$ ), 7.40 (m, 1H, ArH $^{\text{oxim-a}}$ ), 7.52 (m, 0.8H, Ar-H $^{\text{oxim-b}}$ ), 7.57 (m, 2H, Ar-H $^{\text{oxim-a}}$ ), 7.91(m, 0.8 H, ArH-py $^{\text{oxim-b}}$ ), 8.12 (m, 2H, ArH-py $^{\text{oxim-a}}$ ), 8.96 (m, 2H, ArH-py $^{\text{oxim-a}}$ ), 9.00 (m, 0.8 H, ArH-py $^{\text{oxim-b}}$ ), 12.26 (s, 0.4H, NOH $^{\text{oxim-b}}$ ), 13.00 (s, 1H, NOH $^{\text{oxim-a}}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  124.15, 125.29, 126.40, 128.86, 128.97, 129.01, 130.11, 130.51, 131.92, 132.59, 132.68, 132.92, 133.40, 133.55, 143.20, 144.14, 146.83, 149.83, 151.23, 152.80; HRMS (ESI+)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{OCl}_2$  [M+H] $^+$  293.0248 found 293.0248.

## 2.4. General procedure for the synthesis of compound 5

A mixture of substituted chalcone **3j** (2 mmol), hydroxylamine hydrochloride (4 mmol) and anhydrous sodium acetate (4 mmol) in ethanol was refluxed for 13 h. After completion of the reaction, the reaction mixture was cooled. The resulting pale green solid product was filtered, washed with sufficient cold water, dried and purified by recrystallization from methanol.

### 3-(3-(pyridin-4-yl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)-1H-indole (5j)

Compound **5j** was obtained from 3-(1H-indol-3-yl)-1-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-on and hydroxylamine hydrochloride, using the procedure described above.

Light green powder; mp: 236-238°C; Yield: 93%; UV/Vis:  $\lambda_{\text{abs}}$  (DMSO)/nm : 278;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3.74 (dd,  $J=9.5\text{Hz}$ ,  $J=17.3\text{Hz}$ , 1H, CH $_2$ ), 3.88 (dd,  $J=11.3\text{Hz}$ ,  $J=17.3\text{Hz}$ , 1H, CH $_2$ ), 6.21 (dd,  $J=9.9\text{Hz}$ ,  $J=11.1\text{Hz}$ , 1H, CH), 7.00 (m, 1H, Indol), 7.13 (m, 1H, Indol), 7.42(m, 1H, indol), 7.44 (m, 1H, Indol), 7.56 (d,  $J=2.5\text{Hz}$ , 1H, Indol), 8.20 (m, 2H, ArH-py), 8.95 (m, 2H, ArH-py), 11.33 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  37.77, 79.83, 111.99, 112.61, 118.67, 119.22, 121.66, 123.12, 124.85, 125.21, 136.85, 143.78, 154.96; HRMS (ESI+)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$  [M+H] $^+$  264.1137 found 264.1136.

## 2.5. Biological screening

Biological activities of the prepared compounds were evaluated in view of existing activities for analogous structures. Indeed, chalcones are potential antibacterial and antifungal agents according to the literature [11,12,17], whereas oximes are rather known to display antifungal effect [20-b]. For this reason we checked chalcones against bacterial and fungal strains and oximes only against fungi.

### 2.5.1. In vitro antimicrobial activity

Antimicrobial activity was investigated at the microbiology department of the University Hospital of Tizi-Ouzou, Algeria.

Compounds were tested *in vitro* against microorganisms by the disc diffusion method [31] using Gram-positive bacteria such as *S. aureus* (ATCC 25923), Gram-negative bacteria such as *E. coli* (ATCC 25923) and *P. aeruginosa* (ATCC 27853), and the fungal species *A. niger*, *C. albicans* (ATCC 7102). Mueller Hinton agar and Sabouraud dextrose agar media were used for antibacterial and antifungal activity respectively.

The concentration of 5.12 mg/mL of the tested compounds was prepared in DMSO and 20  $\mu\text{L}$  of each sample was taken and soaked in 6.0 mm diameter paper discs, the discs were placed on previously seeded plates. The inoculated Petri dishes were prepared using the spore suspension of  $10^6$  cfu/mL (colony forming unit /mL) previously prepared in sterile physiological water at 0.9 %, with an optical density of 0.08 read at 625 nm. Plates were inoculated with filamentous fungi *A. niger* and incubated at 25°C for six days; *C. albicans* was incubated at 37°C for 24-48 h and Gram positive *S. aureus* and Gram negative *E. coli*, *P. aeruginosa* were incubated at 35-37°C for 24-48 h.

The clear area around each disc was measured in mm. Standard Rifampicin, Cotrimoxazole, Colistin (antibacterial agent) and Fluconazole (antifungal agent) discs were used as positive controls for antimicrobial testing. All experiments were performed in triplicate and the data represent the mean value.

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were measured for compounds that exhibited significant zones of inhibition, using the double serial dilution technique. The synthesized compounds were prepared in a concentration range of 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 and 3.91  $\mu\text{g/mL}$ . Microdilution susceptibility test was performed in Sabouraud dextrose agar for antifungal activity. MIC

is defined as the lowest concentration that showed no microbial growth.

### 2.5.2. Antioxidant activity studies

The methods and instruments used to measure the activity of antioxidants have made remarkable progress in the past few decades. Early methods measured the efficiency of the antioxidants against the formation of particular species of oxidation products. Thus far, various chemical tests coupled with highly sensitive and automated detection technologies have been used to evaluate antioxidant activity, such as scavenging activity against different types of free radicals (DPPH<sup>•</sup>), reducing power and metal chelation, among others.

A number of tests are available for the direct measurement of the transfer of the hydrogen atom or the transfer of electrons from antioxidants to free radicals. The antioxidant activities reported in this method group are generally associated with their capacity to neutralize certain types of radical species, out of which some may be artificial and biologically irrelevant. The data regarding the hydrogen atom transfer or the data regarding the donating capacity of the electrons obtained by these methods provide important information on their intrinsic antioxidant potential with minimal environment interference. The method used must have a defined endpoint and chemical mechanism [32].

The DPPH test is a simple technique and requires only a Vis spectrophotometer or an electronic paramagnetic resonance (EPR) spectrometer. However, DPPH<sup>•</sup> is not a natural radical but the mechanism of reaction with antioxidants is similar to that with peroxy radicals ROO<sup>•</sup> [32].

The neutralization DPPH test is based on donating electrons from the antioxidants in order to neutralize the DPPH radical. The reaction is accompanied by changing the DPPH colour measured at 517 nm, and discoloration acts as an indicator of antioxidant activity. Antioxidant activity by the DPPH neutralization method is often reported as EC<sub>50</sub>, which is defined as the efficient concentration of the antioxidant necessary to reduce the initial DPPH concentration by 50%. In addition, TEC<sub>50</sub> may be used, which is the necessary time to reach the equilibrium state with EC<sub>50</sub> [33,34].

The DPPH radical scavenging capacity was measured from the bleaching of purple coloured ethanol solution of DPPH<sup>•</sup> according to the method described by L.L. Mensor *et al.*, J.S. Lee *et al.* [33,34]. DPPH<sup>•</sup> stock solution was prepared by dissolving 4 mg DPPH<sup>•</sup> in 100 mL ethanol. Compounds **3**, **4** and **5j** were dissolved in DMSO to obtain a solution of 10<sup>-1</sup> M. Test compounds were diluted further with DMSO to get final concentrations of 0.05, 0.025 and 0.0125 mol/l for all the compounds, whereas the standard (ascorbic acid, AA) was diluted to 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.003125, 0.0015625 mol/L solutions respectively. Wells were loaded with 40 µL of tested sample and then with 2 mL of DPPH<sup>•</sup> solution, all assays being carried out in triplicate. Negative control wells were loaded with 40 µL of DMSO and 2 mL of DPPH<sup>•</sup> solution. After vortexing, the mixtures were incubated at room temperature for 1 h in darkness at 25°C, and then the absorbance of the plate was recorded at 517 nm. A blank containing only ethanol with DMSO was used as the control. Each measurement was performed in triplicate.

### 2.6. In silico Blood-brain barrier prediction

Oximes are known to be antidotes that are used against nerve agents [35] by penetrating through the Blood-Brain barrier. Thus, we used SwissADME web server [36] to estimate the power of Blood-Brain barrier penetration of our synthesized compounds. In addition, the studied compounds were subjected to drug likeness properties study using Lipinski's rule of five.

## 2.7. Molecular docking studies

### 2.7.1. Input data preparation

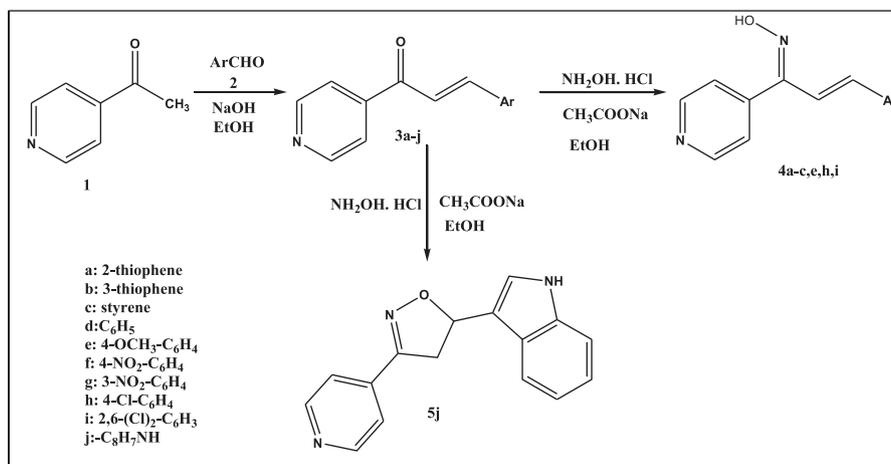
It has been previously reported that organophosphorus insecticides and nerve agents inhibit the enzyme acetylcholinesterase by covalently bonding to the catalytic serine residue of the enzyme. The role of oxime-based reactivators, is to restore the organophosphate-inhibited enzymatic activity by cleaving the phosphorous conjugate [37]. These compounds act as agonists of acetylcholine esterase. We wished to evaluate the potential of our own oximes to act as such. The usual way to evaluate the possibility for a given oxime to displace an organophosphorous inhibitor from the active site is an in silico calculation and molecular dynamics simulations. Thus, the crystal structures of *Mus musculus* acetylcholinesterase inhibited by the insecticide fenamiphos (fep-mAChE) with PDB ID 2WU4 and resolution of 2.40 Å was downloaded from the RCSB protein data bank and was used for molecular docking study. Thus, the protein was prepared by deleting the substrate cofactors, the crystallographic water molecules, and the co-crystallized ligand Ortho-7 (HBP). Only one monomer was selected and the active site of protein was identified by selecting all residues located at 6 Å from the center of the crystal pose. Thus, the residues Trp86, Tyr341, His447, Phe338, Ile294, Asp74, Trp286, Tyr72, Glu285, Phe297 and Tyr124 were treated as catalytic residues during the docking simulations [38]. On the other hand, the 2D structures of the synthesized compounds and experimental ligand HBP were drawn using MarvinSketch software [39] and were used as flexible ligands during the molecular docking simulation.

### 2.7.2. Docking procedure

All synthesized compounds were docked into the active site of selected fep-mAChE protein by employing the iGEMDOCK program [40]. Thus, the compounds imported as docking library and the scoring function used was GEMDOCK score. In the docking algorithm, the population size taken was 1000 with 100 generations and 50 numbers of solutions. The resulting dock pose of each ligand docked into protein was analyzed for their hydrogen bond interactions with the receptor and were visualized using AutoDoTools software [41] and Accelrys Discovery Studio Visualizer software version 4.1 [42].

## 2.8. Molecular dynamics studies

In order to evaluate the stability of studied compounds, the docked conformations with low docking energies were submitted to 20 ns of molecular dynamics simulations [43]. Thus, the Nano Molecular Dynamics software NAMD 2.12 [44] with CHARMM 36 force field was used during the MD simulations. Ligands topologies and parameters were generated using the CHARMM General Force Field (CGenFF) web server. All complexes were solvated in a cubic TIP3P water box of edge length 7 Å and then neutralized and set the concentration of NaCl to the physiological value of 0.15 mol/L [45]. The long/shot contribution interactions were modeled using the particle mesh Ewald (PME) method [46] with a 12 Å nonbonded cutoff and a grid spacing of 1 Å. Periodic boundary conditions (PBCs) [47] were used and temperature and pressure were maintained constant using Langevin thermostat (310 K) and Langevin barostat (1 atm), respectively. Then, the three systems underwent 7000 steps of steepest-descent energy minimization to remove atomic overlaps or improper geometries. After this, studied systems were equilibrated for 100 ps under the constant number of particles, pressure and temperature (NPT). Finally, the obtained systems were submitted to 20 ns of molecular dynamics using 2 fs time steps. Obtained results were visualized and analyzed using VMD software [48].



Scheme 1. Synthesis route of oximes chalcones and isoxazoline derived from indole.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Chemistry

In this work, six chalcone oximes (**4a-c, e, h, i**) and one isoxazoline derived from indole (**5j**) were successfully synthesized from the chalcones (**3a-c, e, h, i**) obtained from Claisen-Schmidt condensation by reacting 4-acetylpyridine with different types of aromatic aldehyde substituents under basic conditions [26]. The chalcone (**3j**) was synthesized by piperidine catalyzed Knoevenagel condensation by reacting 4-acetylpyridine with indole-3-carbaldehyde [27]. All the synthesized compounds were characterized by NMR and high and low resolution mass spectrometry. The synthesized compounds were evaluated *in-vitro* for their biological potency against various microorganisms and for their antioxidant potency. The synthesis pathway for these products is described below (Scheme 1).

In order to optimize the most conceivable and cost-effective reaction conditions, we performed several trials by varying the reaction conditions as reported in the literature for 3-acetylpyridine derivatives [49]. We initiated the synthesis of chalcone by reacting 4-*N,N*-dimethylbenzaldehyde with 4-acetylpyridine in an alcoholic medium at room temperature or at reflux [30] for a period of time, in the presence of sodium hydroxide or potassium hydroxide as a base according to the Claisen-Schmidt condensation elaborated in Scheme 1. After several assays, we concluded that 4-acetylpyridine reacts differently to acetophenone. The chalcone was formed when 4-acetylpyridine was added dropwise to the alcoholic mixture (ethanol or methanol) containing the aldehyde and 10% aqueous NaOH, confirming this work. [26].

Unlike the other chalcones which afforded the expected oximes, chalcone (**3j**) synthesized from indole-3-carboxaldehyde reacted differently in the presence of hydrochlorinated hydroxylamine and sodium acetate. In this case, further cyclization occurred to afford isoxazoline **5j**, the structure of which was well established by 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) and 2D NMR, and the chalcone-oxime (**4j**) is a non-isolatable intermediate.

The structures and purities of the resulting products **4** and **5j** were deduced from their NMR data and mass spectrometry. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound **4** shows a singlet around  $\delta_{\text{H}} = 12.60$  ppm which is attributed to the proton resonance of OH of the oxime group. In the case of **5j**, a singlet appeared at  $\delta_{\text{H}} = 11.33$  ppm, attributed to a proton of isoxazoline ring. The disappearance of the carbonyl peak of chalcone at 189-190 ppm and the supply of a new peak at 152-153 ppm corresponding to C=N of an oxime confirms the formation of this later.

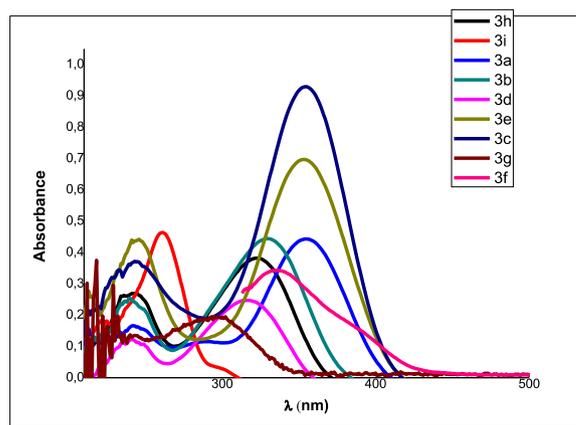


Fig. 1. UV-Visible spectra of chalcones **3** at  $3 \times 10^{-5}$  M ( $\text{CHCl}_3$ ).

#### 3.2. Spectroscopic study of chalcones (**3**) and oximes (**4**), effect of the substituent on the UV-visible spectrum

With the exception of compounds **3i**, **3f** the absorption spectrum of all chalcones shows two bands. a low band ranging from 240 to 244 nm corresponding to the  $\pi-\pi^*$  transition which can only be attributed to the imine group ( $\text{C}=\text{N}$ , aromatic) of pyridine [50] and another very intense band ranging from 260 to 355 nm, attributed to the  $\pi-\pi^*$  transition belonging to the carbonyl group Fig. 1 and Table 1. In addition, the absorption spectra of oximes **4** show a single band ranging from 279 to 317 (Fig. 2, Table 1) which indicates the disappearance of the carbonyl group and the appearance of a new chromophore, which is the oxime. A hypsochromic effect is observed when passing from the chalcone to the corresponding oxime. Moreover, these results showed that the absorption wavelengths were influenced by the nature and the position of the substituents on the benzene ring.

The nature of the substituent affects absorption intensities much more than wavelengths. The presence of donor groups by mesomeric effect leads to an increase in absorption intensities (hyperchromic effect) unlike attractant groups.

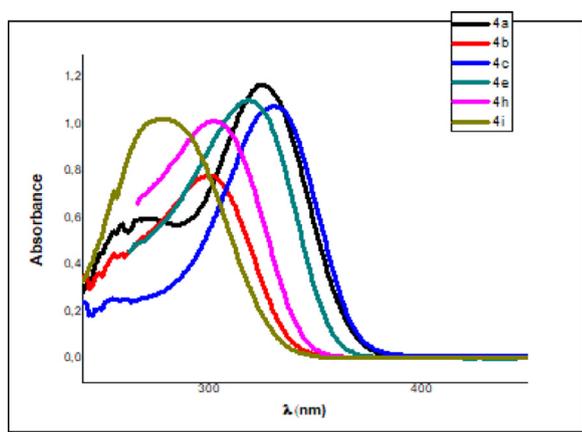
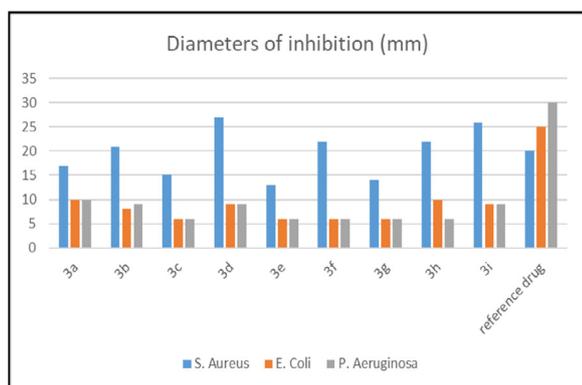
#### 3.3. Antimicrobial activity

##### 3.3.1. Antibacterial activity of chalcones (**3a-i**)

The synthesized heterocyclic chalcones were tested for antibacterial activity against two Gram-negative and one Gram-positive

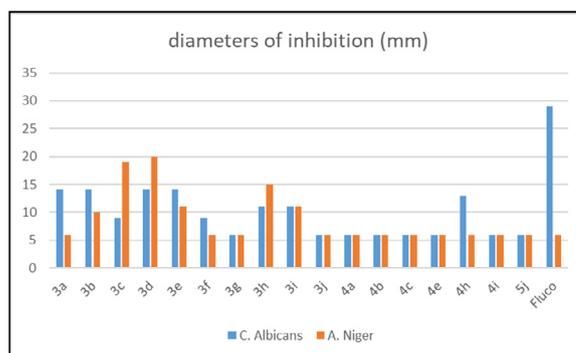
**Table 1**  
UV-visible spectroscopic characteristics of compounds **3** and **4**.

| Compound  | $\lambda_{\text{abs}}$ (nm) | Compound  | $\lambda_{\text{abs}}$ (nm) |
|-----------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|
| <b>3a</b> | 355 $\pi-\pi^*$             | <b>4a</b> | 317 $\pi-\pi^*$             |
|           | 242 $\pi-\pi^*$             | <b>4b</b> | 270 $\pi-\pi^*$             |
| <b>3b</b> | 329 $\pi-\pi^*$             | <b>4b</b> | 324                         |
|           | 240 $\pi-\pi^*$             | <b>4c</b> | 299                         |
| <b>3c</b> | 354 $\pi-\pi^*$             | <b>4c</b> | $\pi-$                      |
|           | 242 $\pi-\pi^*$             | <b>4c</b> | $\pi^*$                     |
| <b>3d</b> | 316 $\pi-\pi^*$             | -         | -                           |
|           | 242 $\pi-\pi^*$             |           |                             |
| <b>3e</b> | 352 $\pi-\pi^*$             | <b>4e</b> | 329                         |
|           | 242 $\pi-\pi^*$             | <b>4e</b> | $\pi-$                      |
| <b>3f</b> | 284 $\pi-\pi^*$             | -         | $\pi^*$                     |
| <b>3g</b> | 296 $\pi-\pi^*$             | -         | -                           |
|           | 241 $\pi-\pi^*$             |           |                             |
| <b>3h</b> | 320 $\pi-\pi^*$             | <b>4h</b> | 302                         |
|           | 242 $\pi-\pi^*$             | <b>4h</b> | $\pi-$                      |
| <b>3i</b> | 260 $\pi-\pi^*$             | <b>4i</b> | 279 $\pi-\pi^*$             |

**Fig. 2.** UV-visible spectrum of the newly synthesized chalcone-oximes **4** at  $3 \times 10^{-5}$  M (DMSO).**Fig. 3.** Inhibition diameters of compounds (**3a-i**) and of standard drug.

bacteria using the disc diffusion method [31]. Samples were prepared in DMSO at a concentration of 5.12 mg/mL. The muting diameters (mm) are shown in (Table 2, Fig. 3).

In the case of the Gram-positive bacterial strain (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923), it was observed that all synthesized products, had excellent to moderate antibacterial activity. Compound **3d** showed the best inhibition potency, followed by compound **3i**, then compounds **3h**, **3f**, **3b**. Their activity was better than the reference antibiotic (Rifampicin). However, compound **3e** exhibited minimal inhibition. Our compounds proved significantly less active against the other strains: **3a**, **3d**, **3i** showed a slight inhibi-

**Fig. 4.** Inhibition diameters of the synthesized compound and the reference (anti-fungal agent)

tion against the two Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25923) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), whereas **3h** exhibited low inhibition only against *E. coli*.

With regard to the structure-activity relationship of the synthesized products, it was noted that **3i**, **3h**, **3f** showed excellent activity against *Staphylococcus aureus* bacteria, indicating that the introduction of strong electron-withdrawing groups ( $-\text{NO}_2$ , Cl) in the benzene ring increases the antibacterial activity. Conversely, the incorporation of electron donor groups ( $p\text{-OCH}_3$ ) on the benzene ring reduces the antibacterial activity (compound **3e**) [51,52]. Comparing the different substitution positions for chlorine, their order was as follows: 2,6-(Cl)<sub>2</sub> >  $p\text{-Cl}$ . This suggests that the introduction of two halogen atoms into the compound may play an important role in increasing the antibacterial properties.

### 3.3.2. Antifungal activity

The antifungal activity of all synthesized compounds was studied against *A. niger* and *C. albicans*. Inspection of the data (Table 3, 4) revealed that compounds **3a**, **3b**, **3d**, **3e** were significantly active against the microscopic fungus *C. albicans*, but still lower than the standard fluconazole taken as reference. Chalcones **3c**, **3f**, **3h**, **3i** were less active, whereas the other chalcones **3g**, **3j** had no effect on the *C. albicans* strain. For *Aspergillus niger*, both compounds **3c**, **3d** showed very good result with maximum inhibition compared to standard drugs followed by compound **3h** which also showed favourable inhibition diameter. The other compounds such as **3a**, **3e**, **3i** showed only slight inhibition. Unlike the results obtained for antibacterial activity, we observed that the presence of the nitro group ( $-\text{NO}_2$ ) in the compounds decreases or annihilates the antifungal activity. The variation in the activity of the tested chalcones against microorganisms depends on the impermeability of the cell or differences in the ribosomes of microbial cells. The lipid membrane surrounding the cell favors the passage of any fat-soluble material and it is known that fat solubility is an important factor controlling antimicrobial activity [52].

Concerning the chalcone-oximes **4**, with the exception of compound **4h** which showed some activity against *C. albicans* (MIC= 500 $\mu\text{g/mL}$ ) all the other chalcone-oximes **4** and isoxazoline **5j** showed no antifungal activity against the two fungi tested. From these results, it can be concluded that the  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl bridge connecting the two rings is important in the mode of action of the compounds against both fungal strains. The results of the antifungal activity are presented in (Table 3, 4 and Fig. 4).

The most active products were diluted to evaluate their minimum inhibitory concentrations. Against *C. albicans*, the best result was obtained for the two compounds **3a** and **3b** (MIC= 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ) followed by compound **3d** (MIC= 125  $\mu\text{g/mL}$ ) and finally compound **3e** (MIC= 500  $\mu\text{g/mL}$ ). The minimum inhibitory concen-

**Table 2**

Diameters of inhibition zones (mm) of compounds (3a-i) and standard drug at 5.12 mg/mL.

| Bacterial Strain   | 3a | 3b  | 3c | 3d  | 3e | 3f  | 3g | 3h  | 3i  | Standard drug* |
|--------------------|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|-----|----------------|
| <i>S.aureus</i>    | 17 | 21  | 15 | 27  | 13 | 22  | 14 | 22  | 26  | 20             |
|                    | ++ | +++ | ++ | +++ | +  | +++ | +  | +++ | +++ | +++            |
| <i>E. coli</i>     | 10 | 8   | 6  | 9   | 6  | 6   | 6  | 10  | 9   | 25             |
|                    | +  | -   | -  | +   | -  | -   | -  | +   | +   | +++            |
| <i>Paeruginosa</i> | 10 | 9   | 6  | 9   | 6  | 6   | 6  | 6   | 9   | 30             |
|                    | +  | +   | -  | +   | -  | -   | -  | -   | +   | +++            |

\* Standard drug is Rifampicin for *S.aureus* (5.12 mg/mL), Cotrimoxazole for *E. coli* (5.12 mg/mL), Colistin for *Paeruginosa* (5.12 mg/mL).

**Table 3**

Diameters of inhibition zones (mm) of compounds (3a-j) and standard drug at 5.12 mg/mL.

| Fungal strain      | 3a | 3b | 3c  | 3d  | 3e | 3f | 3g | 3h | 3i | 3j | Standard drug* |
|--------------------|----|----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----------------|
| <i>A. niger</i>    | 6  | 10 | 19  | 20  | 11 | 6  | 6  | 15 | 11 | 6  | 6              |
|                    | -  | +  | +++ | +++ | +  | -  | -  | ++ | +  | -  | -              |
| <i>C. albicans</i> | 14 | 14 | 9   | 14  | 14 | 9  | 6  | 11 | 11 | 6  | 29             |
|                    | ++ | ++ | +   | ++  | ++ | +  | -  | +  | +  | -  | ++++           |

\* Drug: Fluconazole (5.12 mg/mL) for *C. Albicans* and *A. niger*.

**Table 4**

Diameters of inhibition zones (mm) of compounds (4, 5j) and standard drug at 5.12 mg/mL.

| Fungal strain      | 4a | 4b | 4c | 4e | 4h | 4i | 5j | Standard drug* |
|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----------------|
| <i>A. niger</i>    | 6  | 6  | 6  | 6  | 6  | 6  | 6  | 6              |
|                    | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -              |
| <i>C. albicans</i> | 6  | 6  | 6  | 6  | 13 | 6  | 6  | 29             |
|                    | -  | -  | -  | -  | +  | -  | -  | ++++           |

\* drug= Fluconazole (5.12 mg/mL) for *C. Albicans* and *A. Niger*.

trations of the most active compounds remain lower than that of Fluconazole taken as reference (MIC= 15.625 µg/mL).

Against *A. niger*, the best result was obtained with compound **3c** (MIC= 7.8125 µg/mL) followed by compound **3d** (MIC= 15.625 µg/mL) then compound **3h** (MIC= 62.5 µg/mL).

Previous studies [53,54] have shown that the azole-containing drug Fluconazole inhibits the proliferation of the *C. albicans* fungus, but is inactive against *A. niger*. In this work, we were able to demonstrate that six chalcones are active against *A. niger*, three of them showing an excellent result. Based on these data we can assume that the presence of the ketone function or the pyridine ring confers to these molecules an activity against the filamentous fungus *A. niger*.

### 3.4. Antioxidant activity

Antioxidants react with DPPH<sup>\*</sup>, a stable free radical which is reduced to DPPH-H and as a consequence the absorbance is decreased from the DPPH<sup>\*</sup> radical to the DPPH-H form. The degree of discolouration indicates the scavenging potential of the antioxidant compounds in terms of hydrogen-donating ability. All the synthesized compounds **3**, **4**, **5j** were evaluated for their *in vitro* antioxidant activity by DPPH [33,34] radical scavenging assay at different concentrations. Fig. 5 shows the variation of absorbance versus concentration of the different compounds **3**, **4**, **5j** and of the standard ascorbic acid. Lower absorbance of the reaction mixture indicates higher free radical scavenging activity. The capability to scavenge the DPPH<sup>\*</sup> (or inhibition %) was calculated as follows:

$$\text{RSA}(\%) = \frac{(\text{Ac} - \text{As})}{\text{Ac}} \times 100.$$

Where Ac is the absorbance of the control (absorbance of DPPH<sup>\*</sup> ethanol solution without sample), and As is the absorbance of the tested compound after 60 min incubation.

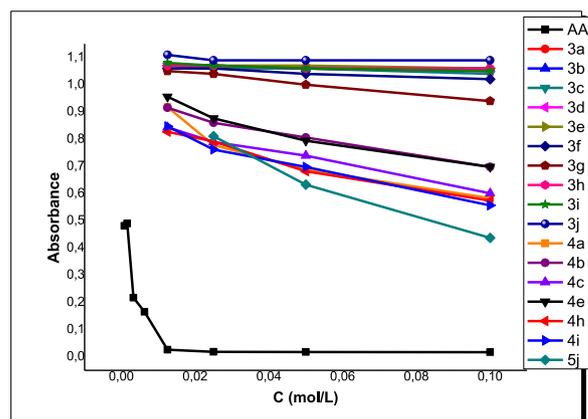


Fig. 5. The variation of absorbance versus concentration of the different compounds 3, 4, 5 and AA.

It is clear that all the synthesized chalcones (**3a-j**) showed no antioxidant activity, unlike oximes (**4a-c**, **4e**, **4h**, **4i**) and isoxazoline **5j**, which showed moderate activity compared to ascorbic acid taken as reference. The absence of electron-donating substituents on the benzene ring of chalcones, the presence of electron-withdrawing halogen groups or thiophenyl rings explains the absence of antioxidant activity in these molecules.

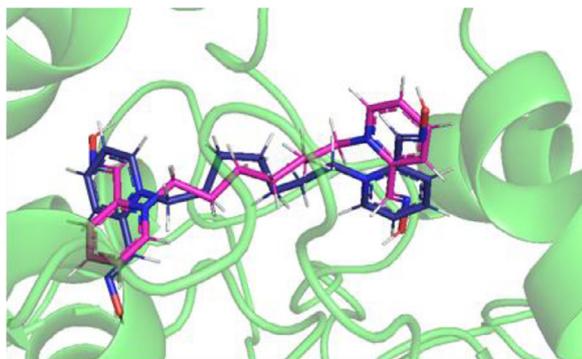
According to the results obtained, compound **5j** showed the highest activity (IC<sub>50</sub> = 16.31 mg/mL) followed by compound **4h** then **4i**. Compound **4e** showed the lowest antioxidant activity. From these results we could note that in the case of the compound **5j** the cyclization allows the hydrogen of the amine function (NH) present on the indole to be released, which confers it a medium activity contrarily to its precursor **3j**. It was also observed that the position of the heteroatom (sulfur) in the thiophene ring influences the antioxidant activity. The best result was obtained when the sulfur occupies position **2** in the heterocycle. The antioxidant activity of compound **4h** is better than that of compound **4i**, which shows that the presence of chlorine on two positions (**2** and **6**) reduces the antioxidant activity.

### 3.5. In silico Blood-brain barrier prediction

Blood brain barrier (BBB) penetration is a parameter used to determine whether a compound will penetrate and distribute within the central nervous system (CNS) or if it will be excluded from the

**Table 5**  
BBB penetration and Lipinski rule profile of the studied compounds.

| Compound | BBB       | Lipinski rule |
|----------|-----------|---------------|
| A (4e)   | Penetrate | No violation  |
| B (4h)   | Penetrate | No violation  |
| C (4i)   | Penetrate | No violation  |
| D (4a)   | Penetrate | No violation  |
| E (4b)   | Penetrate | No violation  |
| F (4c)   | Penetrate | No violation  |
| G (5j)   | Penetrate | No violation  |



**Fig. 6.** Superposition of docked conformation (blue sticks) on the crystallographic structure of ligand HBP (magenta sticks). The protein backbone was shown as a green cartoon

CNS. Crossing the BBB is essential for imaging the brain parenchymal and treating for neurological diseases. However, the potency of synthesized oximes to cross the BBB was predicted based on their physicochemical properties and reported in (Table 5). The results show that all synthesized compounds were found to be able to penetrate the blood brain barrier. In addition, none of the synthesized compounds violated the Lipinski's rule of five which is considered as a prominent principle used in certifying the drug likeness of a compound.

### 3.6. Docking parameters generation

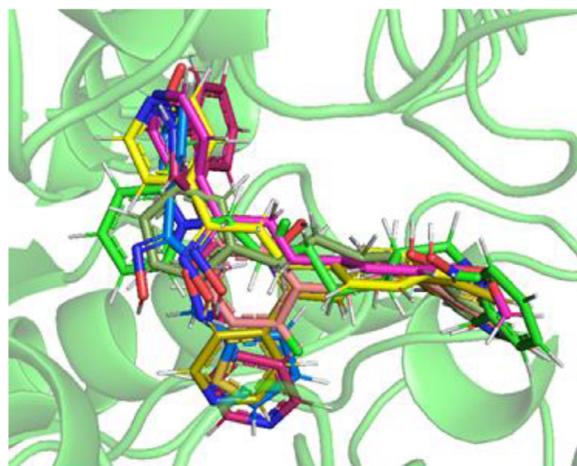
The co-crystallized ligand HBP was extracted from the crystallographic complex **2WU4** and docked in the binding site of fep-mAChE protein (Fig. 6).

The parameters conducting to the acceptable conformation of the ligand in the active site of the protein, characterized by low RMSD from the experimental one, low docking energy [45] and a high number of hydrogen bonds, were used in the docking of synthesized compounds.

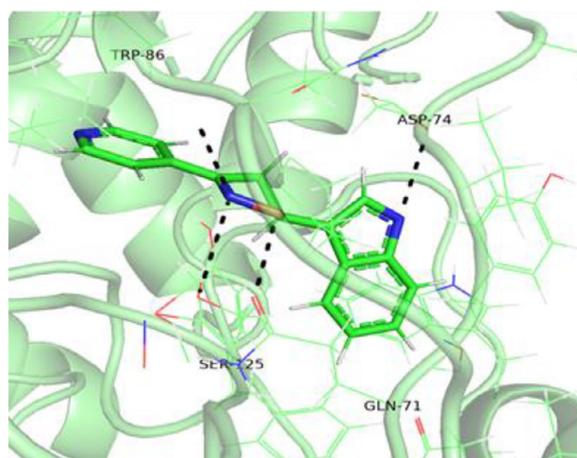
### 3.7. Binding mode of studied compounds

Visualization of the docked conformations of synthesized compounds revealed that all of the studied compounds adopt the same binding mode in the binding site of **2WU4** protein [55], as shown in (Fig. 7).

As shown in (Fig. 8) and reported in (Table 6), the compound **G (5j)** was involved in hydrogen bonds and hydrophobic interactions with the residues of protein active site of fep-mAChE protein. The nitrogen atom of indole moiety was hydrogen-bonded with the hydroxyl acid of side chain of **Asp74** (3.1 Å), located in the anionic site. Nitrogen atom of the oxazole ring was involved in two hydrogen bonds with the protein, one with carbonyl oxygen of protein backbone of **Trp86** (2.8 Å), located in the choline-binding site, and the second with hydroxyl of **Ser125** (2.9 Å). In addition, the oxy-



**Fig. 7.** Superposition of docked conformations of synthesized compounds on the crystallographic ligand (Green sticks)



**Fig. 8.** View of the docked conformation of compound **5j** with fep-mAChE protein.

gen atom of oxazole moiety was hydrogen bonded with carbonyl amide of **Gln71** (2.8 Å).

Besides, compound **G** made attractive and non-covalent  $\pi$ -alkyl and  $\pi$ - $\pi$  stacked interactions between the carbon atom of oxazole moiety and phenyl ring of indole moiety of this compound and phenyl rings of **Tyr124** and **Tyr72**, respectively. The phenyl ring of **Trp86** is located at 3.78 Å from the pyridine ring of compound **G**, leading to favorable hydrophobic interactions. Also, this compound is surrounded by residues **Phe297**, **Trp286**, **Pro88** and **Leu130** leading to favorable hydrophobic interactions, which may stabilize the ligand in the active site and increase its affinity. It is worth noting that the residues located in the peripheral anionic site at the entrance of the gorge, namely **Tyr72**, **Asp74**, **Tyr124**, **Trp286** and **Tyr341**, constitute a binding site for various reactivators [37].

Visualization of docked conformations of compounds **A** and **B** shows that only the hydrogen bond with residue **Asp74** was preserved by both compounds (Fig. 9). In addition, the two compounds make hydrogen bonds with nitrogen of imidazole side chain of **His447** and hydroxyl group (OH) side chain of **Tyr341** (2.8 Å and 2.9 Å, respectively). Compound **C** with two chlorine groups on the ortho positions of the phenyl ring keeps only the hydrogen bond with nitrogen atom of imidazole moiety of residue **His447** (3.1 Å). Indeed, this compound is involved in two hydrogen bonds with hydroxyl side chain of residues **Thr83** and **Tyr337** (2.7 Å and 2.6 Å).

**Table 6**  
Hydrogen bonds interactions, interacting residues, and docking energies (kJ.mol<sup>-1</sup>), calculated for synthesized compounds with fep-mAChE protein.

| Compound      | H-Bond  | Interacting residues (< 4 Å)   | Docking Energy |
|---------------|---|--|----------------|
| <b>A (4e)</b> | His447 (2.8 Å)<br>Asp74 (3.0 Å)<br>Tyr341 (3.1 Å)                 | $\pi$ -alkyl: Ile294<br>$\pi$ - $\pi$ stacked :<br>Tyr337<br>Van der Waals:<br>Tyr72, Trp286,<br>Tyr124, His447,<br>Phe338, Tyr341,<br>Leu76   | -104.78        |
| <b>B (4h)</b> | His447 (2.9 Å)<br>Asp74 (3.1 Å)<br>Tyr341 (3.1 Å)                 | $\pi$ -alkyl: Tyr72<br>$\pi$ - $\pi$ stacked, $\pi$ -<br>$\pi$ T-shaped :<br>Trp286, Tyr337<br>Van der Waals:<br>Tyr124, Phe338,<br>Leu76  | -102.72        |
| <b>C (4i)</b> | His447 (3.1 Å)<br>Thr83 (2.7 Å)<br>Tyr337 (2.6 Å)                 | $\pi$ -Sigma: Asp74<br>Halogen: Trp86<br>Van der Waals:<br>Trp439, Tyr341,<br>Gly121, Gly82,<br>Leu130, Asn87,<br>Gly126, Gln71,<br>Ser125, Pro88,<br>Tyr72, Val73,<br>Tyr124, Ile294,<br>Phe338 | -100.72        |
| <b>D (4a)</b> | His447 (3.1 Å)<br>Tyr341 (2.6 Å)                                  | $\pi$ -alkyl: Ile294<br>$\pi$ - $\pi$ stacked :<br>Tyr337<br>Van der Waals:<br>Tyr124, Gly121,<br>Gln71, Ser125,<br>Gly126, Leu130,<br>Gly120, Ala127,<br>Tyr133, Asp74,<br>Phe338               | -96.08         |
| <b>E (4b)</b> | Tyr124 (2.0 Å, 3.1 Å)   | $\pi$ - $\pi$ stacked :<br>Trp286<br>Van der Waals:<br>Gln71, Val73,<br>Asp74, Pro88,<br>Ser125, Asn87,<br>Thr83, Trp86,<br>Tyr341, Ile294   | -94.48         |
| <b>F (4c)</b> | Asp74 (3.0 Å)<br>Tyr341 (2.8 Å)<br>His447 (2.6 Å)                 | $\pi$ - $\pi$ stacked, $\pi$ -<br>$\pi$ T-shaped :<br>Tyr72, Tyr124,<br>Tyr337<br>Van der Waals:<br>Trp286, Ile294,<br>Thr83, Trp86,<br>Phe338, Glu202,<br>Leu76, Gly448                         | -106.57        |
| <b>G (5j)</b> | Asp74 (3.1 Å)<br>Gln71 (2.8 Å)<br>Ser125 (2.9 Å)<br>Trp86 (2.8 Å) | $\pi$ - $\pi$ stacked :<br>Tyr72<br>$\pi$ -Alkyl: Tyr124<br>Van der Waals:<br>Glu285, Trp286,<br>Phe297, Asn87,<br>Pro88, Gly121,<br>Gly126, Leu130,<br>Tyr133                                   | -112.26        |

The replacement of phenyl ring by a heterocyclic thiophenyl ring as in compounds **D** and **E**, leads to a decrease in the docking energies. This is due to the loss of the hydrogen bond interaction with residue **Asp74** (as in compound **D**) and **His447** and **Tyr341** (compound **E**). On the other hand, compound **F** preserves all the hydrogen bonds and the non-covalent  $\pi$ - $\pi$  stacked interaction observed between compound **A** and the studied protein.

Also, the aromatic rings of residues **Ile294**, **Tyr72**, **Tyr124**, **Tyr337** and **Trp286** are involved in attractive and non-covalent,  $\pi$ -alkyl,  $\pi$ - $\pi$  stacking,  $\pi$ - $\pi$  T-shaped with compounds **A**, **B**, **F** and **G**. Besides, the above mentioned attractive and non-covalent interactions were converted to van der Waals interaction in the docked conformation of compound **C**. In addition, this compound was involved in  $\pi$ -sigma and halogen interaction with residues **asp74**

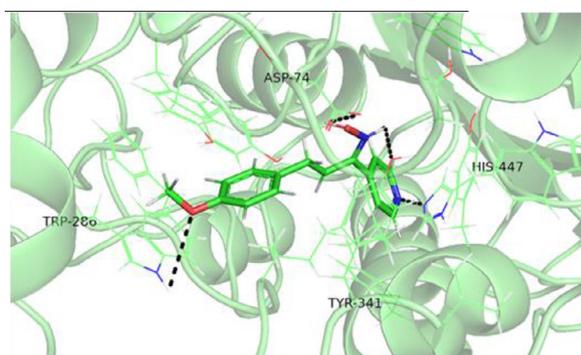


Fig. 9. View of the docked conformation of compound A with fep-mAChE protein.

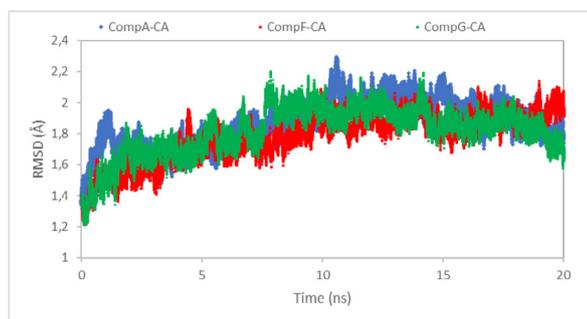


Fig. 10. RMSD plots of backbone  $C\alpha$  atoms of complexes compound A- fep-mAChE (blue), compound F-fep-mAChE (red) and compound G-fep-mAChE (green).

and Trp86, which may enhance the binding of the compound in the protein active site. On the other hand, compounds D and E lose all the non-covalent and attractive interactions observed in the docked conformations of other compounds and are simply involved in Van der Waals interactions.

Thereby, docking results revealed that synthesized compounds, were involved in large number of favorable interactions with residues of the active site of fep-mAChE protein. However, to confirm the stability of synthesized compounds in the active site of fep-mAChE protein, we submitted all the docked conformations with low docking energies to molecular dynamics simulation (see below).

### 3.8. Molecular dynamics simulations

To confirm the binding mode and the stability of docked ligands A, F and G with fep-mAChE protein, molecular dynamics simulations were conducted. The stability of studied systems was evaluated based on change in RMSD of ligands in the protein active site, RMSD of carbons  $\alpha$  of protein backbone and Van der Waals interaction energies between compounds and selected protein.

Calculated RMSD plots of protein backbone  $C\alpha$  atoms of studied systems (compound A- fep-mAChE, compound F-fep-mAChE and compound G-fep-mAChE), through the 20 ns of molecular dynamics are reported in (Fig. 10).

The (Fig. 10) shows that the backbone  $C\alpha$  in selected complexes show small fluctuations until 8 ns, where the three systems reach stability at around 1.8 Å of RMSD until the end of simulation. These results indicate that the three complexes are stable through the 20 ns of molecular dynamics simulations.

Calculated RMSD plots of the three studied ligands A, F and G, in the binding site of fep-mAChE protein, through the 20 ns of molecular dynamics are reported in (Fig. 11).

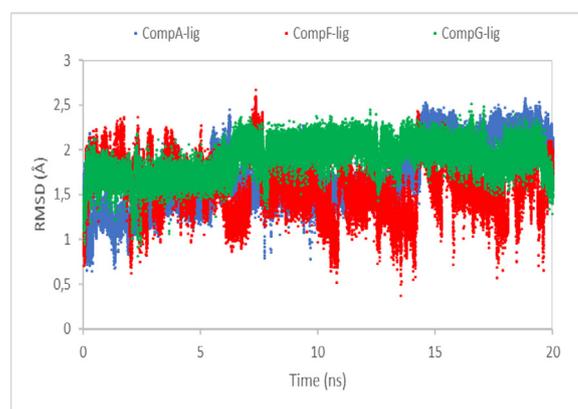


Fig. 11. RMSD plots of the studied compounds A (blue), F (red) and G (green) through the 20 ns of molecular dynamics simulations.

Analysis of results shows some differences between the three curves indicating some movements of studied compounds in the fep-mAChE active site. Thus, RMSD values variation of compounds A and F ranging from 0.5 Å to 2.3 Å, show ligands flexibility in the active site of fep-mAChE protein [44]. On the other hand, the predicted RMSD curve shape for compound G approaches a horizontal line during all the time of simulations, at the average value of RMSD of 1.8 Å, indicating that the compound reaches equilibrium and its change of conformation is very slight.

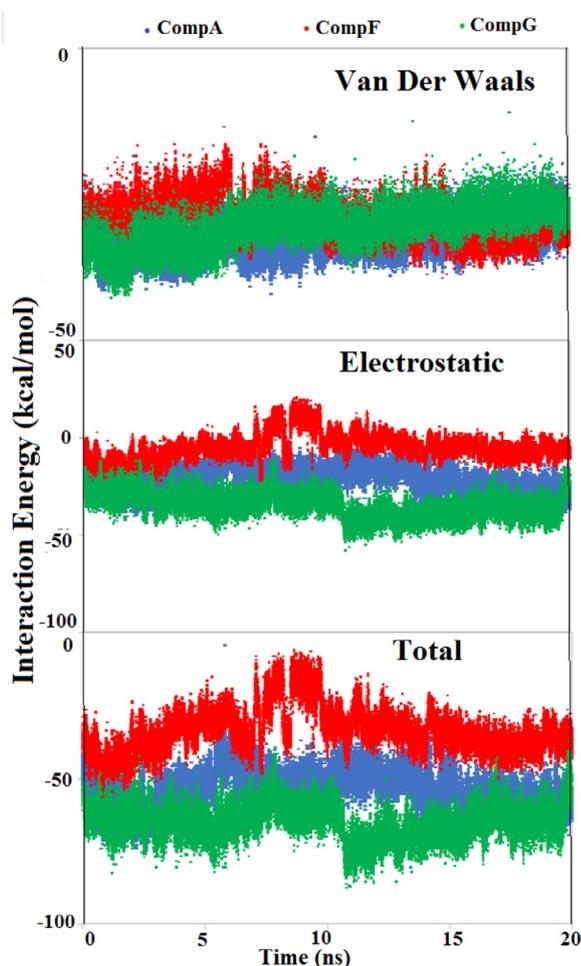
In order to reveal more mechanistic details, we calculated the interaction energies between the three dynamized compounds and fep-mAChE protein and decomposed them into Van der Waals (VDW) and electrostatic components as shown in (Fig. 12).

The (Fig. 12) shows that the calculated VdW energies for three studied compounds are similar with some fluctuations in the first 10 ns with complex compound F and fep-mAChE protein. Otherwise, the electrostatic contribution calculated for compound G is significant. Therefore, the large electrostatic contribution is mostly due to long-range electrostatic interactions rather than Hydrogen bonding. Indeed, the electrostatic curve shape of this compound approaches a horizontal line at -34 kcal/mol in the first 12 ns of simulation time, where we see a slight decrease. Then, at 16 ns of simulation, the complex compound G- fep-mAChE protein resumes the starting conformation until the end of simulation time, where the electrostatic contribution approaches the value of -34 kcal/mol. On the other hand, the VdW interaction energies calculated for compounds A and F are larger than that of electrostatic one. In addition, the electrostatic interaction energies values calculated for this compound show very little variation under all the simulation time and approaches the value of

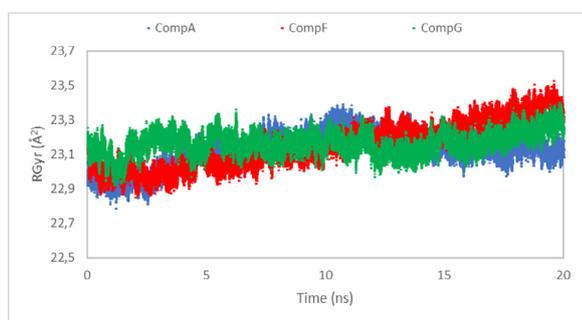
-20 kcal/mol. Besides, a few minor fluctuations were observed in the electrostatic contribution curve calculated for compound F, between 7 ns and 10 ns of simulation time.

To judge the secondary structure of the fep-mAChE, we track the time evolution of radius of gyration (rGyr) during the time of MD simulation (Fig. 13). The calculated values of rGyr for complexes: compound A-fep-mAChE, compound F-fep-mAChE and compound G-fep-mAChE exhibit lesser fluctuations intensities, revealing that the systems composed of our synthesized compounds A, F, G and fep-mAChE protein arranged to a more compact conformation.

Thereby, molecular docking and molecular dynamics results revealed that synthesized compounds, A, F and G, were involved in large number of favorable interactions with residues of the active site of fep-mAChE protein, which may stabilize the ligands in the active site and increase their affinities.



**Fig. 12.** Plot of Interaction Energy between *fep-mAChE* and compounds: **A** (blue), **F** (red) and **G** (green) through the 20 ns of molecular dynamics simulation.



**Fig. 13.** Radius of gyration plots predicted for the three studied complexes compound **A- fep-mAChE** (blue), compound **F- fep-mAChE** (red) and compound **G-fep-mAChE** (green).

#### 4. Conclusion

In this work, we have demonstrated that contrary to the oximes, the majority of the 4-acetylpyridine chalcones synthesized have a good antimicrobial activity towards the tested strains. The synthesized oximes presented a better antioxidant activity than the corresponding chalcones although it remains very weak compared to ascorbic acid taken as reference. We observed that the cyclization of the oxime leads to the improvement of the antioxidant activity (compound **5j**). The results of the molecular docking showed that the synthesized compounds could act in a very interesting

way as reactivators of the acetylcholinesterase of *Mus musculus* inhibited by the insecticide fenamiphos (*fep-mAChE*).

#### Declaration of Competing Interest

There are no conflicts to declare.

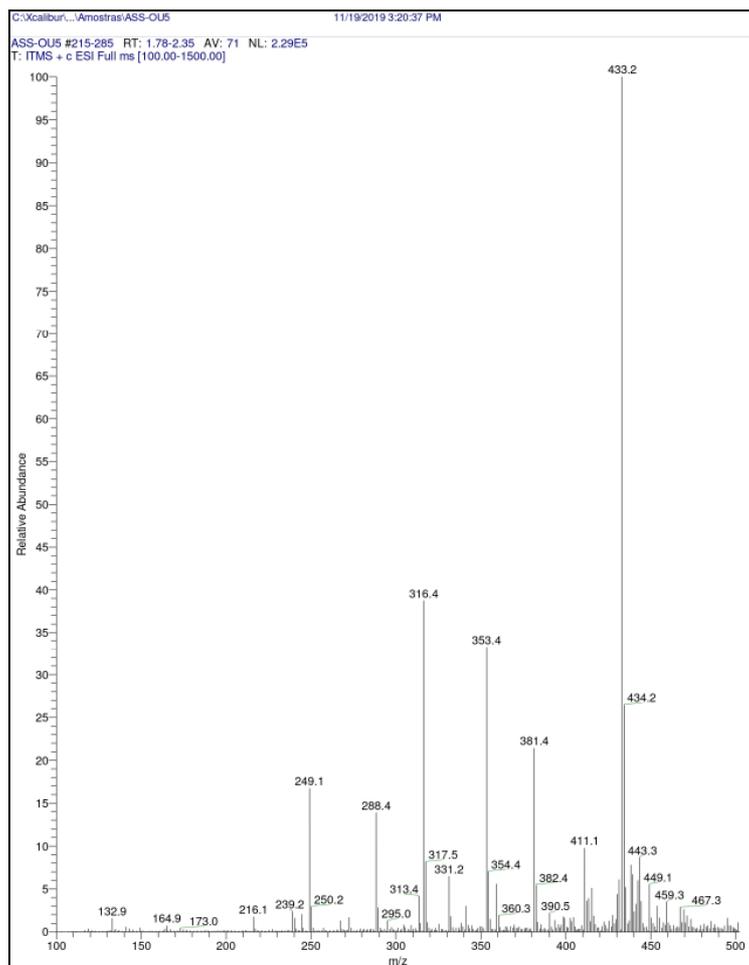
#### Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Amar Abdoun and Dr. Nadia hadhoum for their help in performing the microbiological tests.

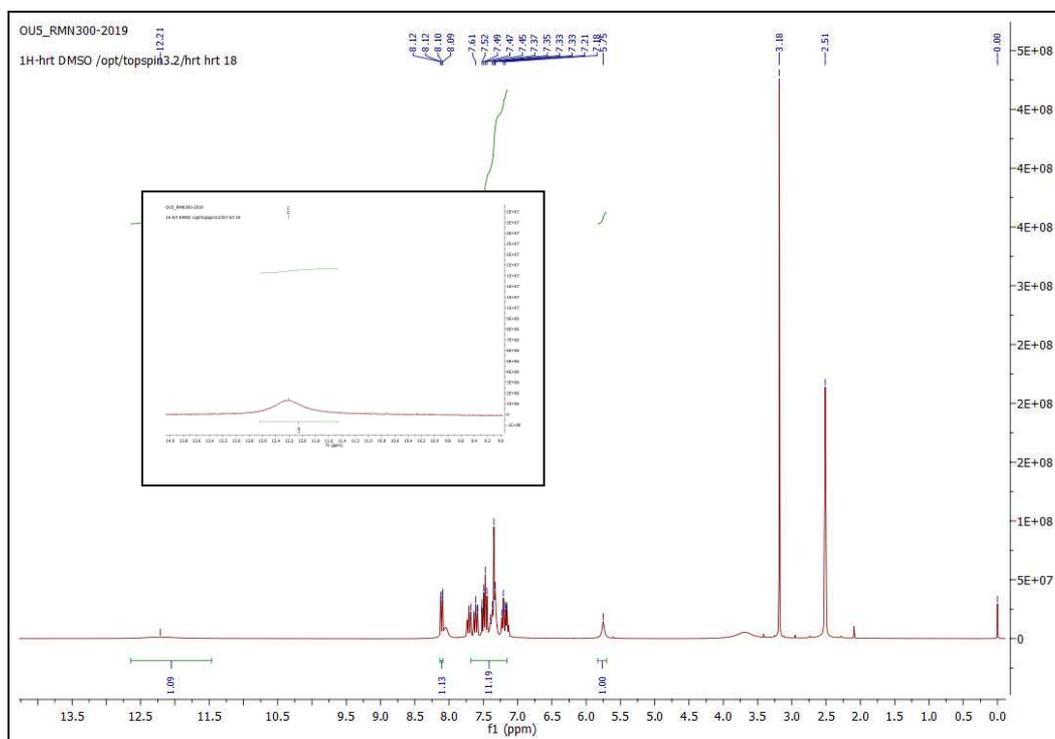
#### References

- [1] K. Bush, P. Courvalin, G. Dantas, J. Davies, B. Eisenstein, P. Huovinen, G.A. Jacoby, R. Kishony, B.N. Kreiswirth, E. Kutter, S.A. Lerner, S. Levy, K. Lewis, O. Lomovskaya, J.H. Miller, S. Mobashery, L.J. Piddock, S. Projan, C.M. Thomas, A. Tomasz, P.M. Tulkens, T.R. Walsh, J.D. Watson, J. Witkowski, W. Witte, G. Wright, P. Yeh, H.I. Zgurskaya, Tackling antibiotic resistance, *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (2011) 894–896, doi:10.1038/nrmicro2693.
- [2] S.B. Levy, B. Marshall, Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, *Nat. Med.* 10 (2004) S122–S129, doi:10.1038/nm1145.
- [3] C. Ghosh, J. Haldar, Membrane-active small molecules: designs inspired by antimicrobial peptides, *Chem. Med. Chem.* 10 (2015) 1606–1624 <https://doi.org/10.1002/cmde.201500299>.
- [4] S.M. Lim, S.A.R. Webb, Nosocomial bacterial infections in intensive care units. I: organisms and mechanisms of antibiotic resistance, *Anaesthesia* 60 (2005) 887–902, doi:10.1111/j.1365-2044.2005.04220.x.
- [5] H. Grundmann, M. Aires-de-Sousa, J. Boyce, E. Tiemersma, Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat, *Lancet* 368 (2006) 874–885, doi:10.1016/S0140-6736(06)68853-3.
- [6] H.W. Boucher, G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, J. Bartlett, Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America, *Clin. Infect. Dis.* 48 (2009) 1–12, doi:10.1086/595011.
- [7] T.B. Emran, M.A. Rahman, M.M.N. Uddin, R. Dash, M.F. Hossen, M. Mohiuddin, M.R. Alam, Molecular docking and inhibition studies on the interactions of *Bacopa monnieri*'s potent phytochemicals against pathogenic *Staphylococcus aureus*, *DARU. J. Pharma. Sci.* 23 (2015) 26 <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0106-9>.
- [8] M. Xu, P. Wu, F. Shen, J. Ji, K.P. Rakesh, Chalcone derivatives and their antibacterial activities: Current development, *Bioorg. Chem.* 91 (2019) 103133, doi:10.1016/j.bioorg.2019.103133.
- [9] Y. Zhang, J. Wu, S. Ying, G. Chen, B. Wu, T. Xu, Z. Liu, X. Liu, L. Huang, X. Shan, Y. Dai, G. Liang, Discovery of new MD2 inhibitor from chalcone derivatives with anti-inflammatory effects in LPS-induced acute lung injury, *sci. Rep.* 6 (2016) 25130, doi:10.1038/srep25130.
- [10] Y.H. Chen, W.H. Wang, Y.H. Wang, Z.Y. Lin, C.C. Wen, C.Y. Chern, Evaluation of the anti-inflammatory effect of chalcone and chalcone analogues in zebrafish model, *Molecules* 18 (2013) 2052–2060, doi:10.3390/molecules18022052.
- [11] S.A. Lahsasni, F.H.A. Korbi, N.A. Aljaber, Synthesis, characterization and evaluation of antioxidant activities of some novel chalcones analogues, *Chem. Cent. J.* 8 (2014) 32 <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-32>.
- [12] H. Iqbal, V. Prabhakar, A. Sangith, B. Chandrika, R. Balasubramanian, Synthesis, anti-inflammatory and antioxidant activity of ring-A-monosubstituted chalcone derivatives, *Med. Chem. Res.* 23 (2014) 4383–4394 <https://doi.org/10.1007/s00044-014-1007-z>.
- [13] U. Sankappa Rai, A.M. Isloor, P. Shetty, K.S.R. Pai, H.K. Fun, Synthesis and in vitro biological evaluation of new pyrazole chalcones and heterocyclic diamides as potential anticancer agents, *Arab. J. Chem.* 8 (2015) 317–321, doi:10.1016/j.arabj.2014.01.018.
- [14] D.K. Mahapatra, S.K. Bharti, V. Asati, Anticancer Chalcones: structural and molecular target perspectives, *Eur. J. Med. Chem.* 98 (2015) 69–114, doi:10.1016/j.ejmech.2015.05.004.
- [15] D. Coskun, G.S. Tekin, S. Sandal, M. Faith, G. Coskun, Synthesis characterization and anticancer activity of new benzofuran substituted chalcones, *J. Chem.* (2016), doi:10.1155/2016/7678486.
- [16] C. Hsieh, T. Hsieh, M. El-shazly, D. Chuang, Y. Tsai, C. Yen, S. Wu, Y. Wu, F. Chang, Synthesis of chalcone derivatives as potential anti-diabetic agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 3912–3915, doi:10.1016/j.bmcl.2012.04.108.
- [17] X. Fang, B. Yang, Z. Cheng, D. Zhang, M. Yang, Synthesis and antimicrobial activity of novel chalcone derivatives, *Res. Chem. Intermed.* (2014) 1715–1725 <https://doi.org/10.1007/s11164-013-1076-5>.
- [18] H. Suwito, A.N. Kristanti, N.N.T. Puspaningsih, Chalcones: synthesis structure diversity and pharmacological aspects, *J. Chem. Pharmaceut. Res.* (2014) 1076–1088 6 5.
- [19] S.N. Lopez, M.N. Castelli, S.A. Zacchino, J.N. Dominguez, G. Lobo, J. Charris-Charris, J.C.G. Cortes, J.C. Ribas, C. Devia, A.M. Rodriguez, R.D. Enriz, In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall, *Bioorg. Med. Chem.* 9 (2001) 1999–2013, doi:10.1016/S0968-0896(01)00116-X.

- [20] B. Baviskar, S. Patel, B. Baviskar, S.S. Khadabadi, Design and synthesis of some novel chalcone as potent antimicrobial agent, *Asian J. Res. Chem.* 1 (2008) 67–69 (b) Q. Zhang, W. Duan, S. Zhao, J. He, F. Lei, Synthesis, Antifungal Activity and 3D-QSAR Study of Novel (*E*)-Longifolene-Derived Tetralone Oxime Ethers, *Chem. Select.* 6 (18) (2021) 4515–4520. <https://doi.org/10.1002/slct.202100898>.
- [21] O. Nerya, R. Musa, S. Khatib, S. Tamir, J. Vaya, Chalcones as potent tyrosinase inhibitors : the effect of hydroxyl positions and numbers, *Phytochemistry* 65 (2004) 1389–1395, doi:10.1016/j.phytochem.2004.04.016.
- [22] J. Lia, C. Chen, F. Wu, L. Zhao, Microwave-assisted synthesis and tyrosinase inhibitory activity of chalcone derivatives, *Chem.Biol.Drug. Des.* 82 (2013) 39–47, doi:10.1111/cbdd.12126.
- [23] L. Ya-Ting, F. Tsorng-Harn, C. Hui-Min, C. Chao-Yuan, W. Yun-Hsin, C. Ching-Yuh, C. Yau- Hung, Toxicity assessments of chalcone and some synthetic chalcone analogues in a zebrafish model, *Molecules* 19 (2014) 641–650, doi:10.3390/molecules19010641.
- [24] J.M. Oh, T.M. Rangarajan, R. Chaudhary, R.P. Singh, M. Singh, R.P. Singh, A.R. Tondo, N. Gambacorta, O. Nicolotti, B. Mathew, H. Kim, Novel Class of Chalcone Oxime Ethers as Potent Monoamine Oxidase-B and Acetylcholinesterase Inhibitors, *Molecules* 25 (2020) 2356 <https://doi.org/10.3390/molecules25102356>.
- [25] A. Benazzouz-Touami, A. Chouh, S. Halit, S. Terrachet-Bouaziz, M. Makhloufi-Chebli, K. Ighil-Ahriz, A.M.S. Silva, New Coumarin-Pyrazole hybrids: synthesis, docking studies and Biological evaluation as potential cholinesterase inhibitors, *J. of Molec. Struc.* 1249 (2022) 131591, doi:10.1016/j.molstruc.2021.131591.
- [26] A. Agarwal, K. Srivastava, S.K. Puri, P.M.S. Chauhan, Synthesis of 2,4,6-trisubstituted pyrimidines as antimalarial agents, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 4645–4650, doi:10.1016/j.bmc.2005.04.061.
- [27] M.N. Peerzada, P. Khan, Md.I.Hassan K.Ahmad, A. Azam, Synthesis, characterization and biological evaluation of tertiary sulfonamide derivatives of pyridyl-indole based heteroaryl chalcone as potential carbonic anhydrase IX inhibitors and anticancer agents, *Eur. J. Med. Chem.* 155 (2018) 13–23 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.034>.
- [28] N. Sunduru, A. Agarwal, S.B. Katiyar, N.N. Goyal, S. Gupta, P.M.S. Chauhan, Synthesis of 2,4,6-trisubstituted pyrimidine and triazine heterocycles as antileishmanial agents, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 7706–7715, doi:10.1016/j.bmc.2006.08.009.
- [29] S. Alam, R. Panda, M. Kachroo, Anti-tubercular, antioxidant an in vitro anti-inflammatory activity of some newly synthesized chalcones, *Ind. J. Chem.* 5B (2014) 440–443.
- [30] R.S. Najem, Synthesis of some pyrimidine derivatives from 4-acetyl pyridine, *tikrit, J. Pure. Sci.* 23 (3) (2018).
- [31] A.W. Bauer, C.E. Roberts, W.M. Kirby, Single disc versus multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing, *Antibiot. Annu.* 7 (1960) 574–580 1959-.
- [32] I.G. Munteanu, C. Apetrei, Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 3380, doi:10.3390/ijms22073380.
- [33] L.L. Mensor, F.S. Menezes, G.G. Leitão, A.S. Reis, C. T.dos Santos, S.C. Coube, S.G. Leitão, Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, *Phytother. Res.* 15 (2001) 127–130 <https://doi.org/10.1002/ptr.687>.
- [34] J.S. Lee, H.J. Kim, H. Park, Y.S. Lee, New diarylheptanoids from the stems of *carpinus cordata*, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 1367–1370 <https://doi.org/10.1021/np020048l>.
- [35] F.R. de Souza, D.R. Garcia, T. Cuya, A.S. Pimentel, A. da Silva Gonçalves, R. Bicca de Alencastro, T.C.C. França, Molecular modeling study of uncharged oximes compared to HI-6 and 2-PAM inside human AChE Sarin and VX conjugates, *ACS. Omega.* 5 (9) (2020) 4490–4500 <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03737>.
- [36] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* 7 (2017) 42717, doi:10.1038/srep42717.
- [37] A. Hornberg, E. Artursson, R. Warne, Y.-P. Pang, F. Ekstrom, Crystal structures of oxime-bound fenamiphos-acetylcholinesterases: reactivation involving flipping of the His447 ring to form a reactive Glu334-His447-oxime triad, *Biochem. Pharmacol.* 79 (3) (2010) 507–515, doi:10.1016/j.bcp.2009.08.027.
- [38] S. Bouaziz-Terrachet, A. Toumi-Maouche, B. Maouche, S. Tairi-Kellou, Modeling the binding modes of stilbene analogs to cyclooxygenase-2: a molecular docking study, *J. Mol. Model.* 16 (12) (2010) 1919–1929, doi:10.1007/s00894-010-0679-7.
- [39] Marvin Sketch program, Chemaxon, <http://www.chemaxon.com>, 2009.
- [40] H. Kai-Cheng, C. Yen-Fu, L. Shen-Rong, Y. Jinn-Moon, iGEMDOCK: a graphical environment of enhancing GEMDOCK using pharmacological interactions and post-screening analysis, *BMC. Bioinf.* 12 (2011) 1–11 <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S1-533>.
- [41] M.F. Sanner, Python: a programming language for software integration and development, *J. Mol. Graphics. Mod.* 17 (1999) 57–61.
- [42] <http://www.accelrys.com>
- [43] K. Ould Lamara, M. Makhloufi-Chebli, A. Benazzouz-Touami, S. Terrachet-Bouaziz, Nejla Hamdi, A.M.S. Silva, J.B. Behr, Selectivity control in the reaction between 2-hydroxyarylaldehydes and 4-hydroxycoumarin. Antioxidant activities and computational studies of the formed products, *J. of. Mol. Struc.* 1231 (2021) 129936, doi:10.1016/j.molstruc.2021.129936.
- [44] J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten, Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.* 26 (16) (2005) 1781–1802 <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
- [45] S. Hammad, S. Bouaziz-Terrachet, R. Meghlem, D. Meziane, Pharmacophore Development, Drug-likeness analysis, molecular docking and molecular dynamics simulations for new CK2 inhibitors identification, *J.of. Mol. Model.* 26 (160) (2020) 1–17 <https://doi.org/10.1007/s00894-020-04408-2>.
- [46] U. Essman, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smoothparticle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.* 103 (1995) 8577–8593 <https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- [47] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 926–935 <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- [48] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamic, *J. Mol. Graph.* 14 (33) (1996) 33–38, doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- [49] M.V. Jyothi, Y. Rajendra Prasad, P. Venkatesh, M. Sureshreddy, Synthesis and antimicrobial activity of some novel chalcones of 3-acetyl pyridine and their pyrimidine derivatives, *Chem Sci Trans* 1 (3) (2012) 716–722.
- [50] A. Atilgan, Ş. Yurdakul, Y. Erdogdu, M.T. Güllüoğlu, DFT simulation, quantum chemical electronic structure, spectroscopic and structure-activity investigations of 4-acetylpyridine, *J. Mol. Struct.* 1161 (2018) 55–65, doi:10.1016/j.molstruc.2018.01.080.
- [51] M. Xu, P. Wu, F. Shen, J. Ji, K.P. Rakesh, Chalcone derivatives and their antibacterial activities: current development, *Bioorg. Chem.* 91 (2019) 103–133, doi:10.1016/j.bioorg.2019.103133.
- [52] M.K. Vekariya, D.B. Patel, P.A. Pandya, R.H. Vekariya, P.U. Shah, D.P. Rajani, N.K. Shah, Novel N-thioamide analogues of pyrazolopyrimidine based piperazine: design, synthesis, characterization, *in-silico* molecular docking study and biological evaluation, *J. Mol. Struc.* 1175 (2019) 551–565, doi:10.1016/j.molstruc.2018.08.018.
- [53] M. Mallié, J.M. Bastide, A. Blancard, A. Bonnin, S. Bretagne, M. Cambon, J. Chan-denier, V. Chauveau, B. Couprie, A. Datry, M. Feuilhade, R. Grillot, C. Guiguen, V. Lavarde, V. Letscher, M.D. Linas, A. Michel, O. Morin, A. Wade, *In vitro* susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* spp. to voriconazole and other antifungal agents using Etest®: results of a French multicentre study, *Int. J. Antimi. Agen.* 25 (4) (2005) 321–328 <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.11.010>.
- [54] K.M. Moghaddam, M. Arfan, J. Rafique, S. Rezaee, P.J. Fesharaki, A.R. Gohari, A.R. Shahverdi, The antifungal activity of *sarcococca saligna* ethanol extract and its combination effect with fluconazole against different resistant *aspergillus* species, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162 (2010) 127–133 <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8737-2>.
- [55] S. Bouaziz-Terrachet, R. Terrachet, S. Tairi-Kellou, Receptor and ligand-based 3D-QSAR study on a series of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Med. Chem. Res.* 22 (4) (2013) 1529–1537 <https://doi.org/10.1007/s00044-0120174-z>.

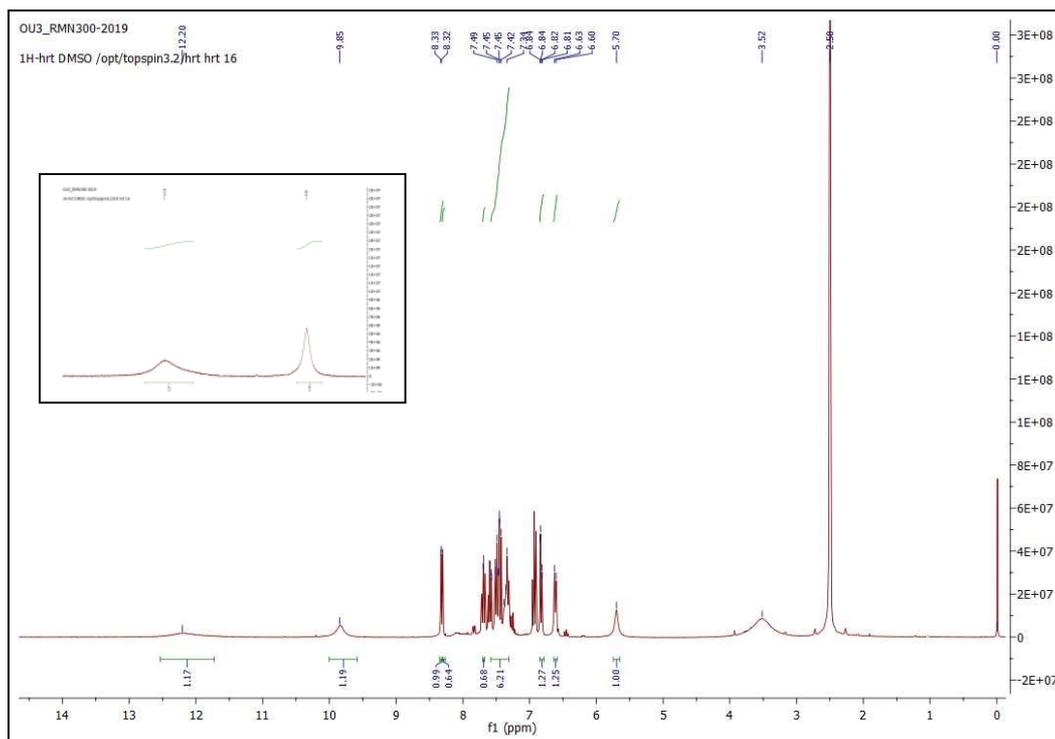


Spectre de masse ES-MS<sup>+</sup> du composé 4a.

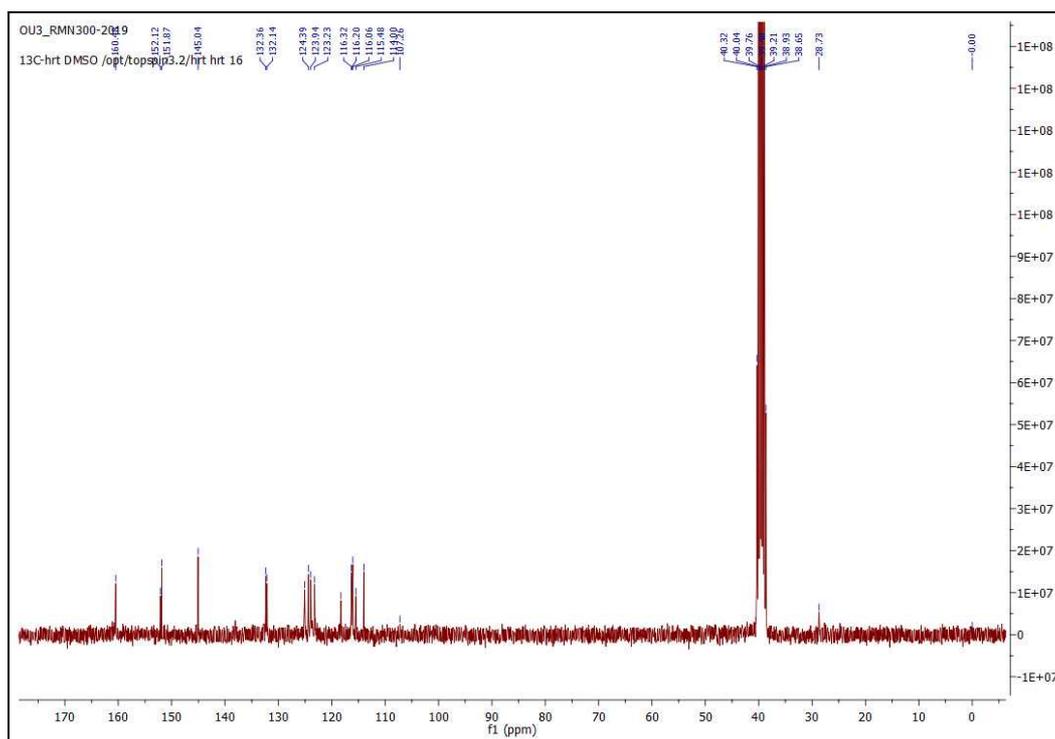


Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 300.13 MHz) du composé 4a.

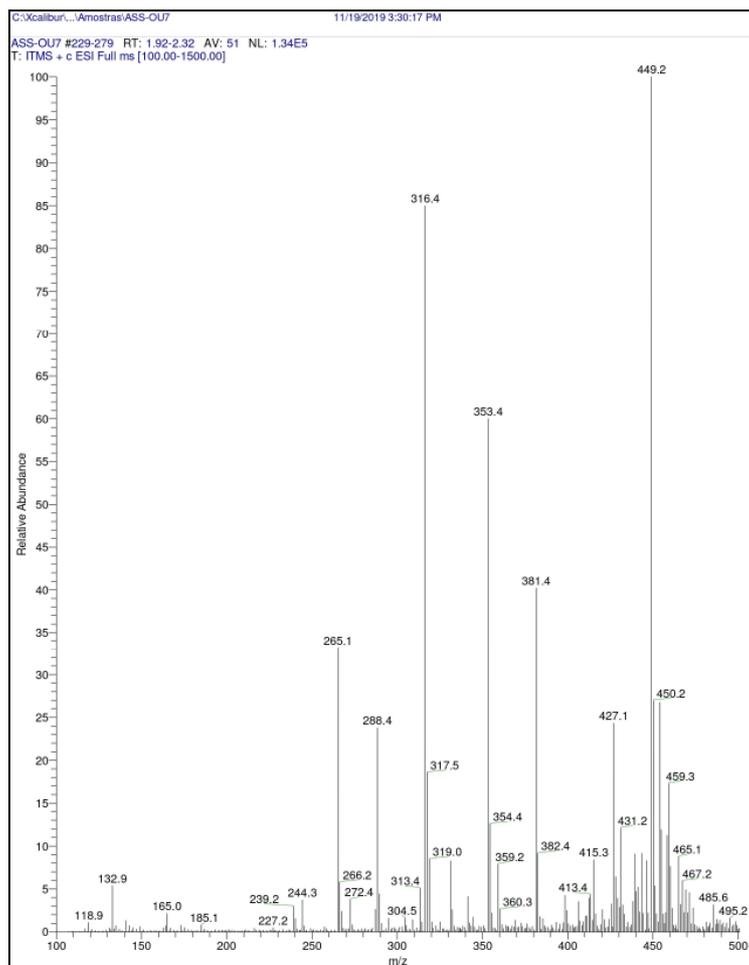




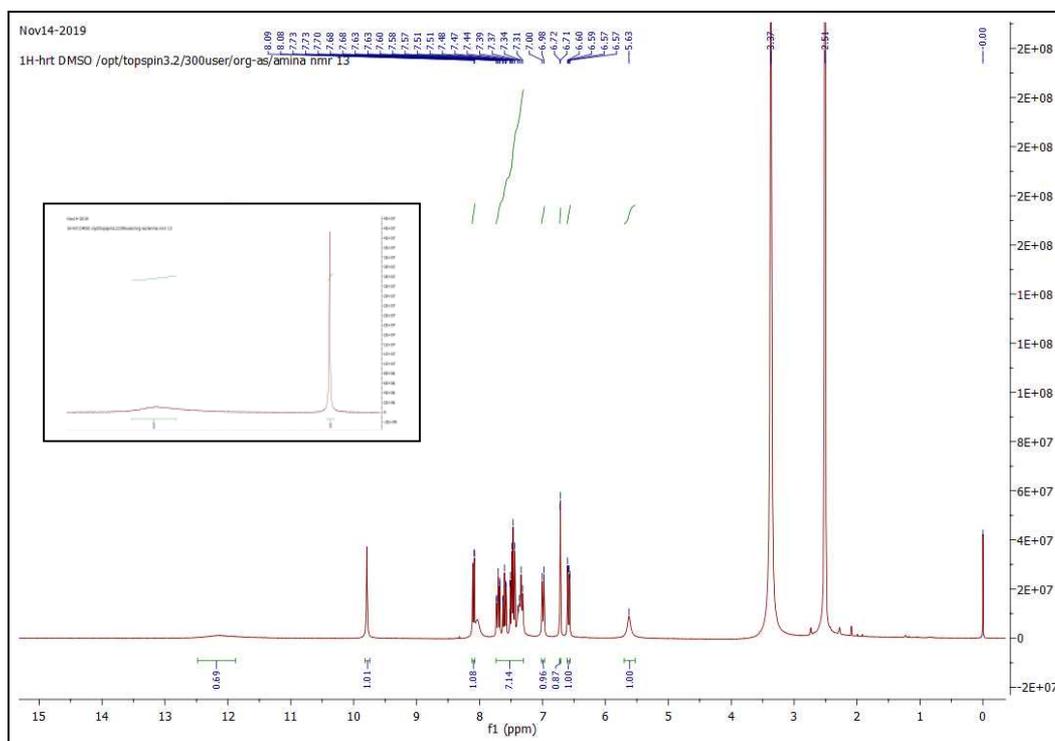
Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300.13 MHz) du composé 4b.



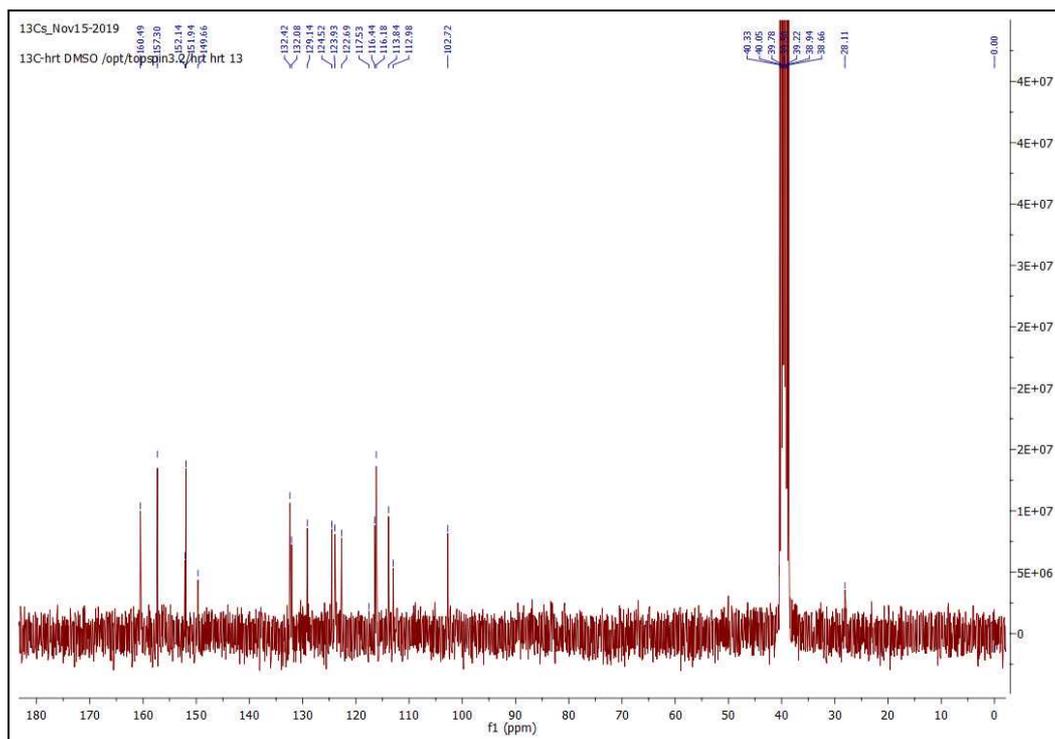
Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.47 MHz) du composé 4b.



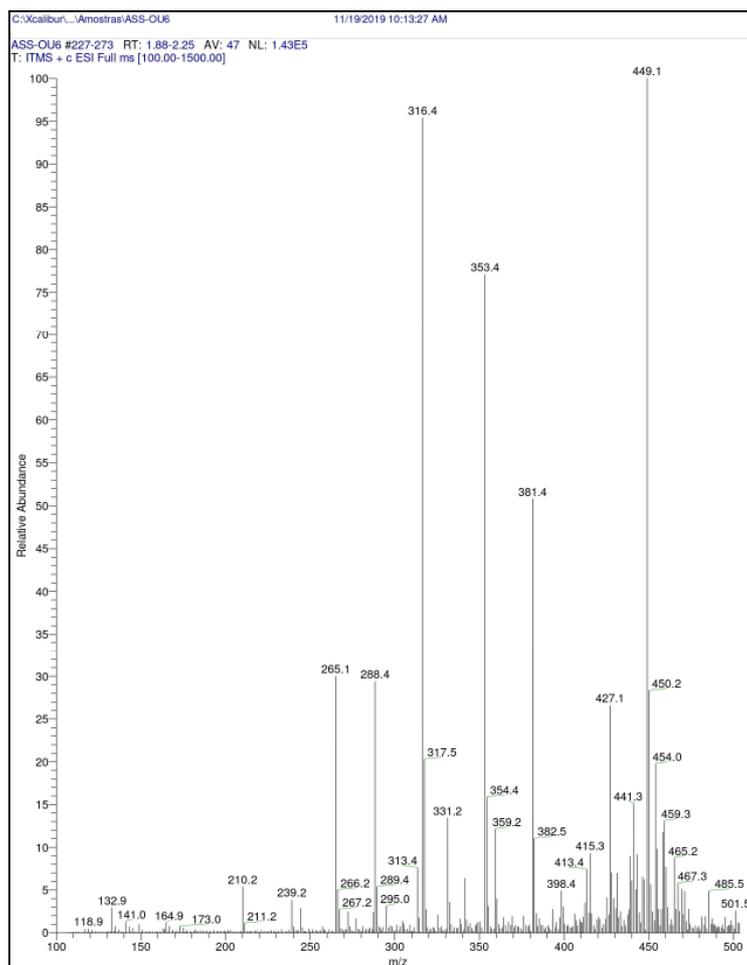
**Spectre de masse ES-MS<sup>+</sup> du composé 4c.**



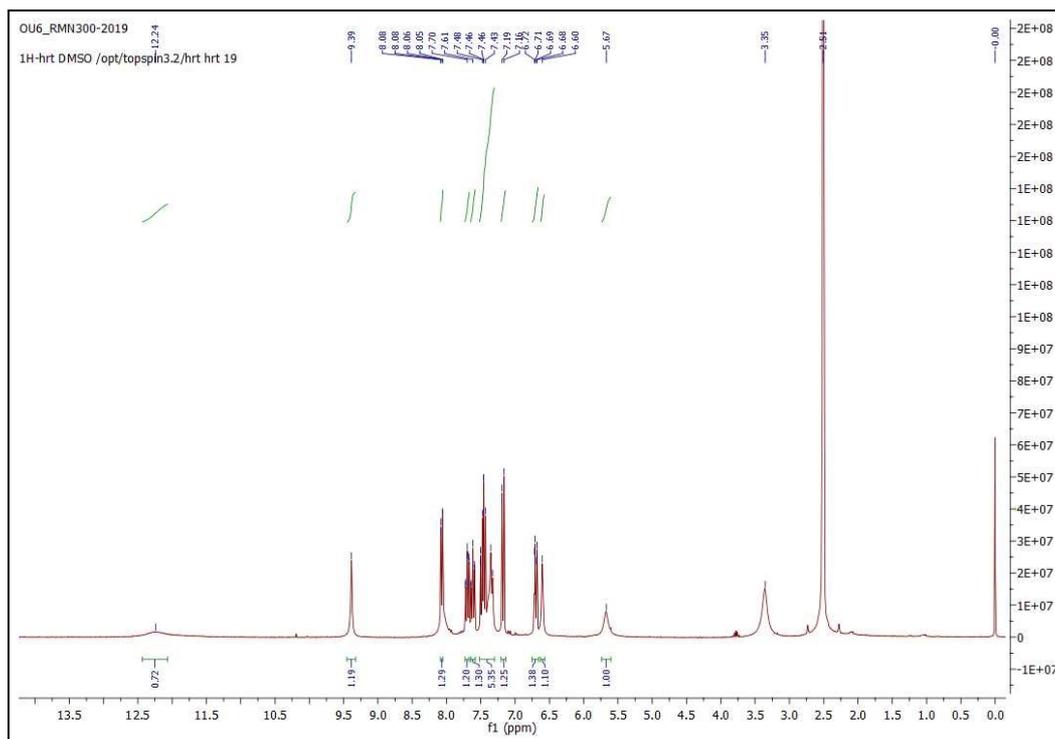
**Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 300.13 MHz) du composé 4c.**



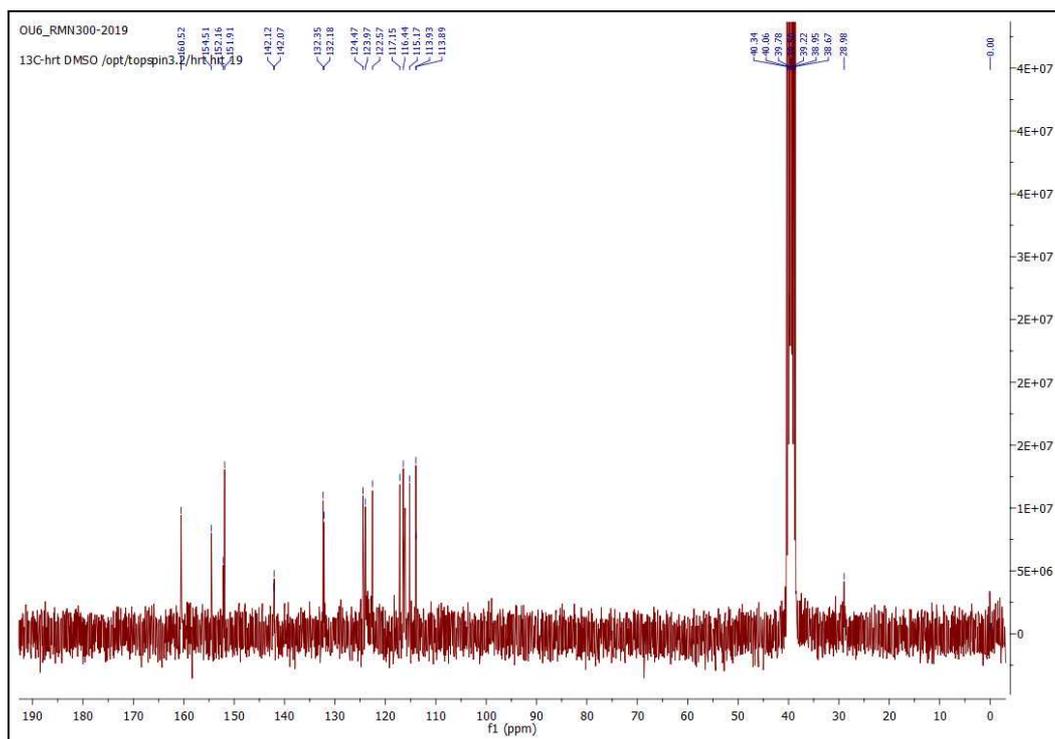
Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.47 MHz) du composé 4c.



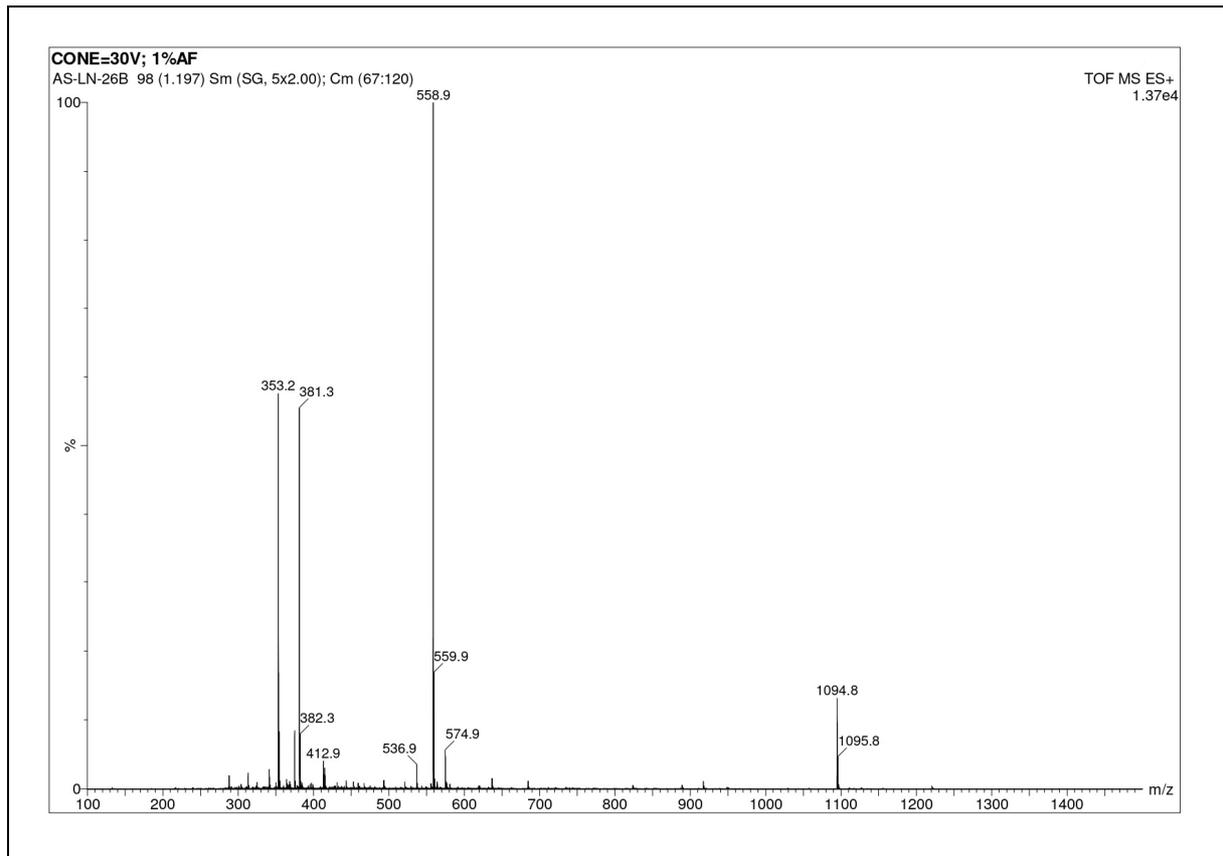
Spectre de masse ES- $\text{MS}^+$  du composé 4d.



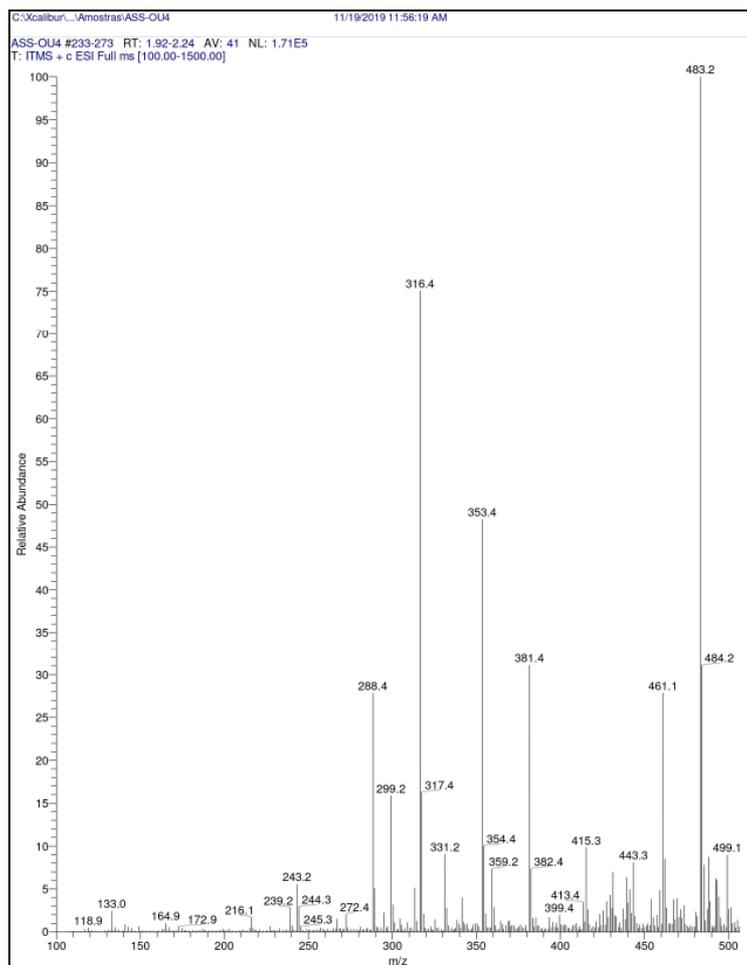
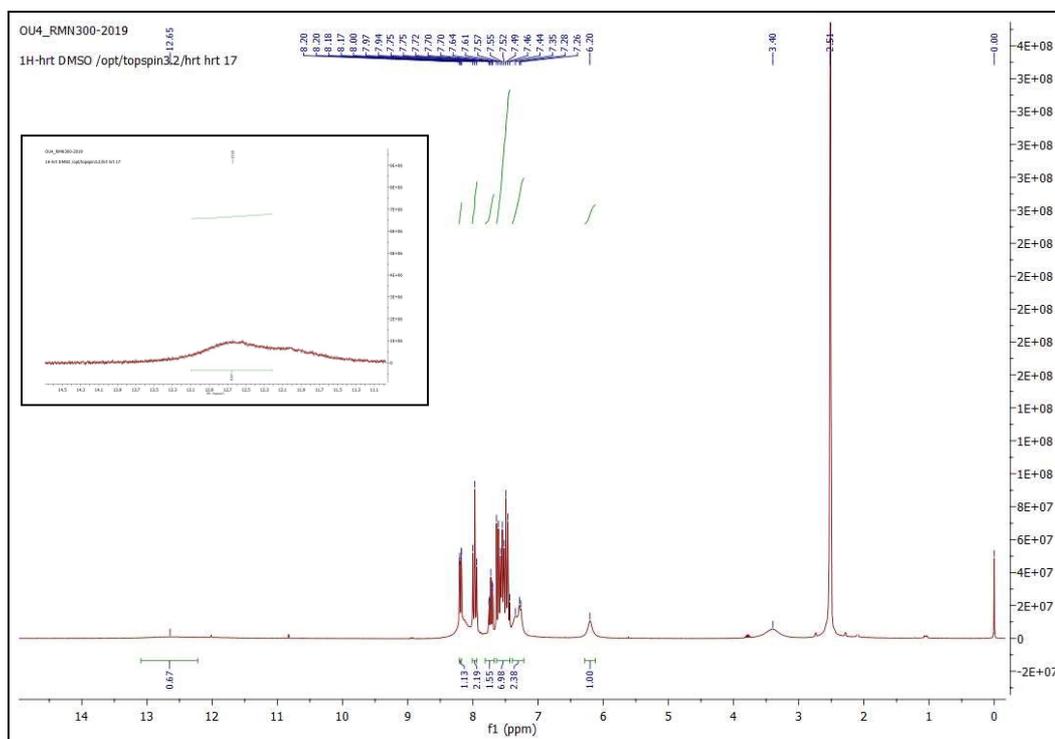
Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300.13 MHz) du composé 4d.

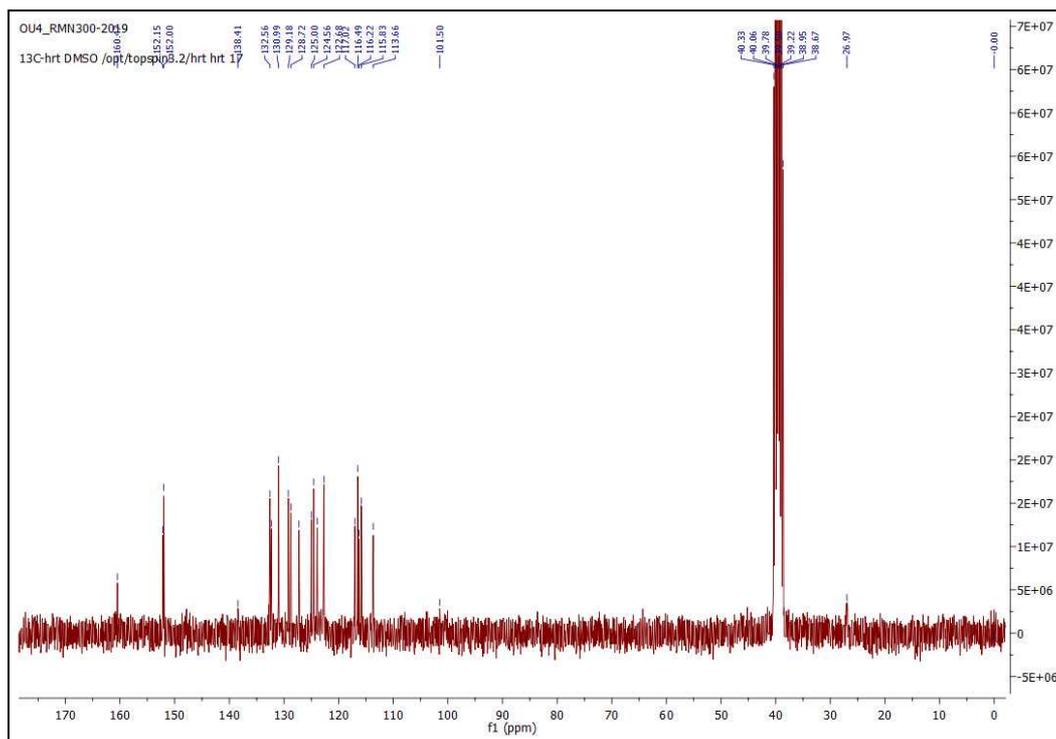


Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.47 MHz) du composé 4d.

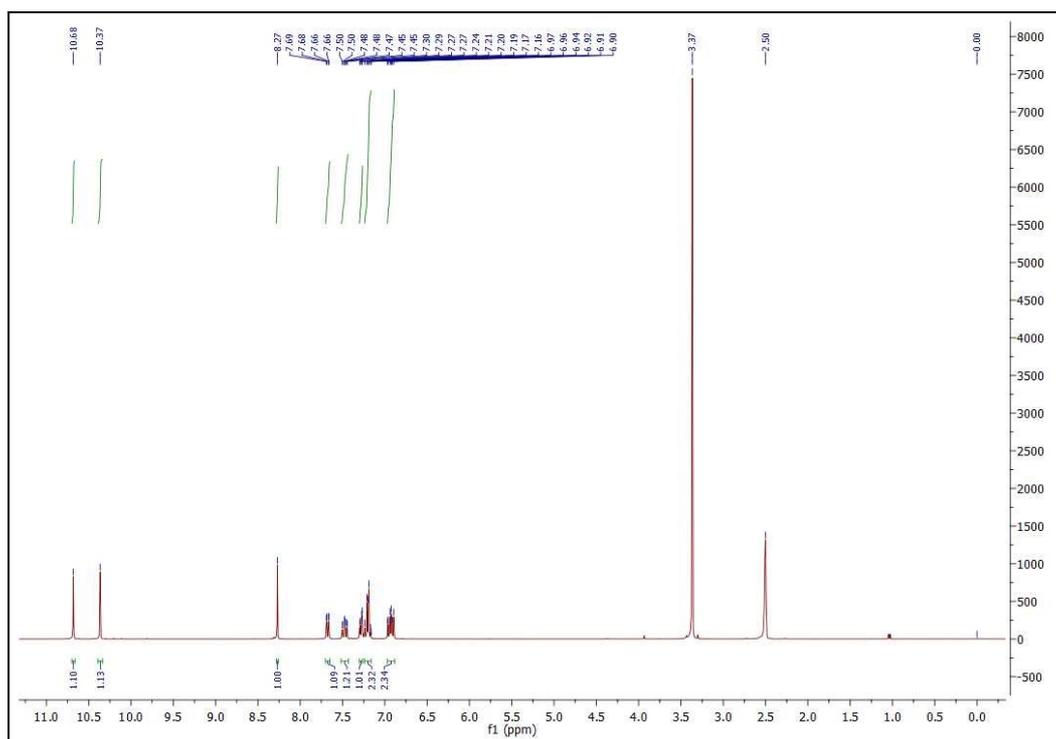


**Spectre de masse ES-MS<sup>+</sup> du composé 4f**

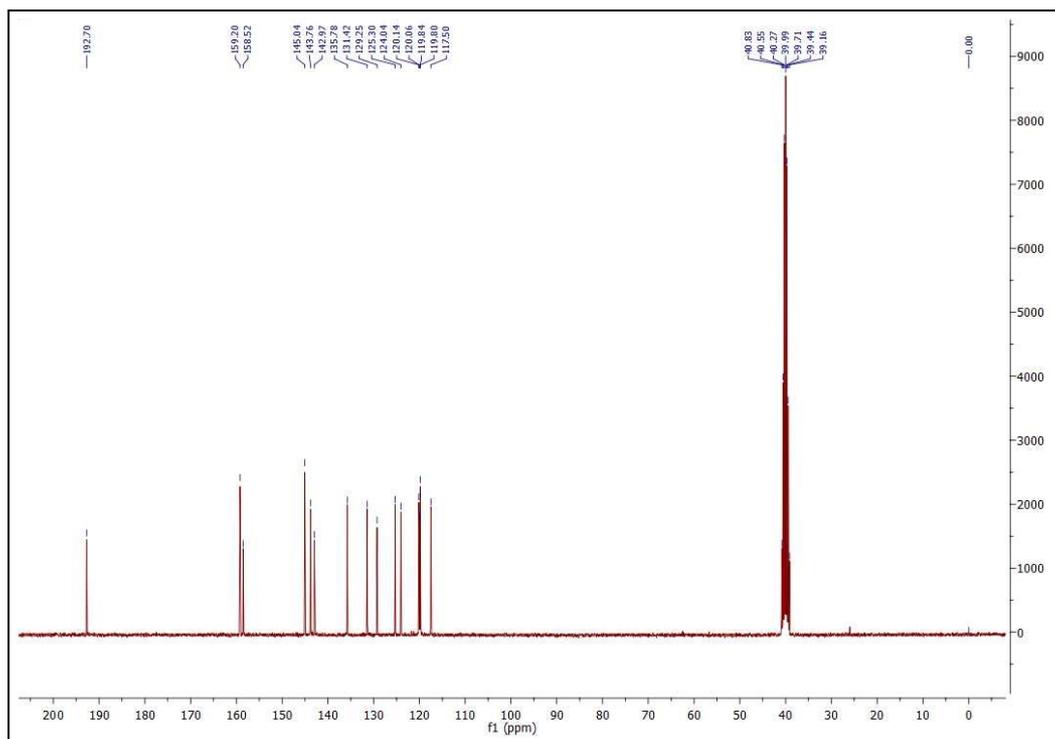
Spectre de masse ES-MS<sup>+</sup> du composé 4gSpectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 300.13 MHz) du composé 4g.



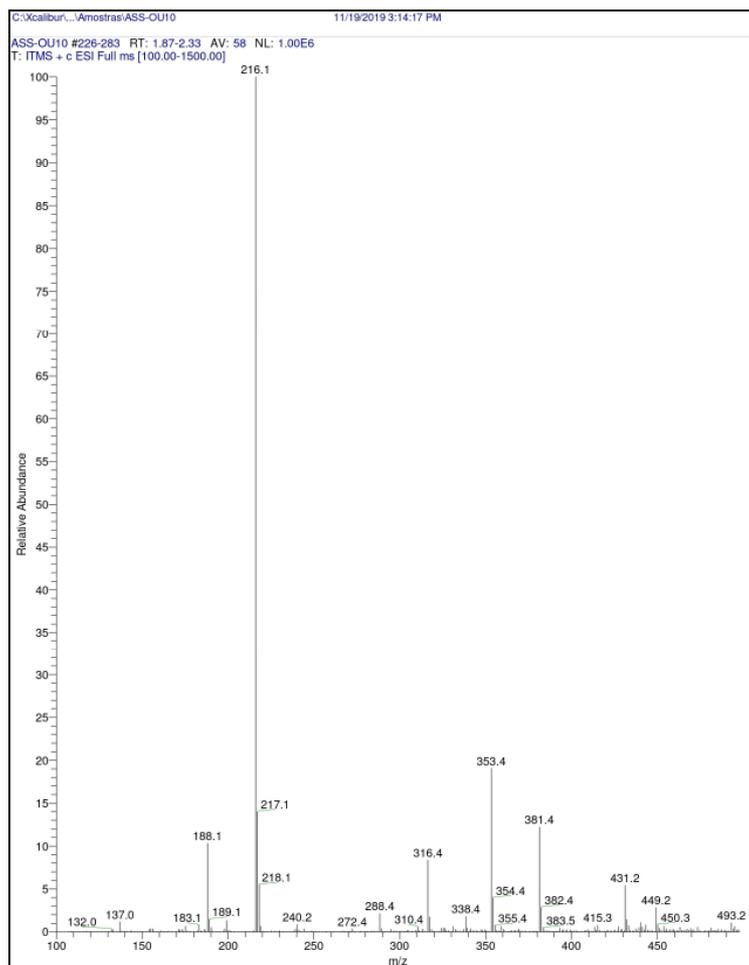
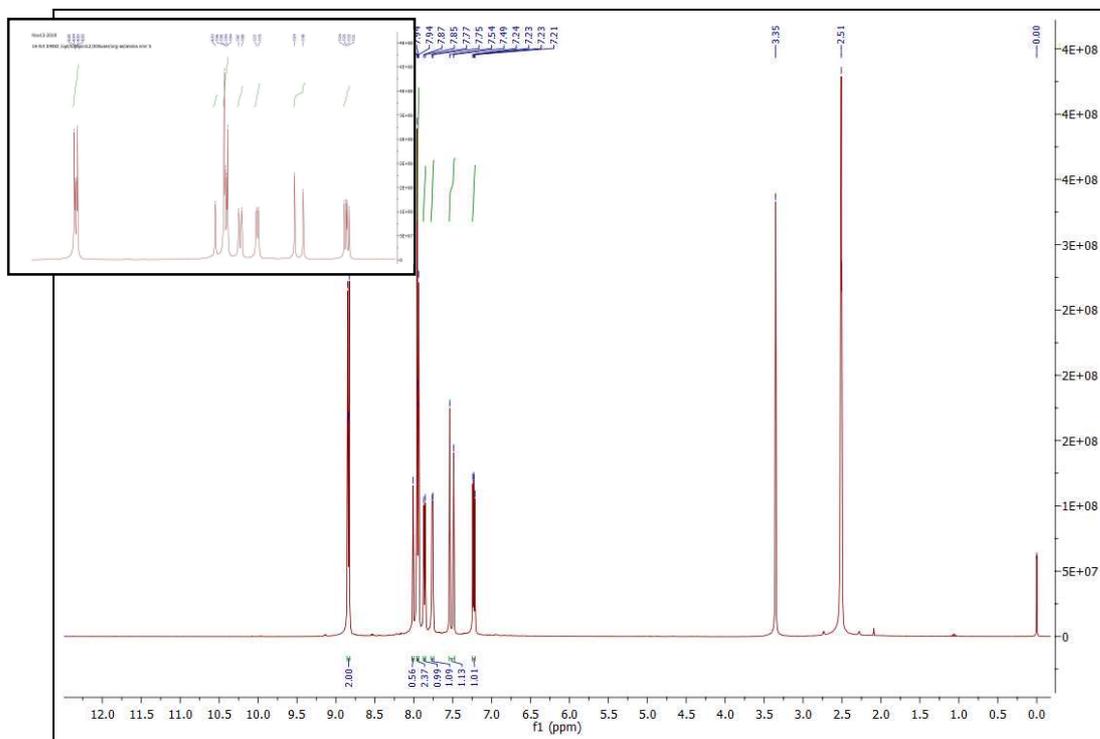
Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.47 MHz) du composé 4g.

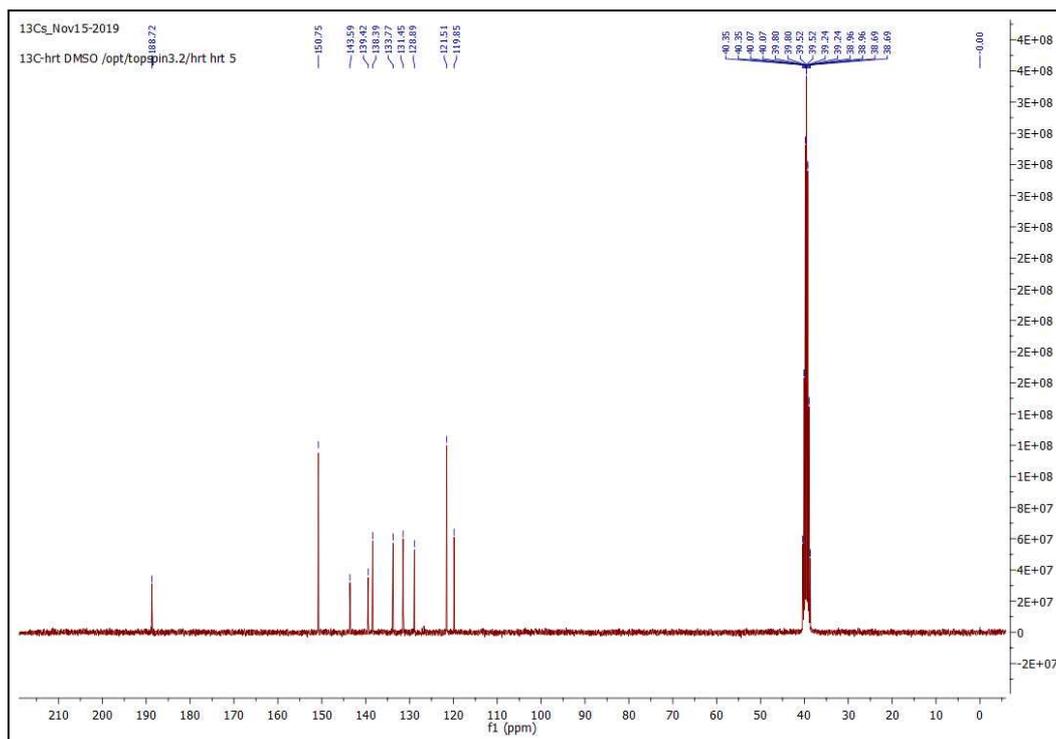


Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300.13 MHz) du composé 5b.

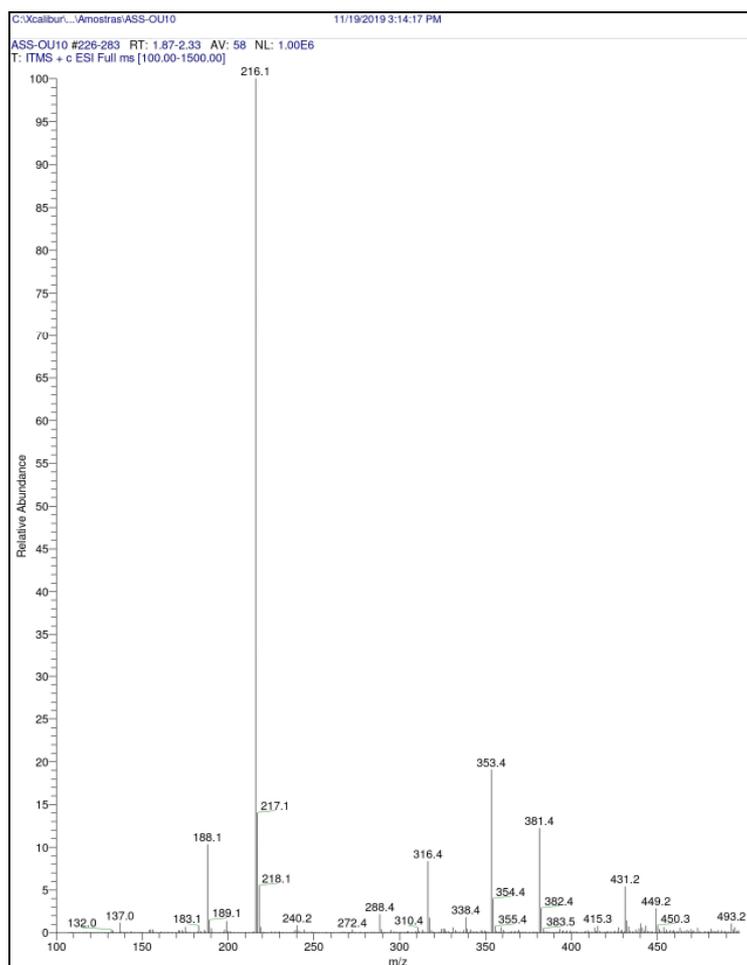


Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.47 MHz) du composé 5b.

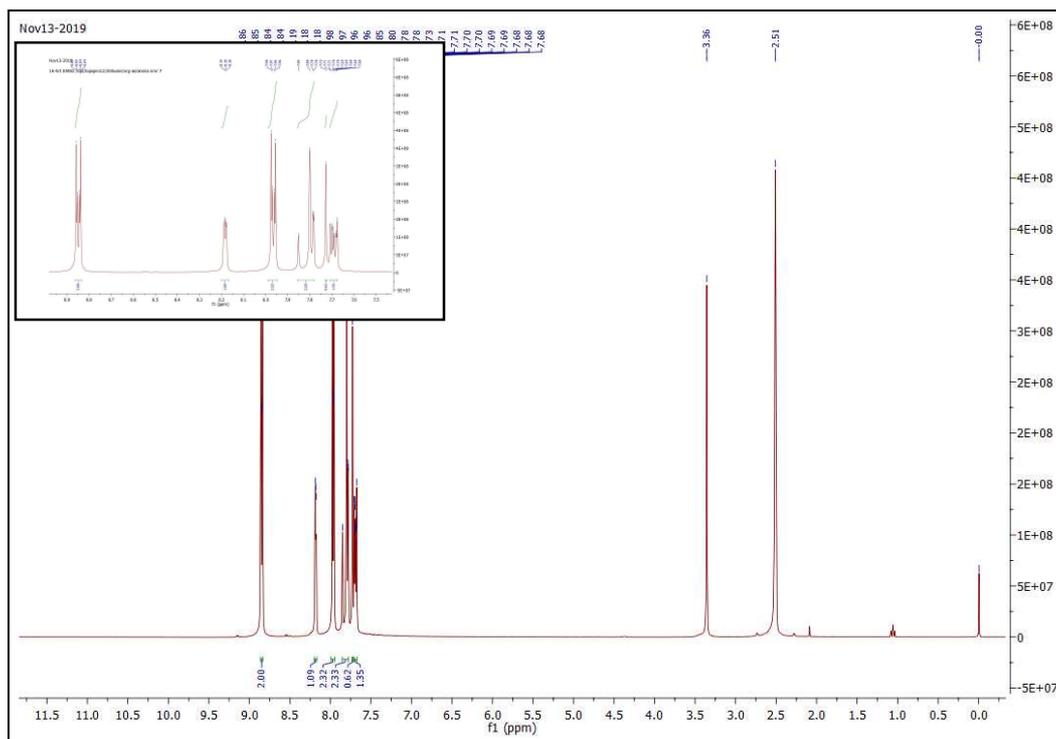
Spectre de masse ES-MS<sup>+</sup> du composé 3a.Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 300.13 MHz) du composé 3a.



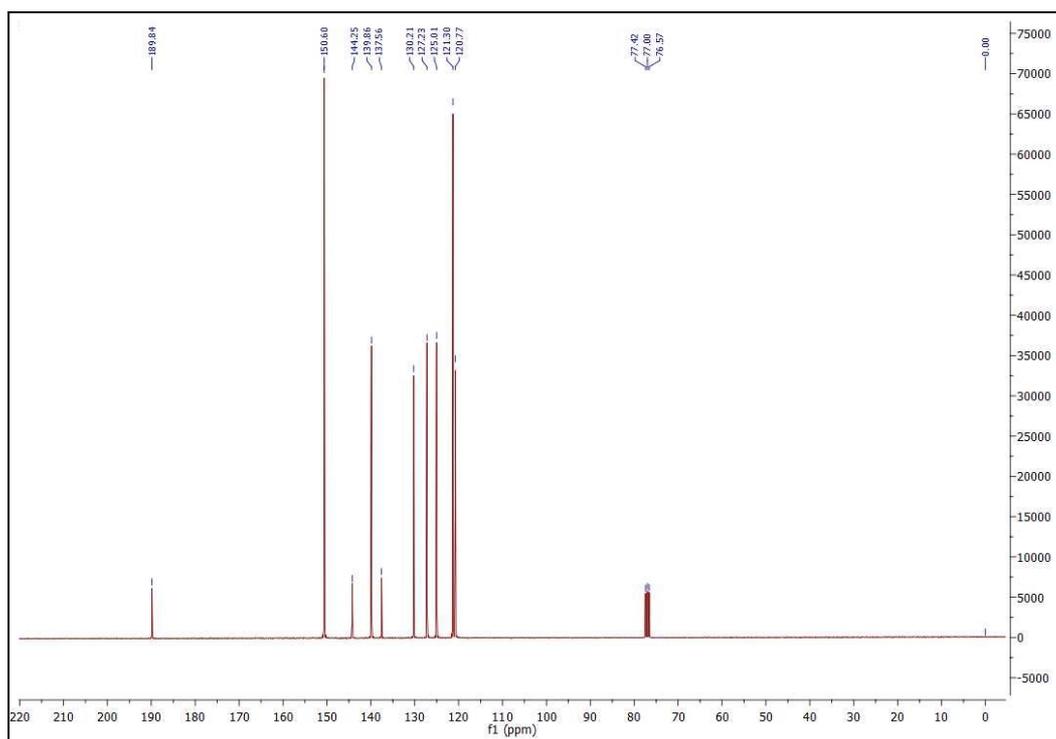
Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.47 MHz) du composé 3a.



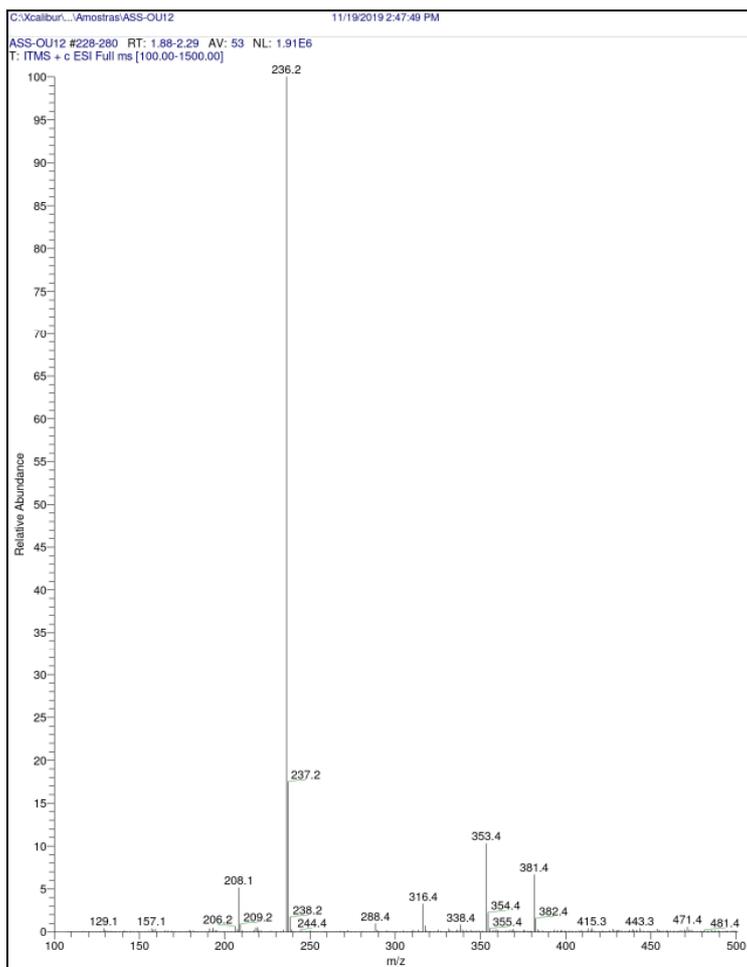
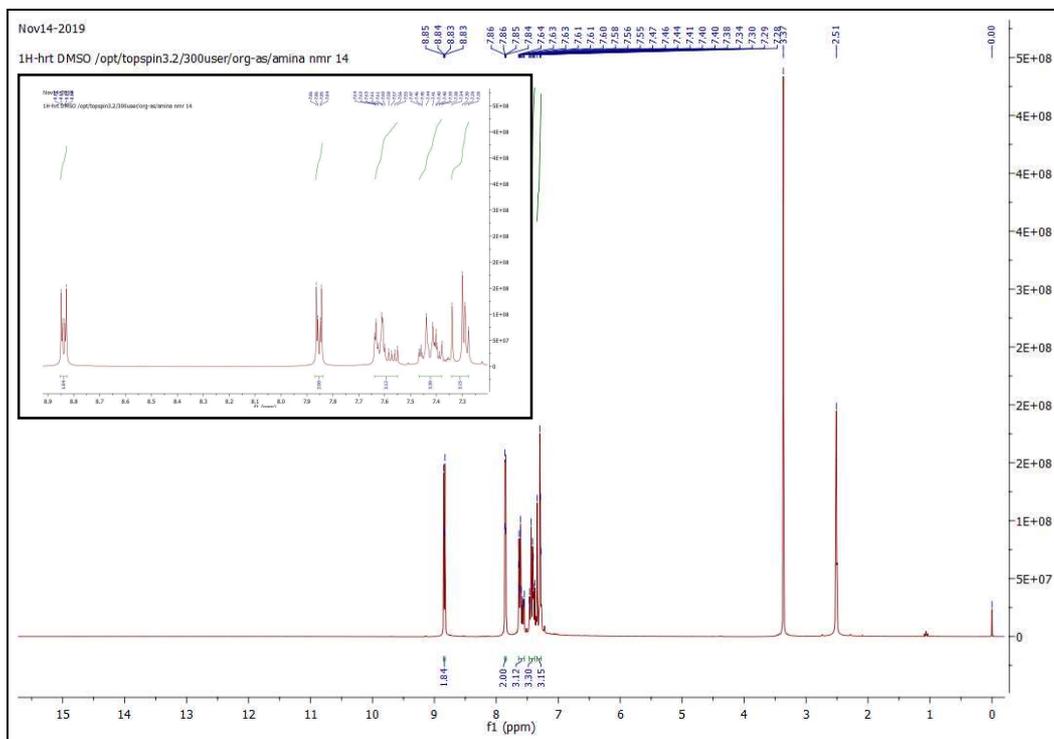
Spectre de masse ES- $\text{MS}^+$  du composé 3b.

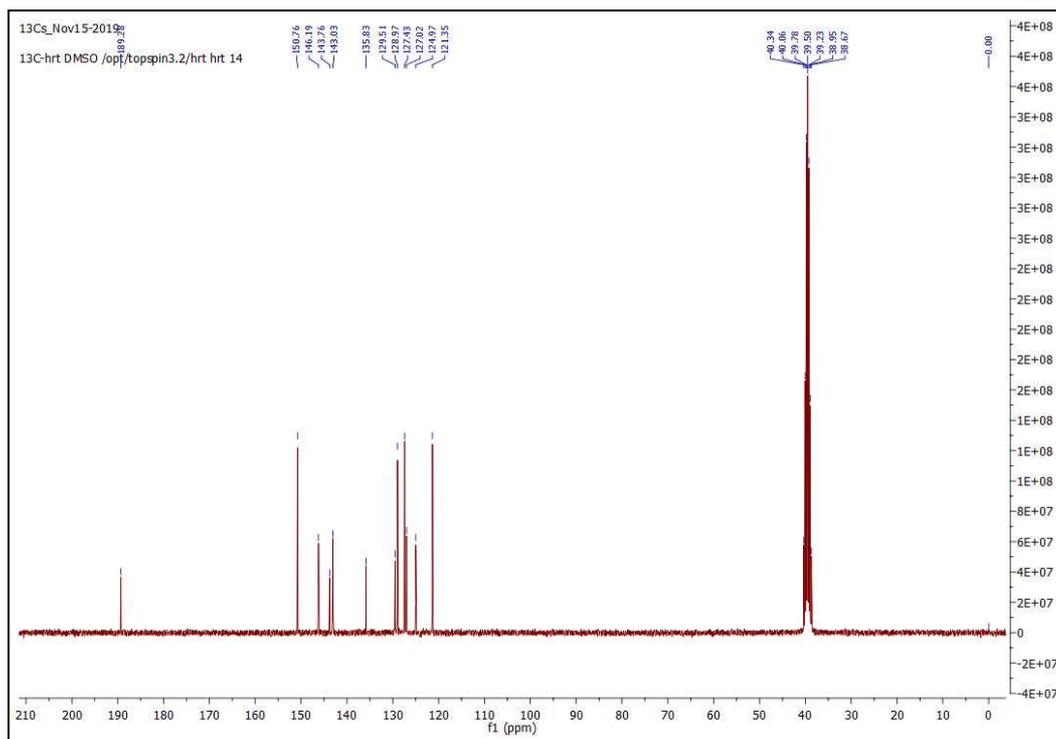


Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300.13 MHz) du composé 3b.

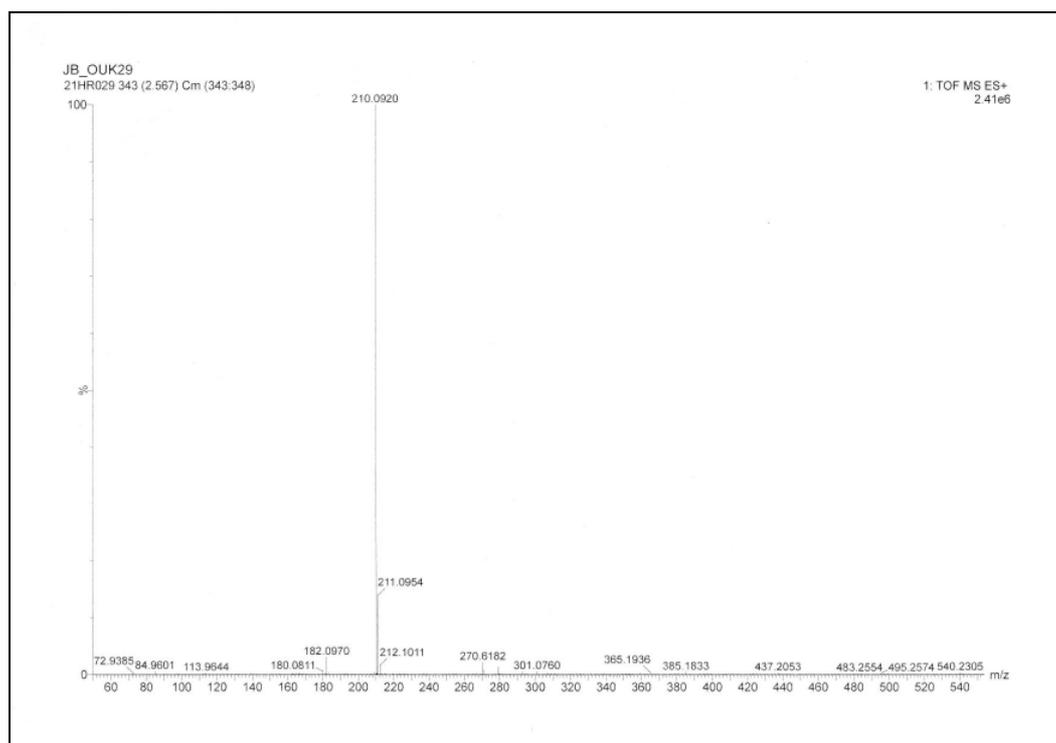


Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.47 MHz) du composé 3b.

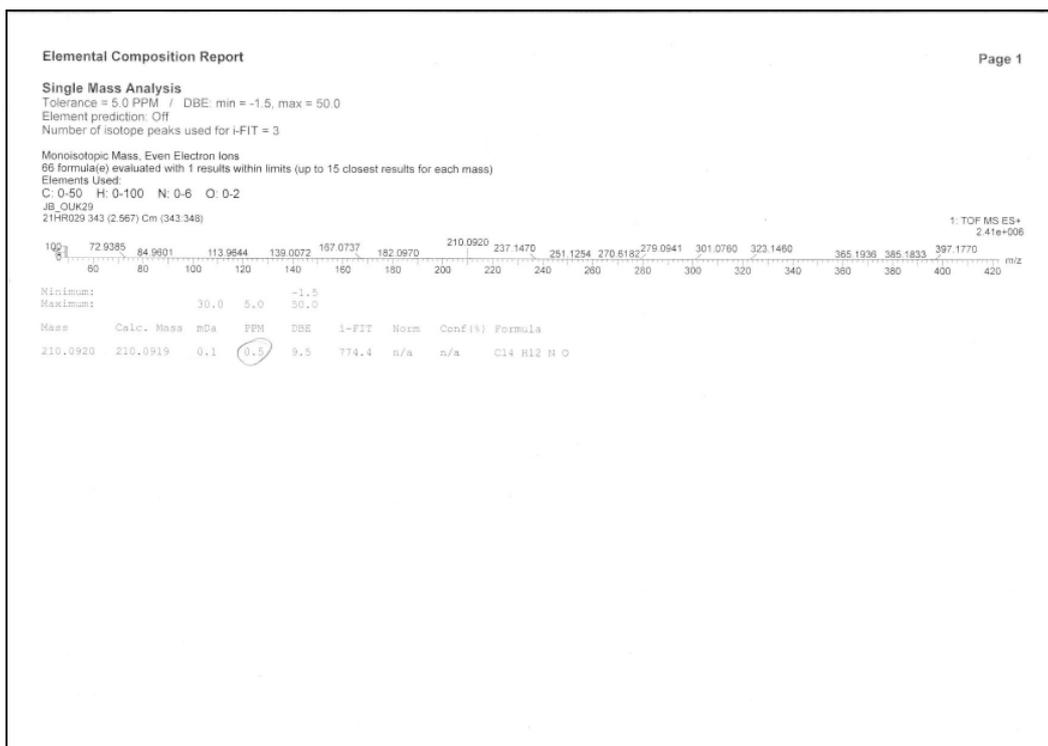
Spectre de masse ES-MS<sup>+</sup> du composé 3c.Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 300.13 MHz) du composé 3c.



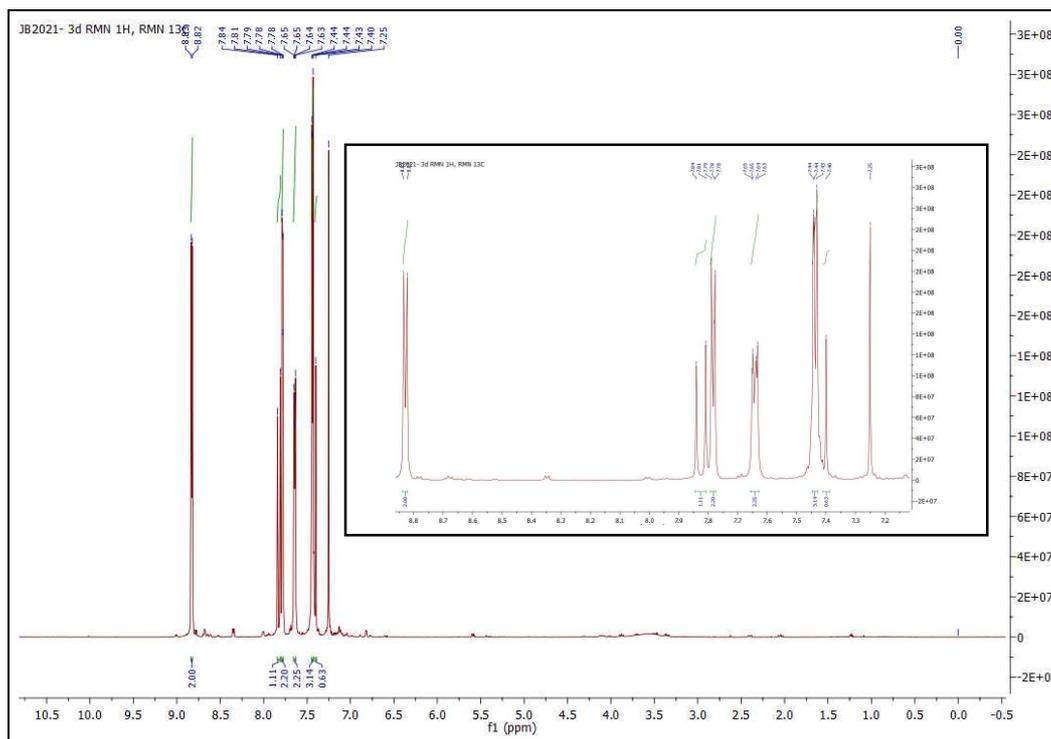
Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.47 MHz) du composé 3c.



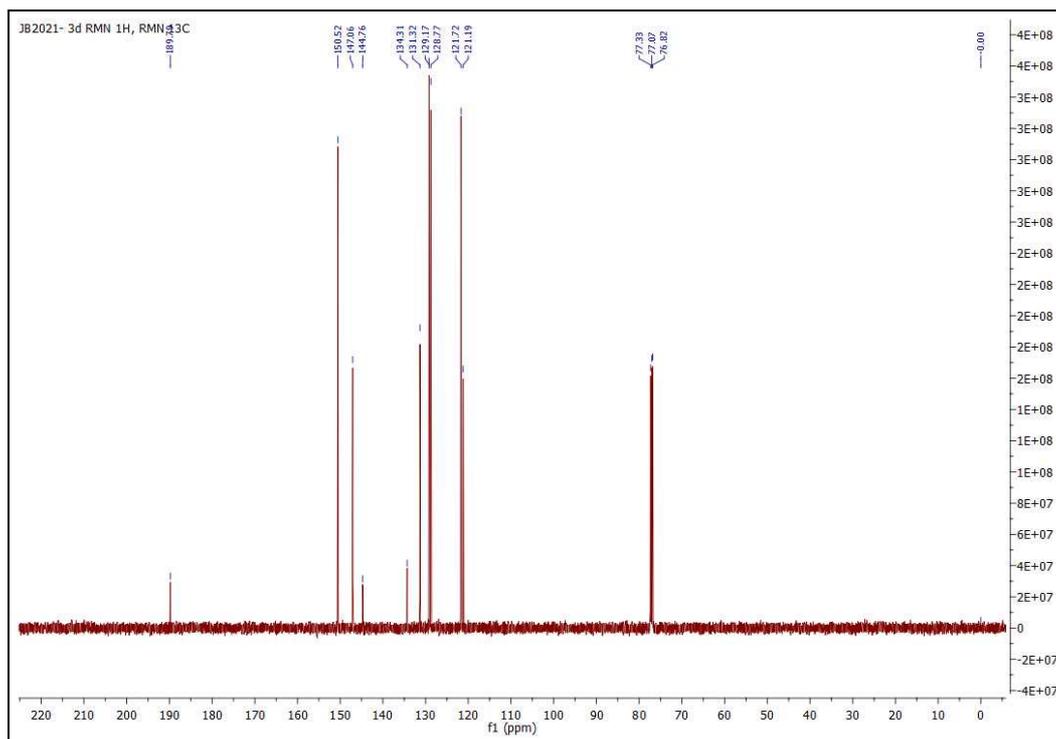
Spectre de masse ES- $\text{MS}^+$  du composé 3d.



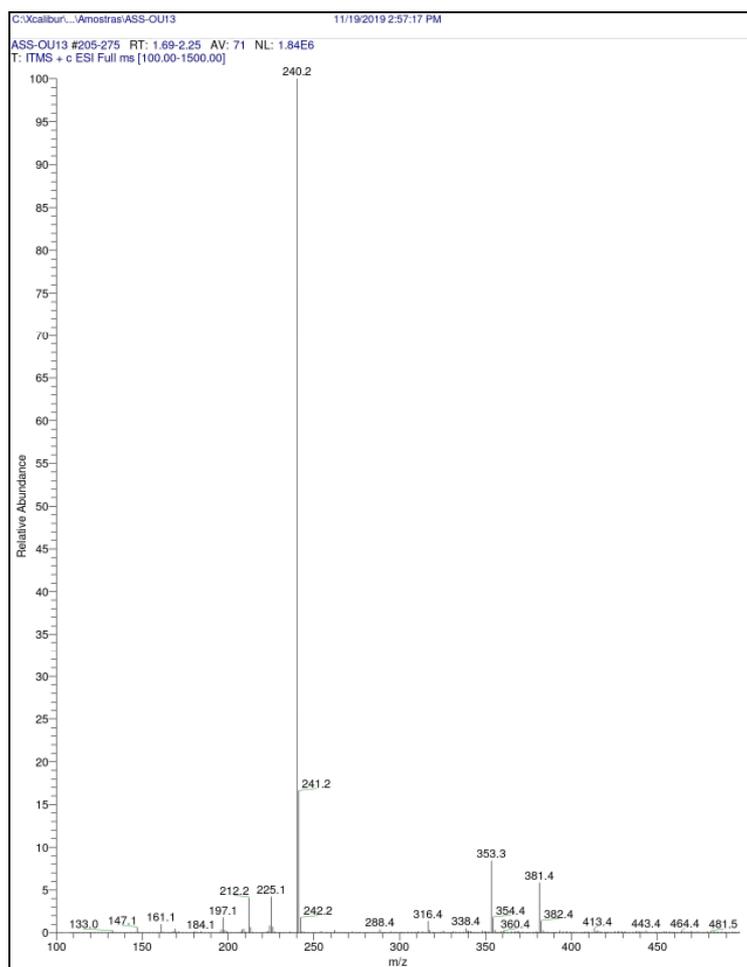
**Spectre de masse haute résolution du composé 3d.**



**Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500.28 MHz) du composé 3d.**



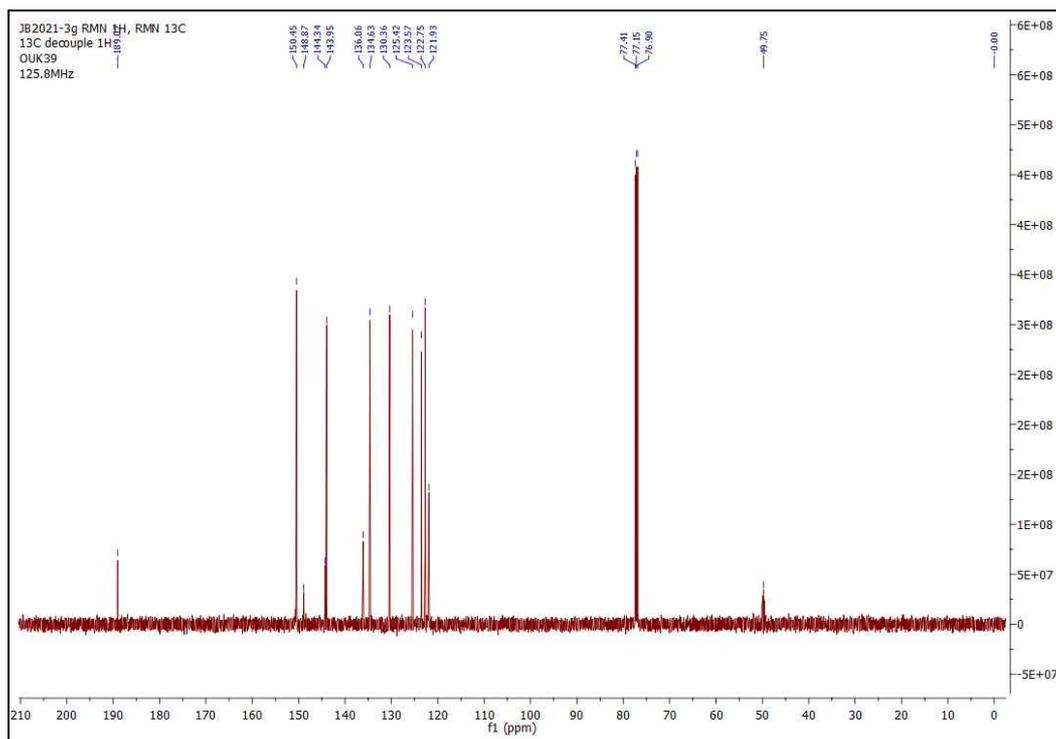
Spectre RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125.8 MHz) du composé 3d.



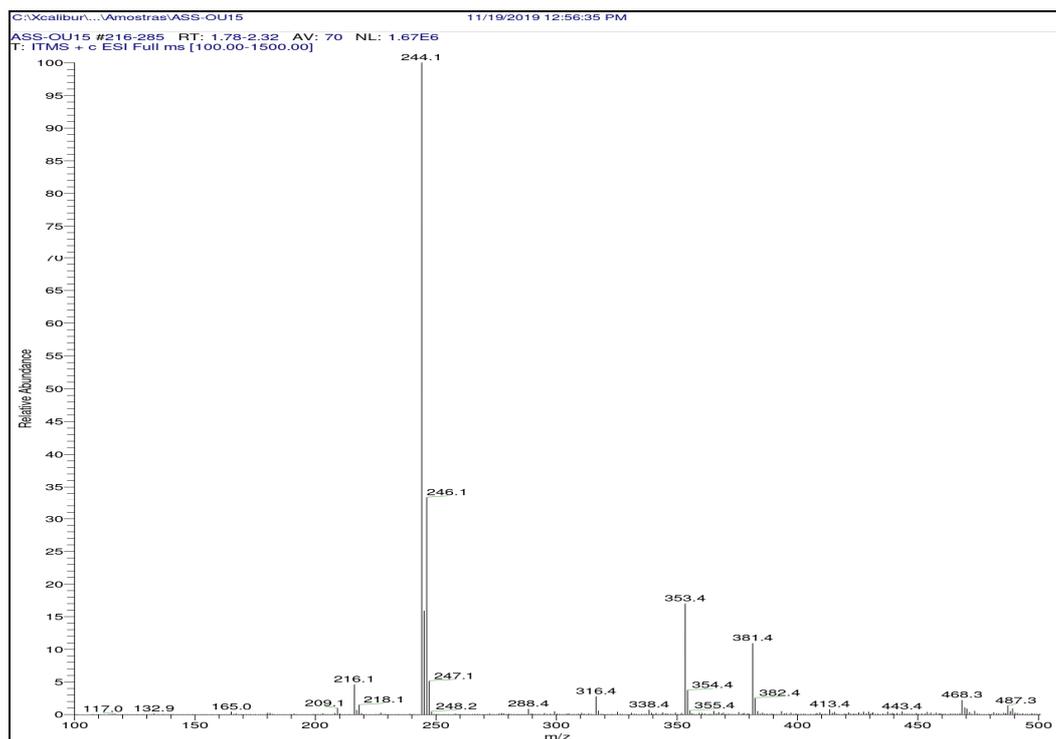
Spectre de masse ES-MS<sup>+</sup> du composé 3e.



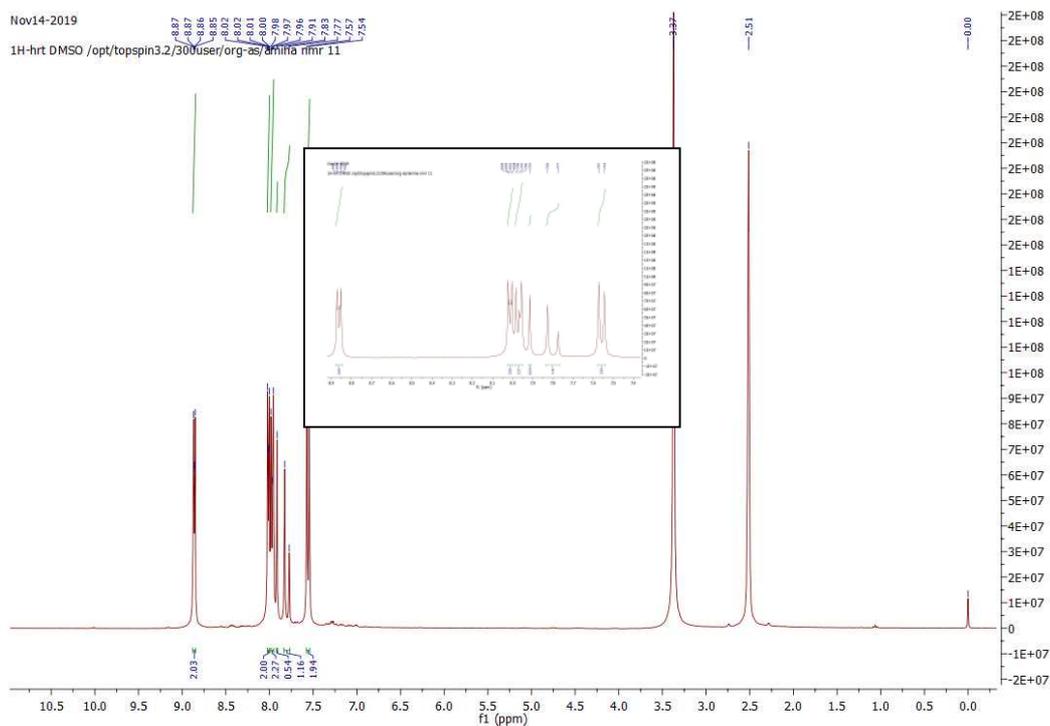
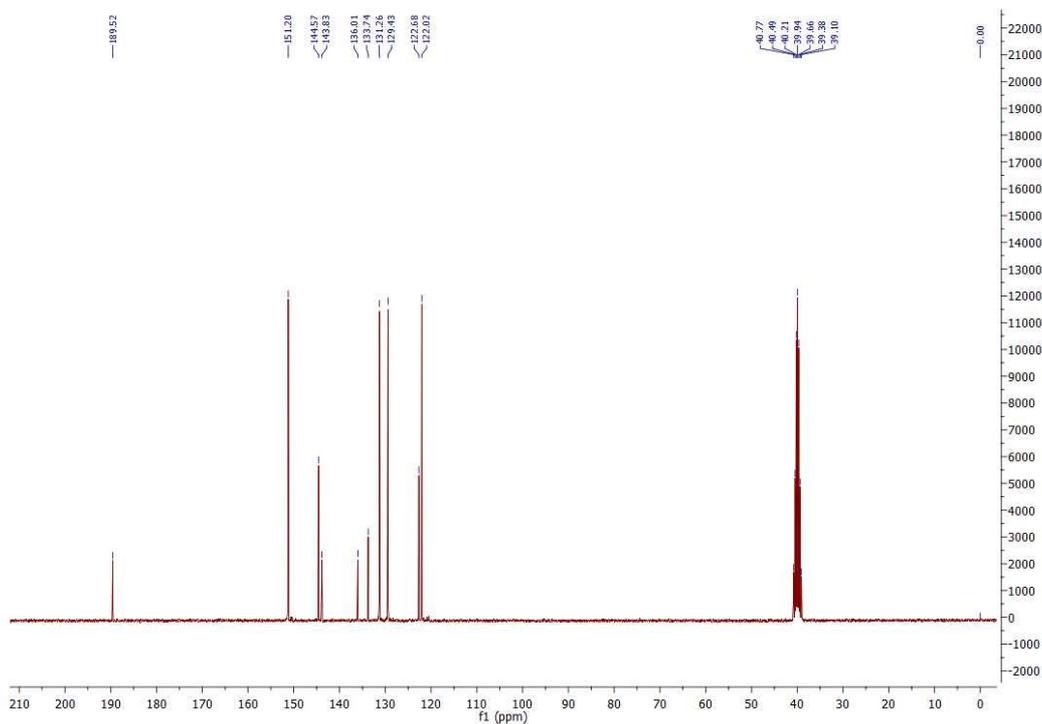


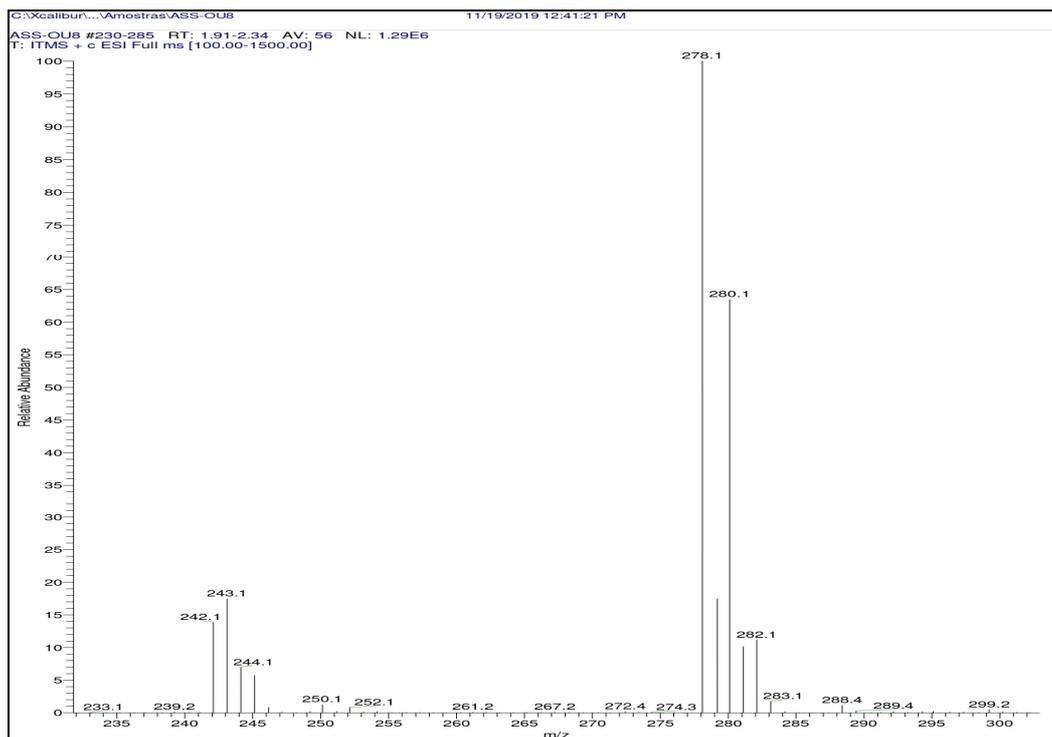


Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , + quelques gouttes  $\text{CH}_3\text{OD}$ , 125.8 MHz) du composé 3g.

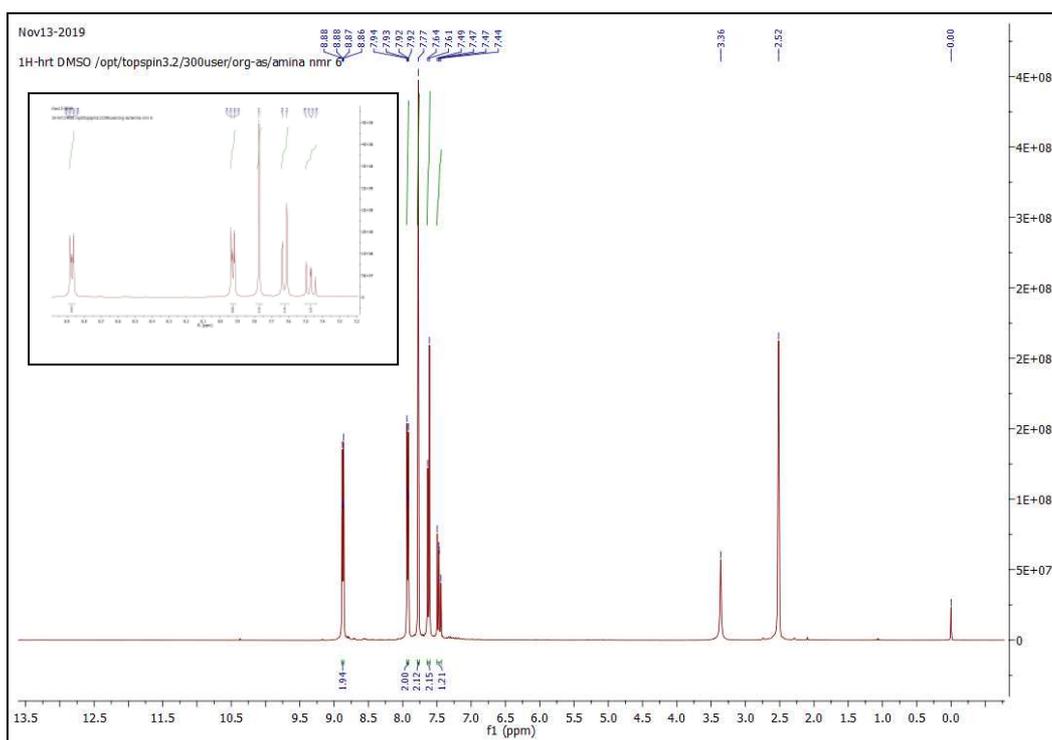


Spectre de masse ES- $\text{MS}^+$  du composé 3h.

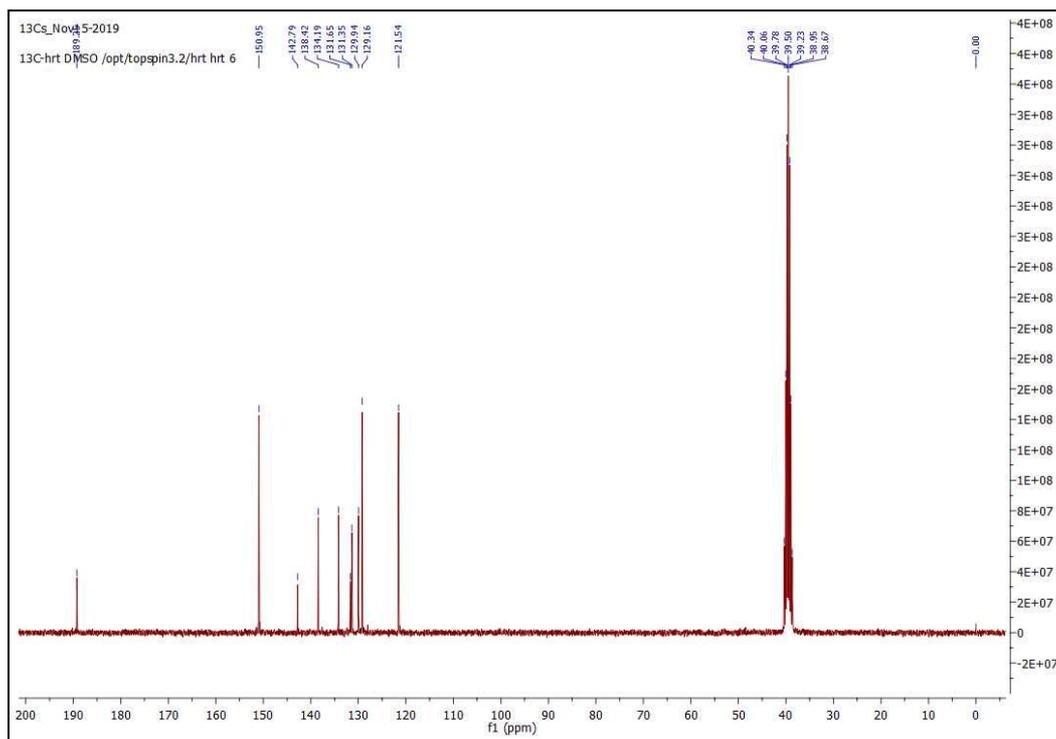
Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300.13 MHz) du composé 3h.Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.47 MHz) du composé 3h.



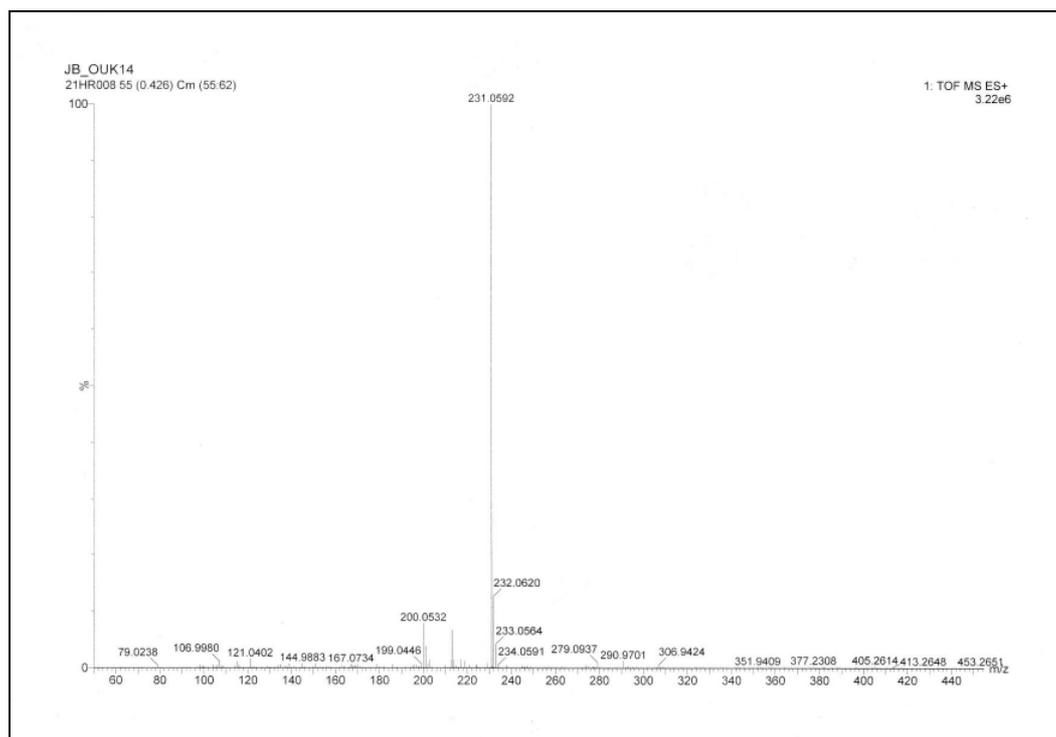
Spectre de masse ES-MS<sup>+</sup> du composé 3i.



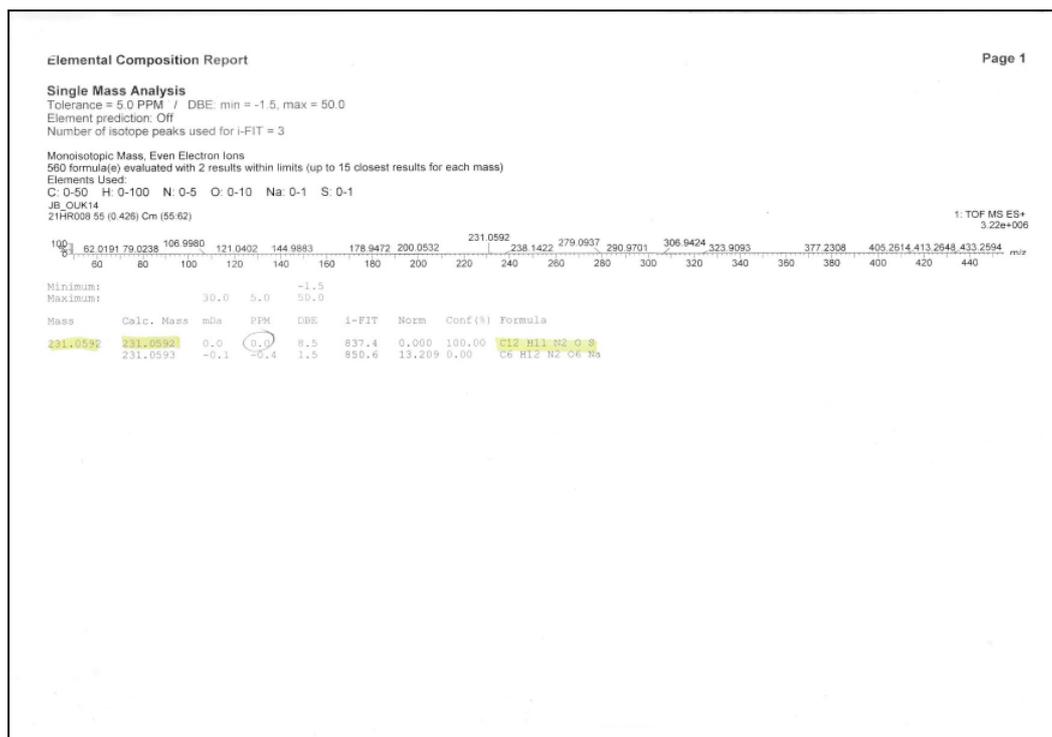
Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 300.13 MHz) du composé 3i.



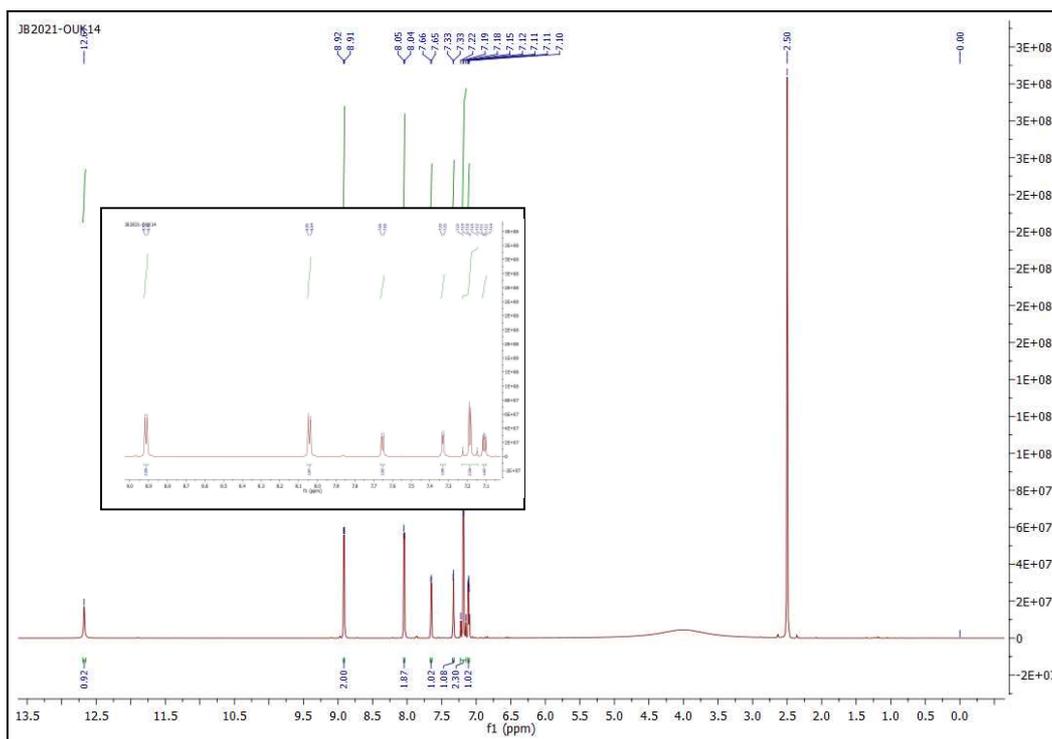
Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75.47 MHz) du composé 3i.

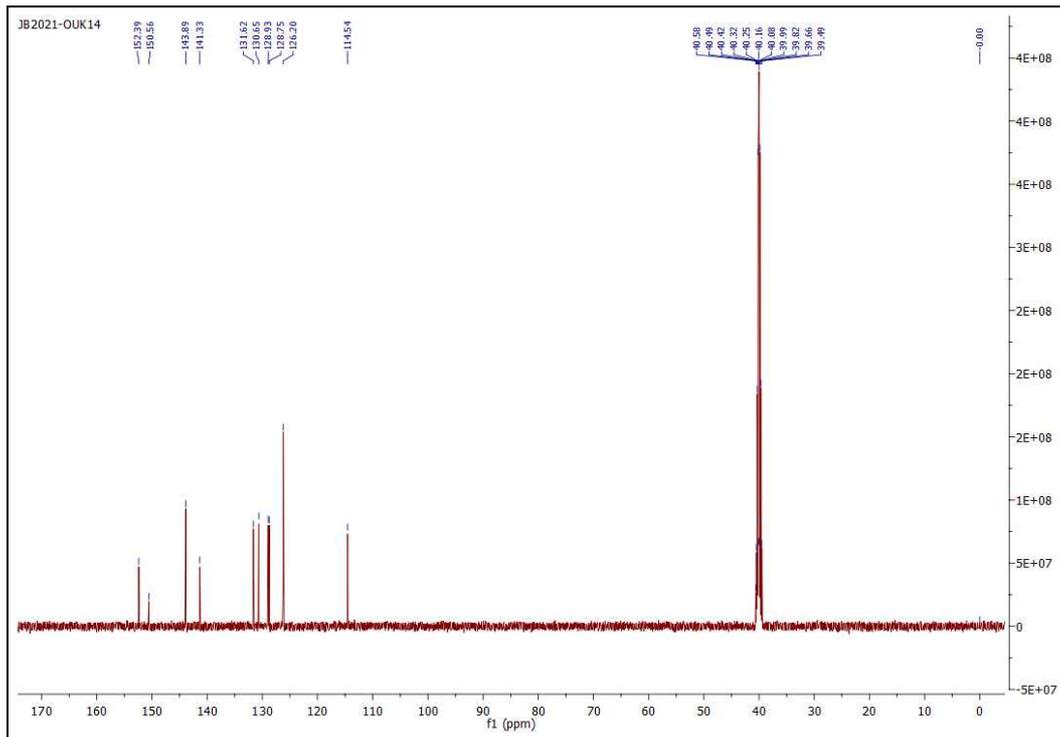


Spectre de masse ES- $\text{MS}^+$  du composé 4a.

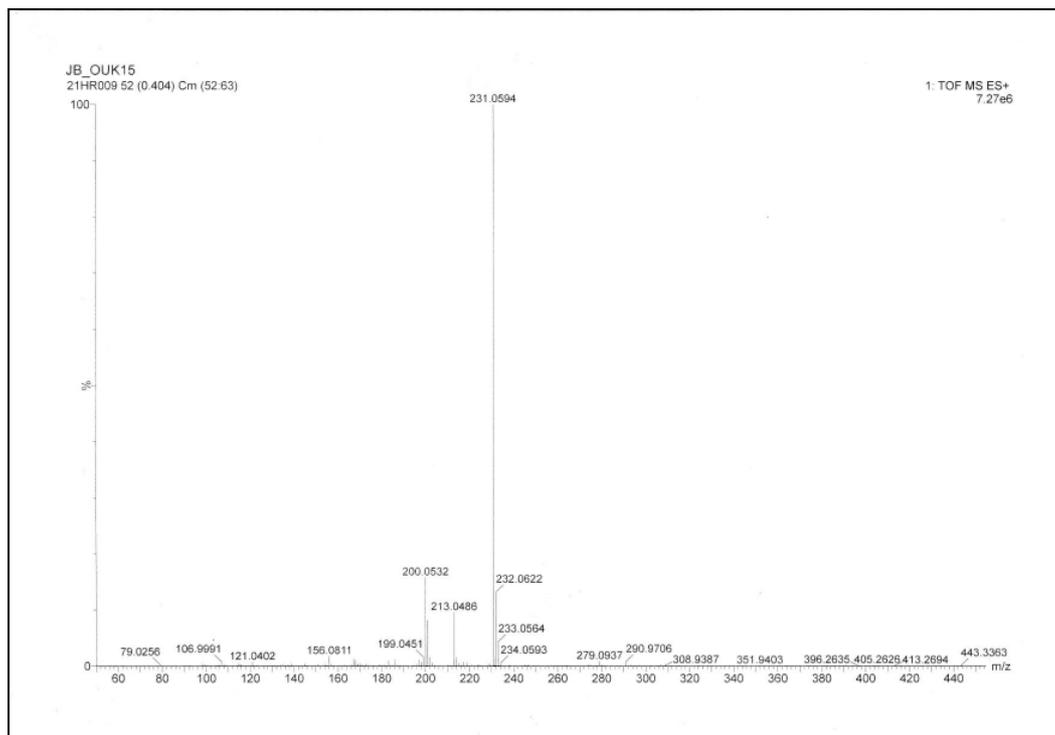


Spectre de masse haute résolution du composé 4a.

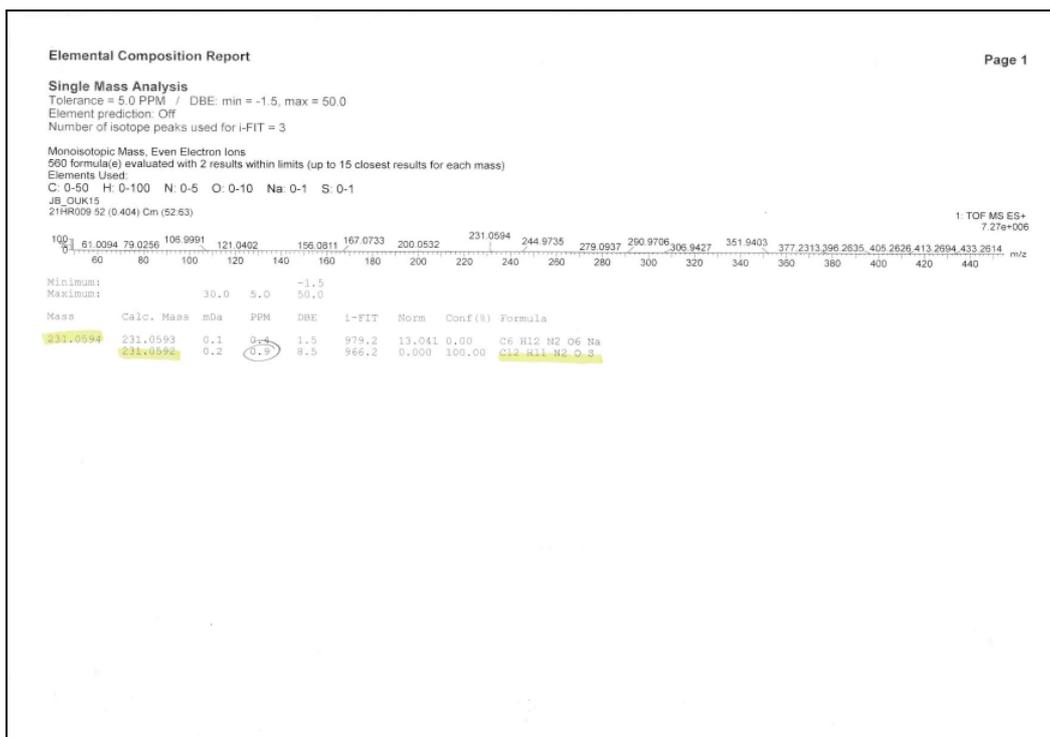
Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500.28 MHz) du composé 4a.



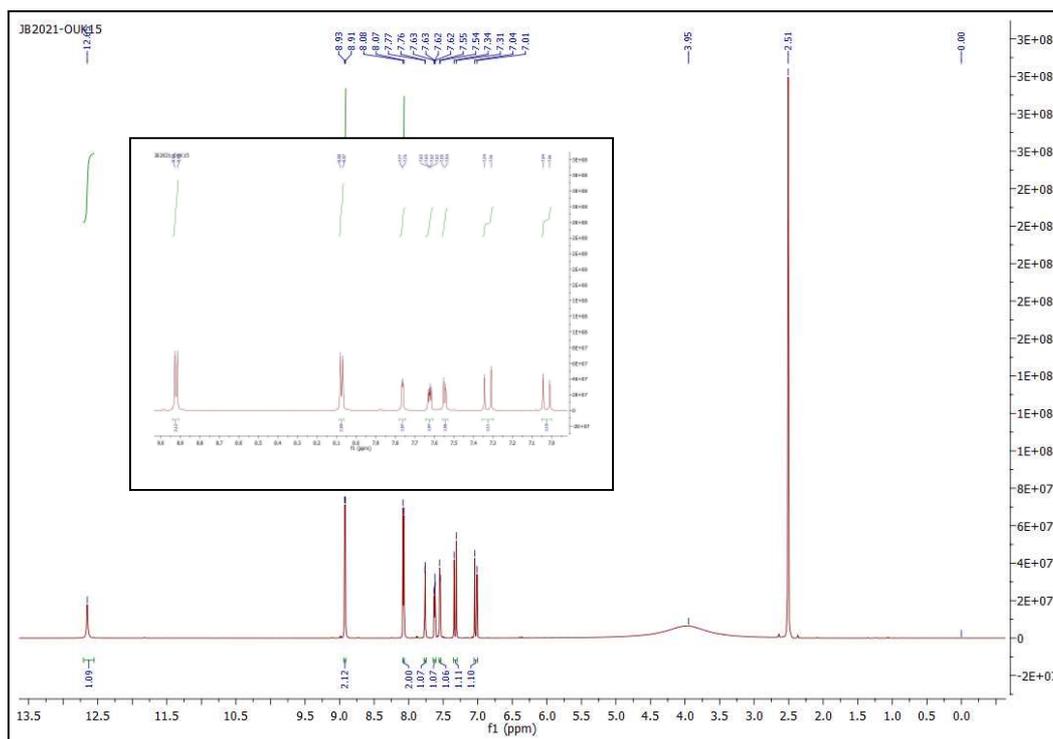
Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125.8 MHz) du composé 4a.



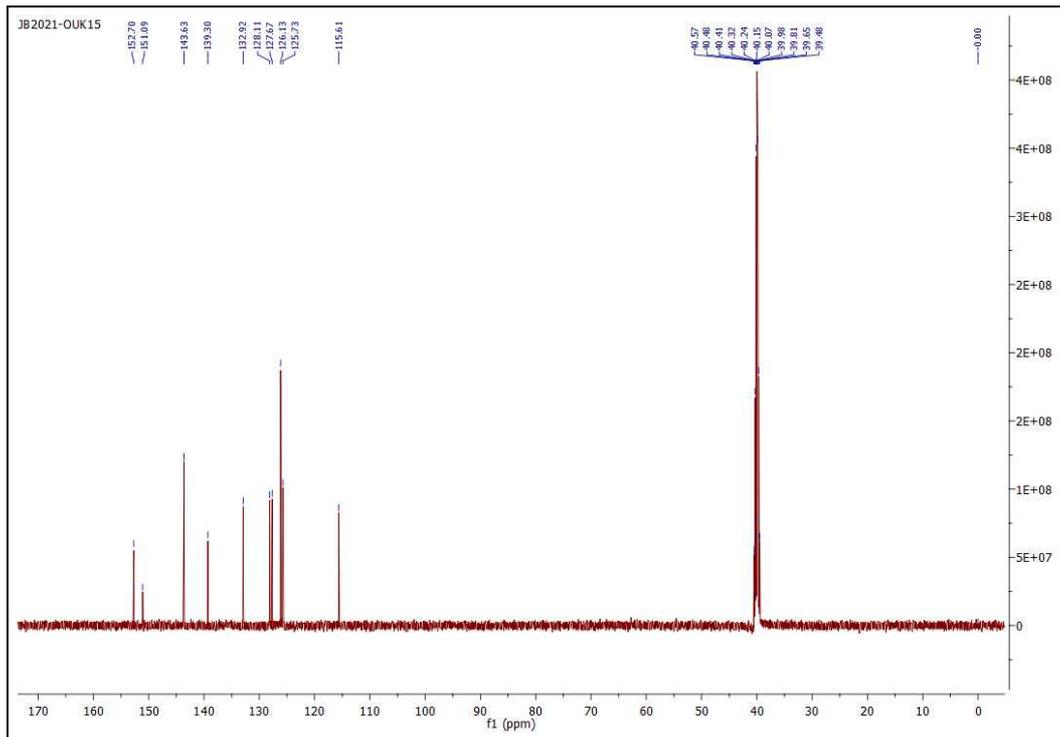
Spectre de masse ES- $\text{MS}^+$  du composé 4b.



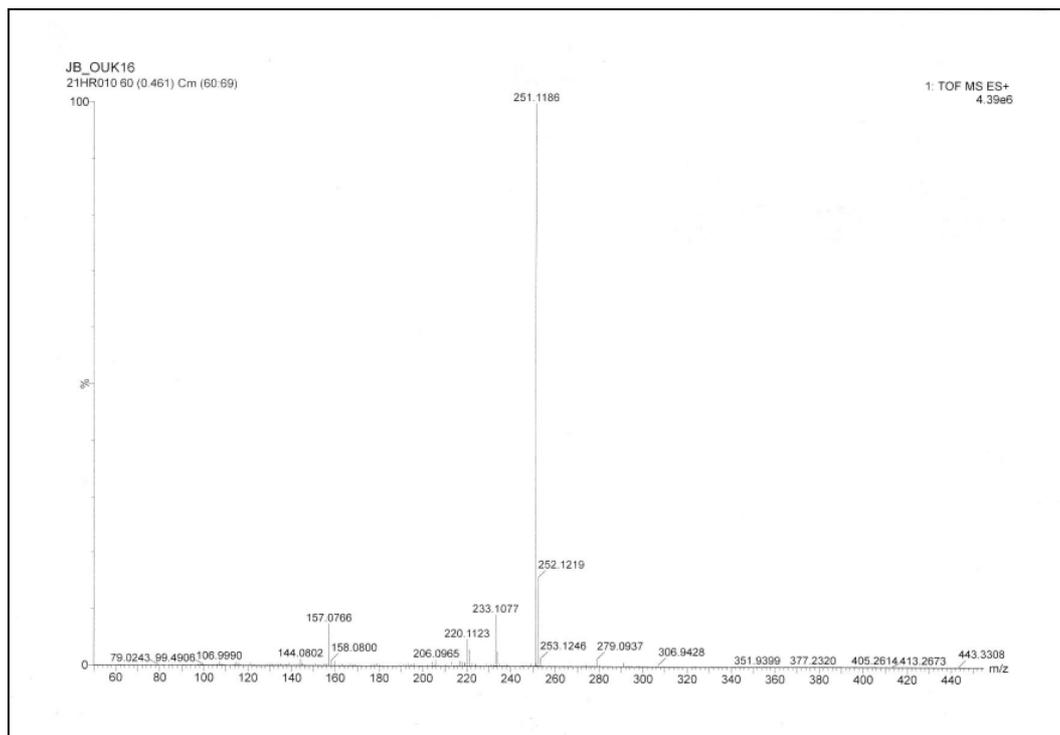
**Spectre de masse haute résolution du composé 4b.**



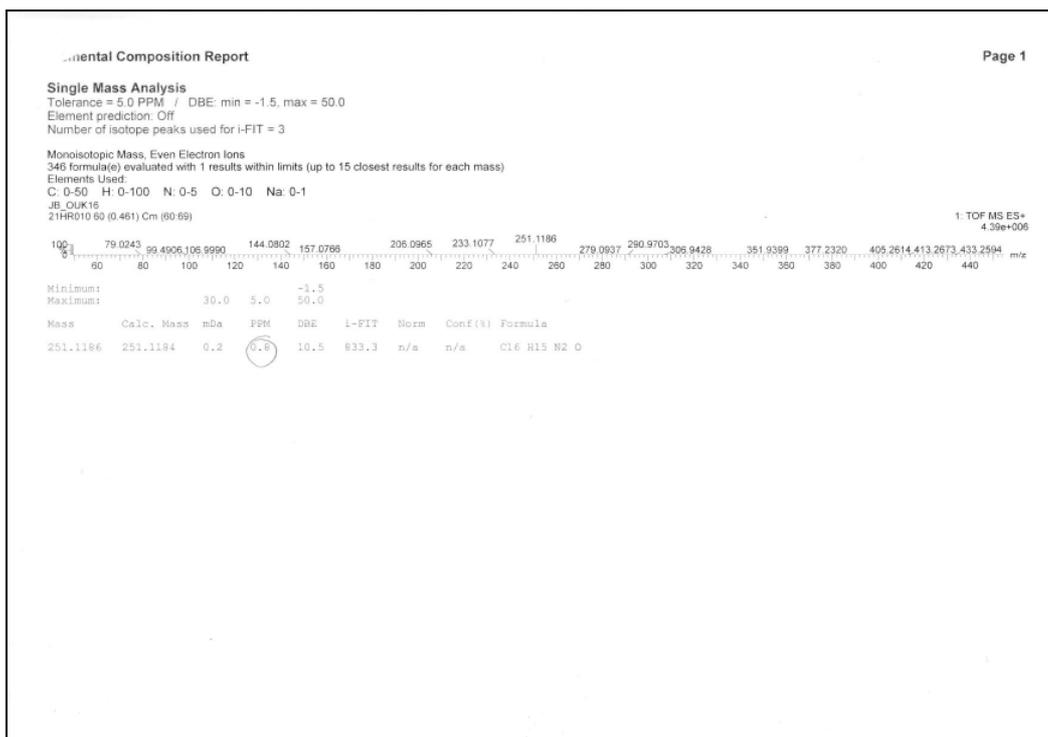
**Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500.28 MHz) du composé 4b.**



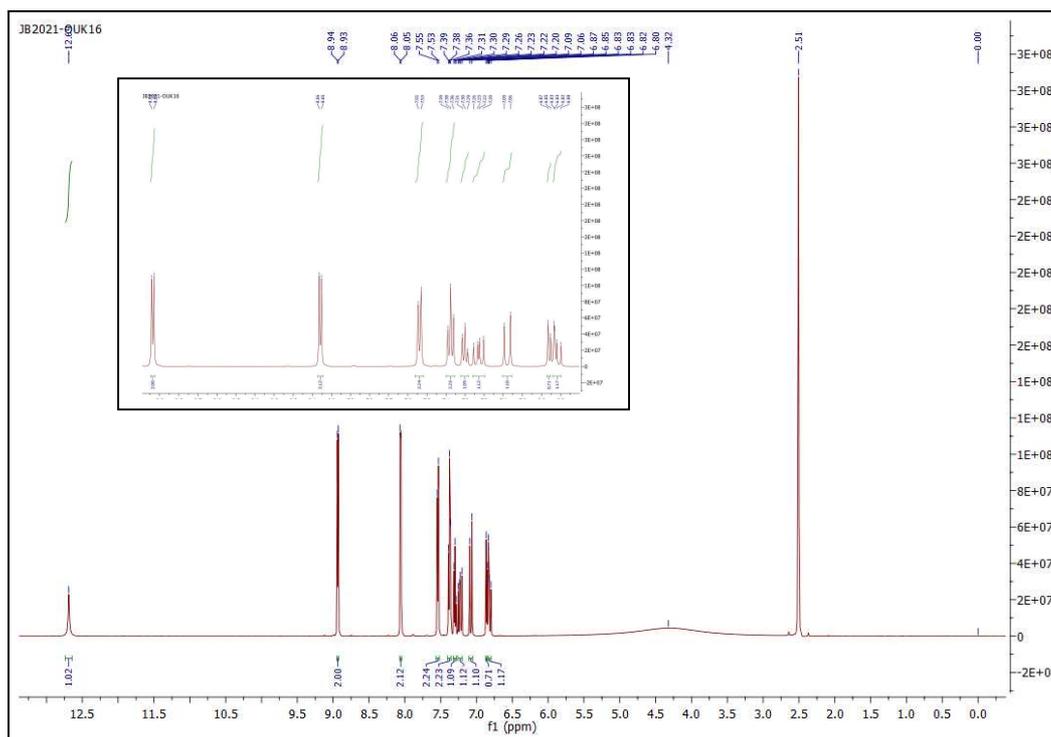
Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125.8 MHz) du composé 4b.



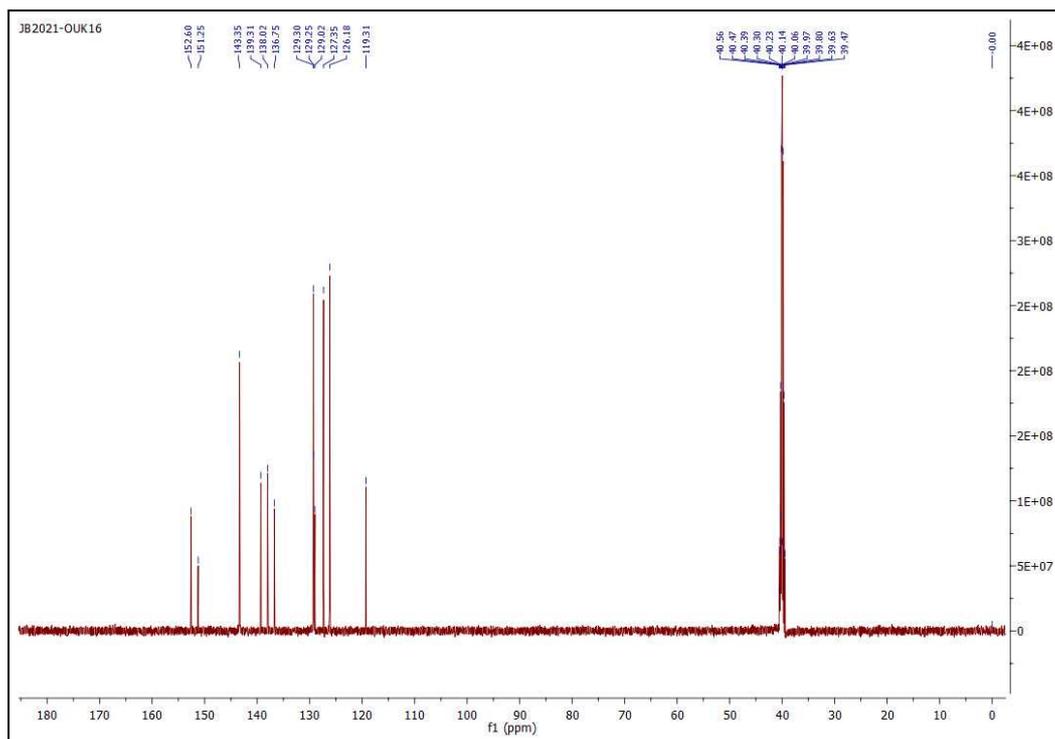
Spectre de masse ES- $\text{MS}^+$  du composé 4c.



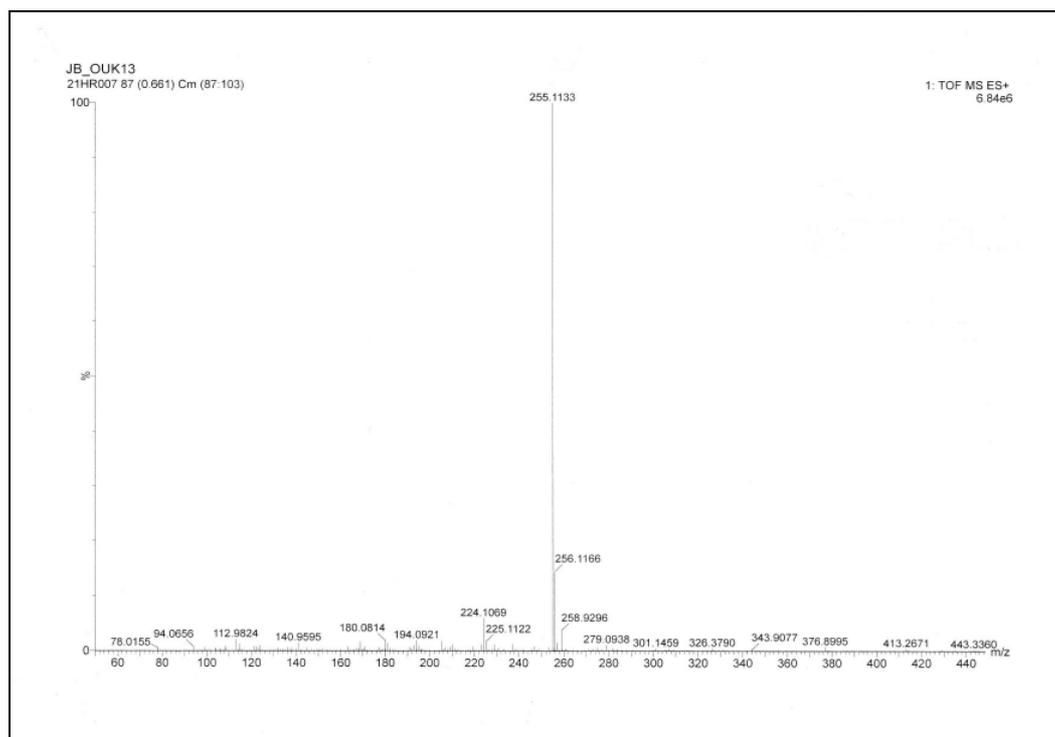
**Spectre de masse haute résolution du composé 4c.**



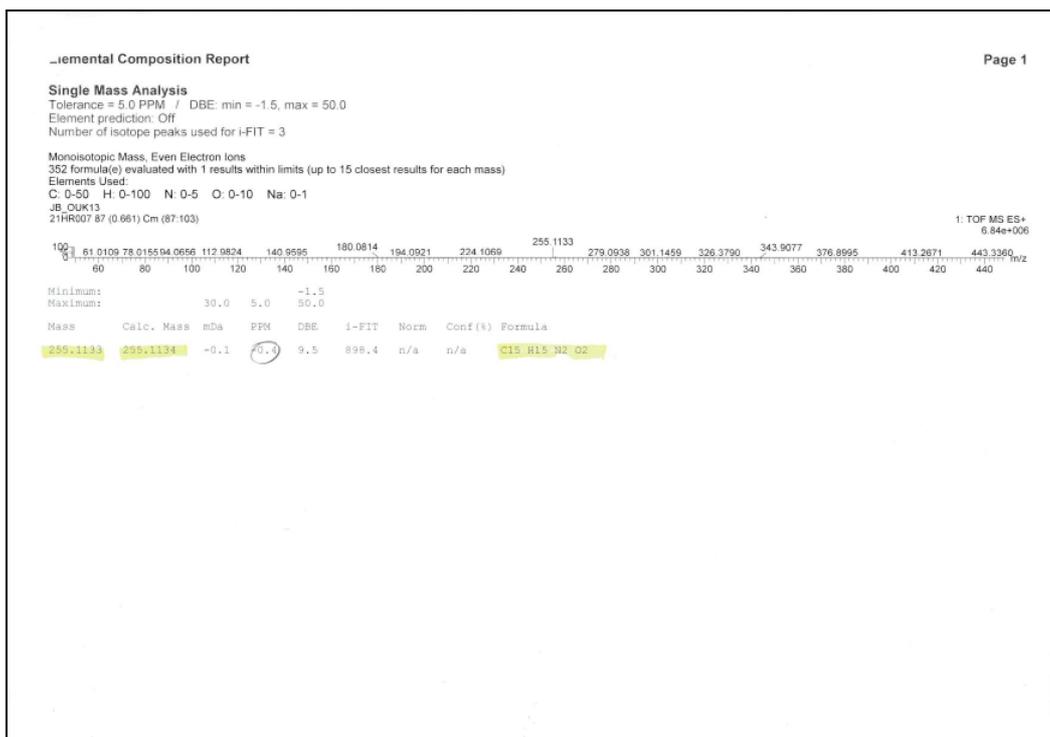
**Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500.28 MHz) du composé 4c.**



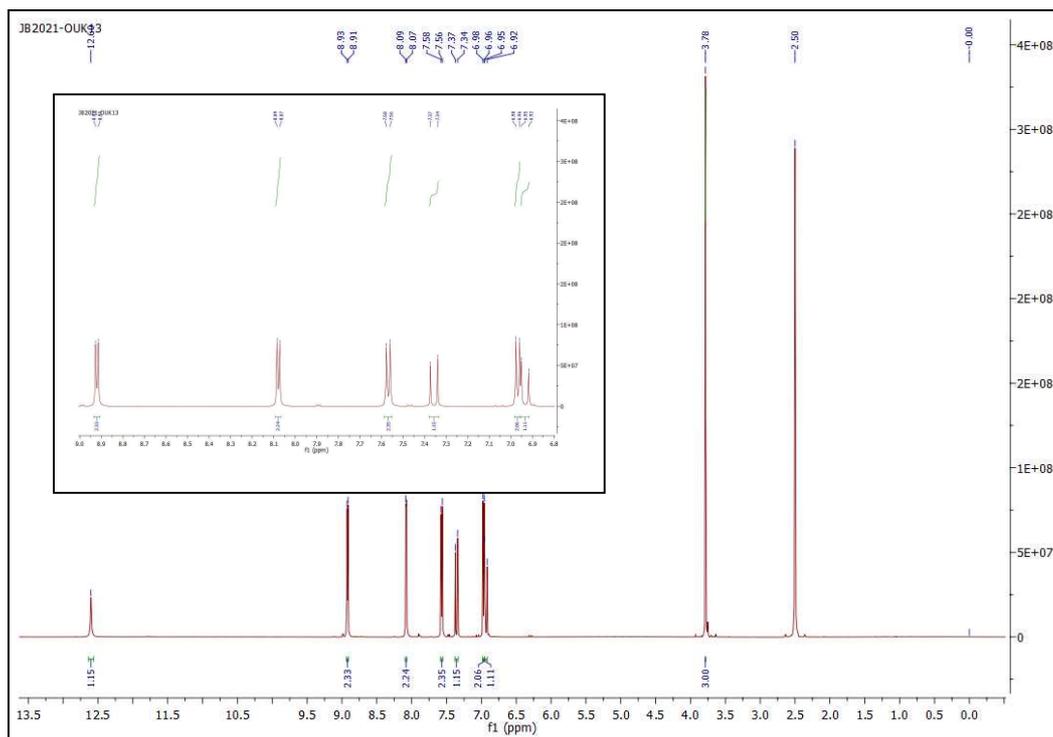
Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125.8 MHz) du composé 4c.



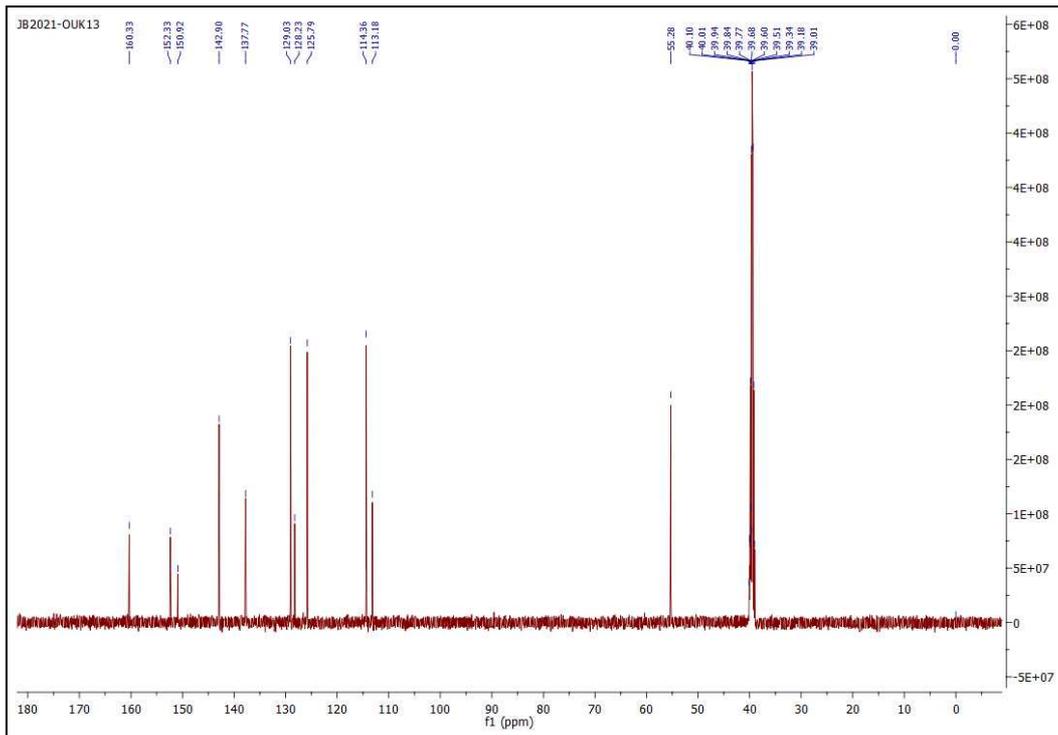
Spectre de masse ES- $\text{MS}^+$  du composé 4e.



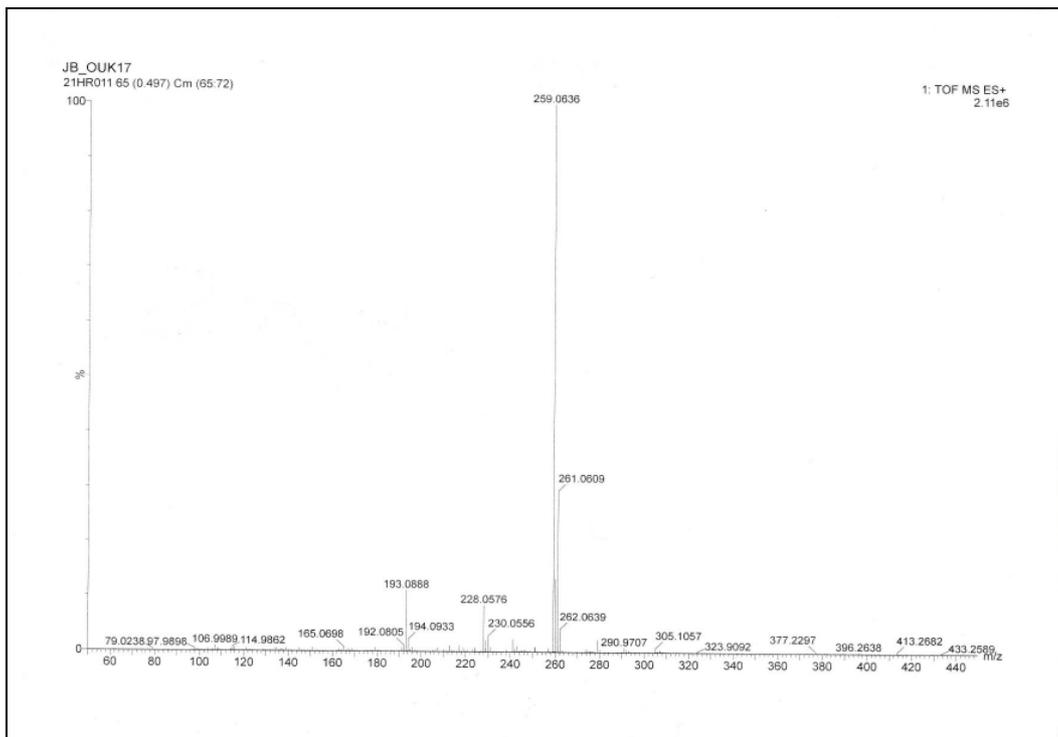
Spectre de masse haute résolution du composé 4e.



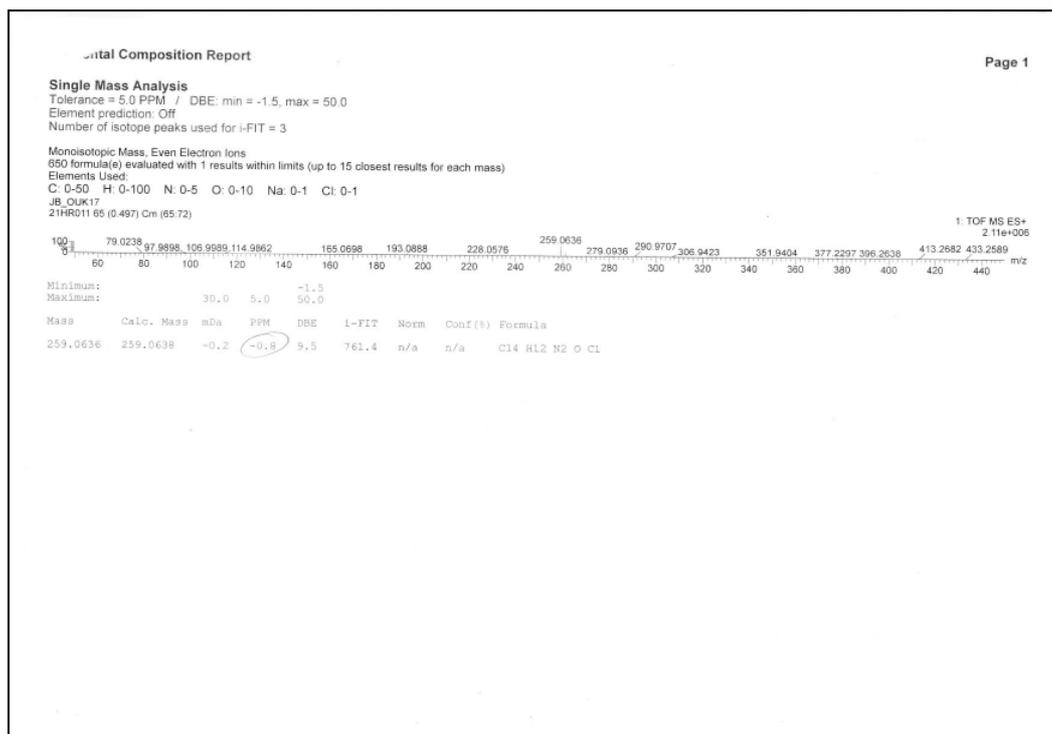
Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 500.28 MHz) du composé 4e.



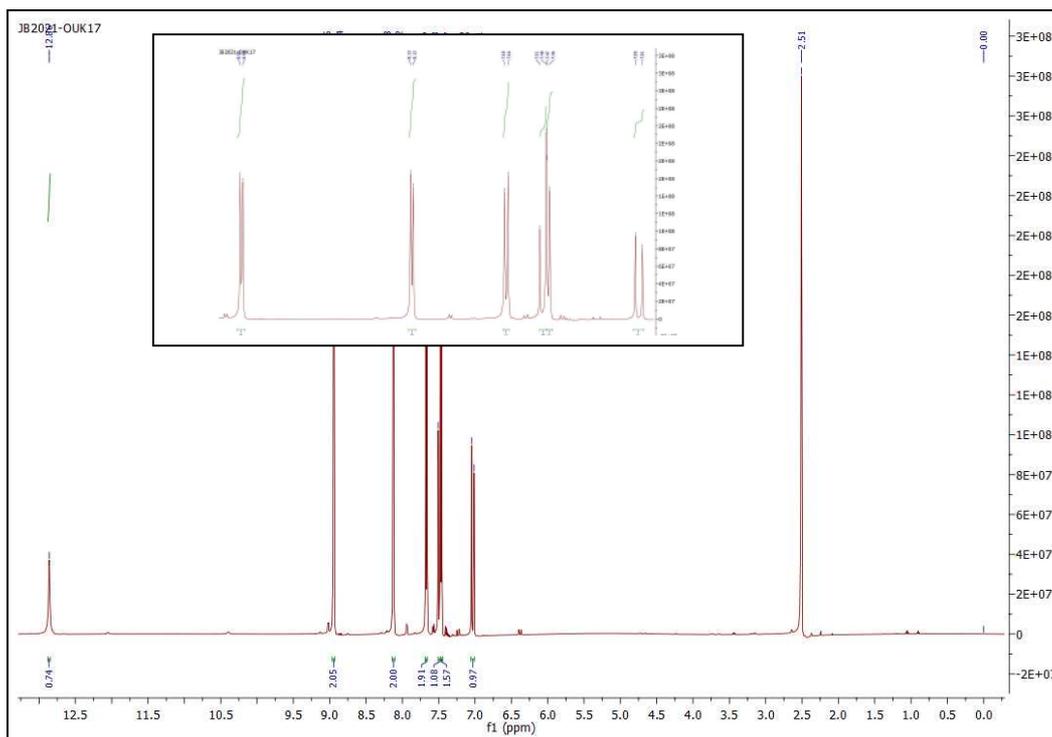
Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125.8 MHz) du composé 4e.

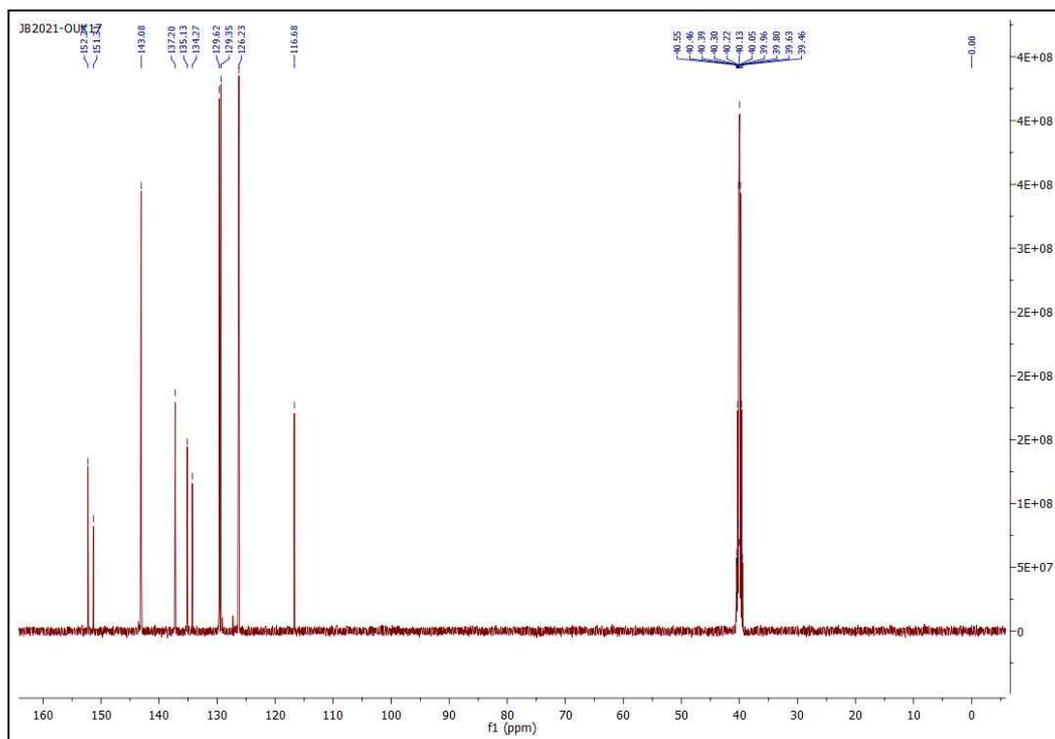
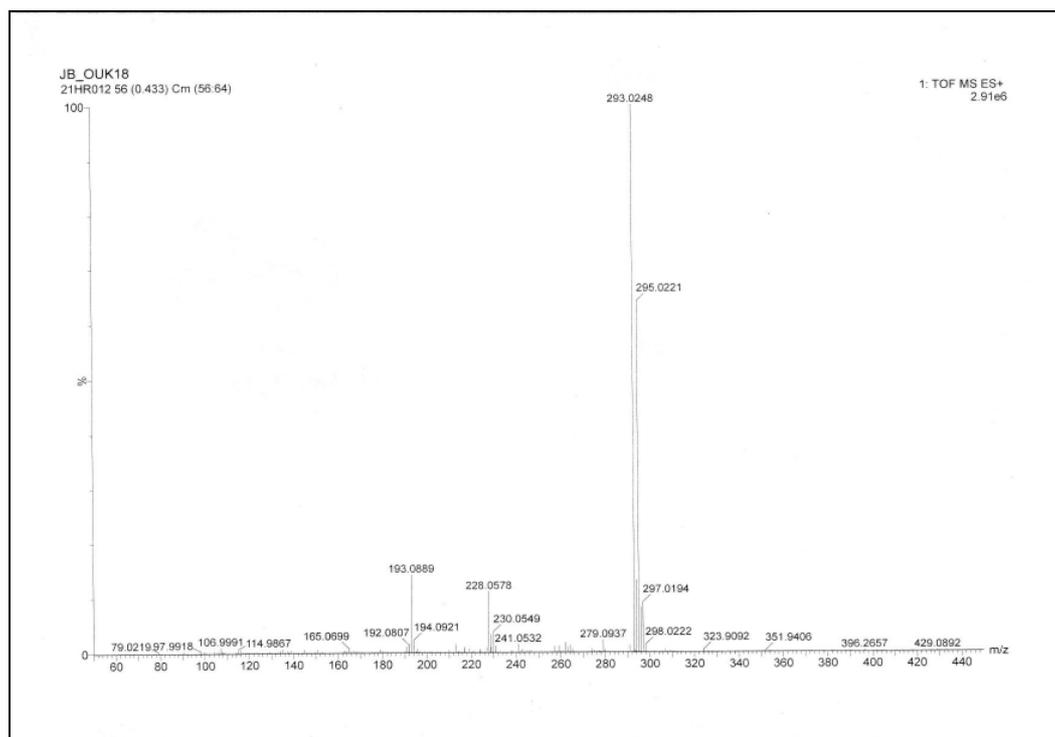


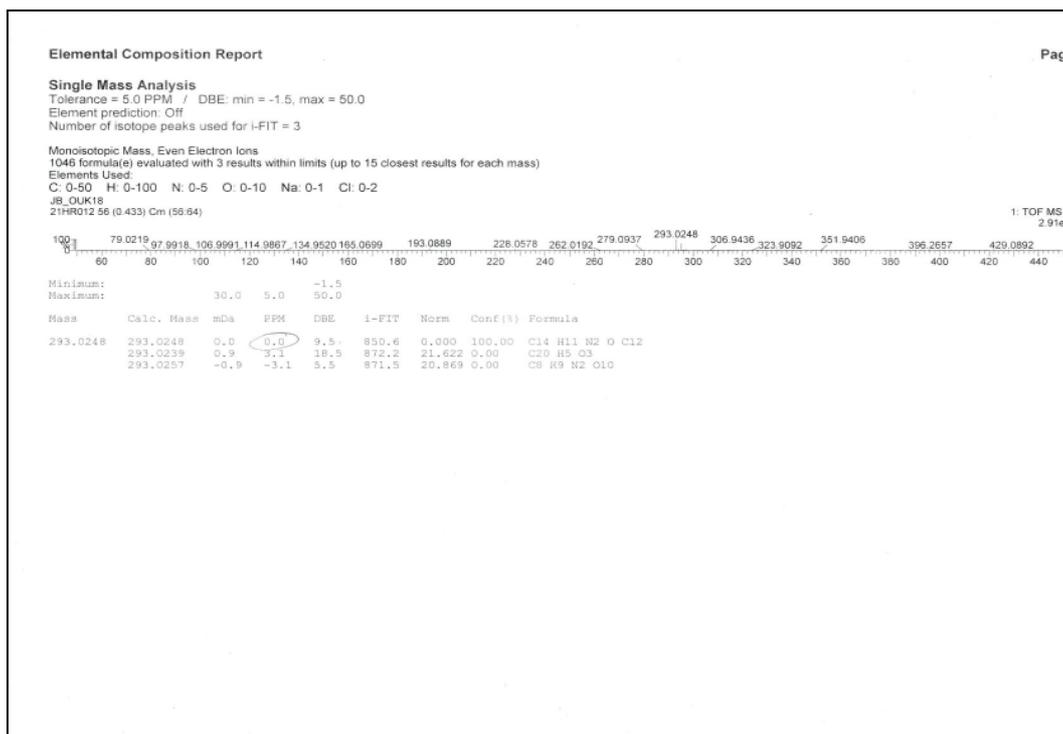
Spectre de masse ES- $\text{MS}^+$  du composé 4h.



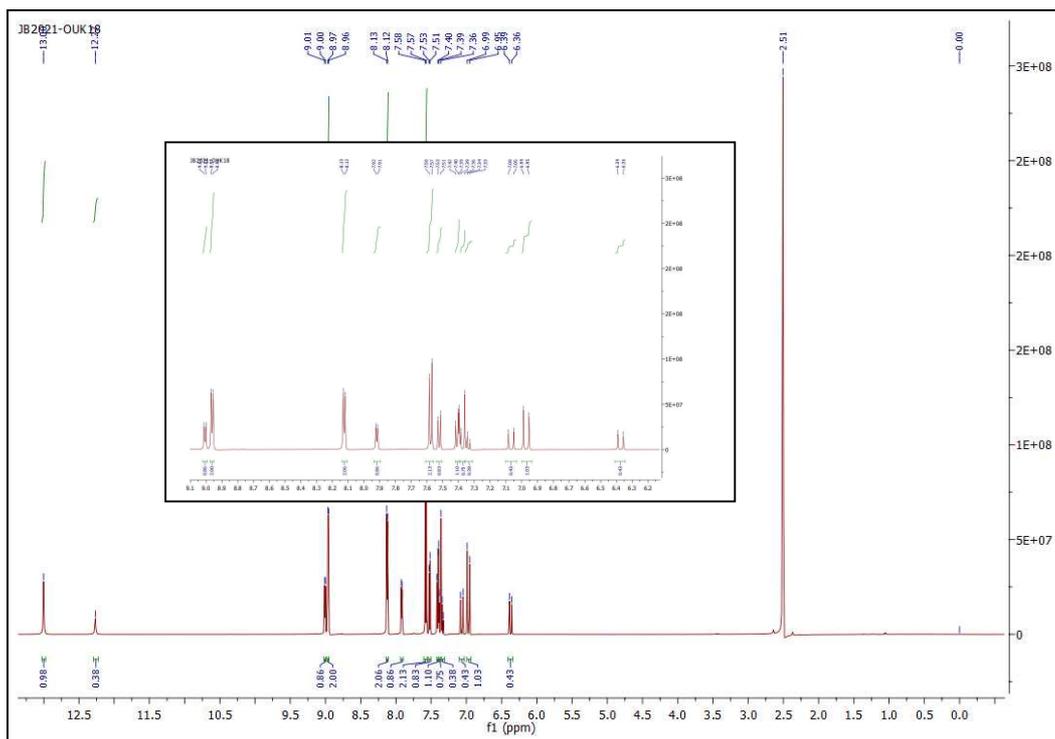
Spectre de masse haute résolution du composé 4h.

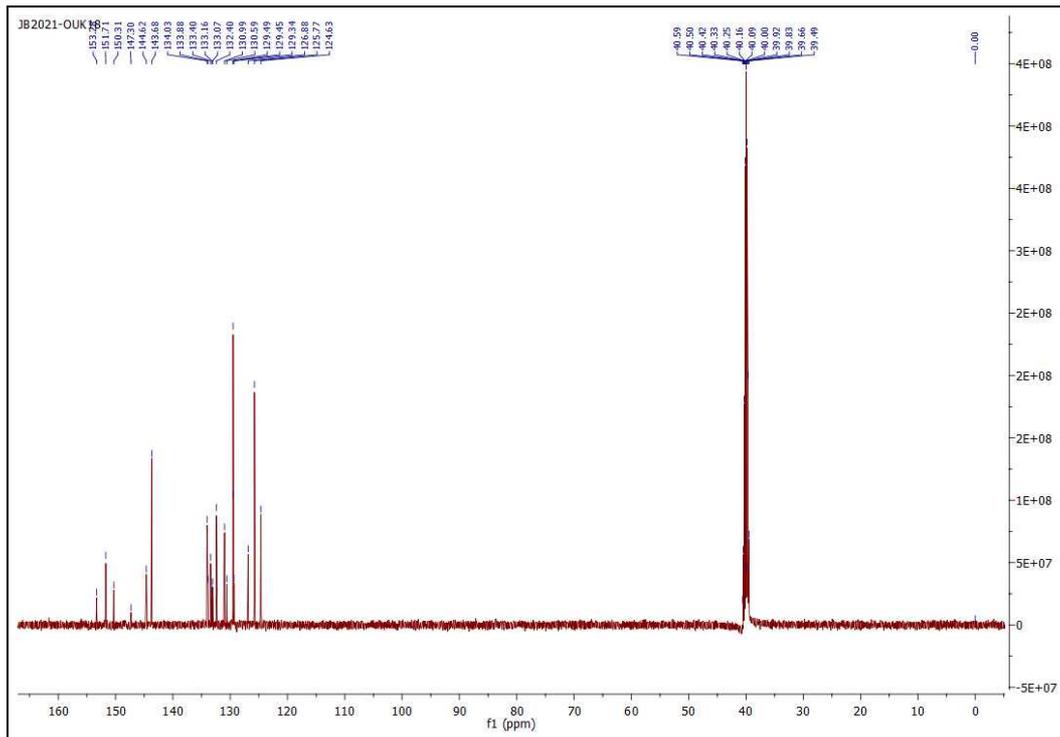
Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500.28 MHz) du composé 4h.

Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125.8 MHz) du composé 4h.Spectre de masse ES- $\text{MS}^+$  du composé 4i.

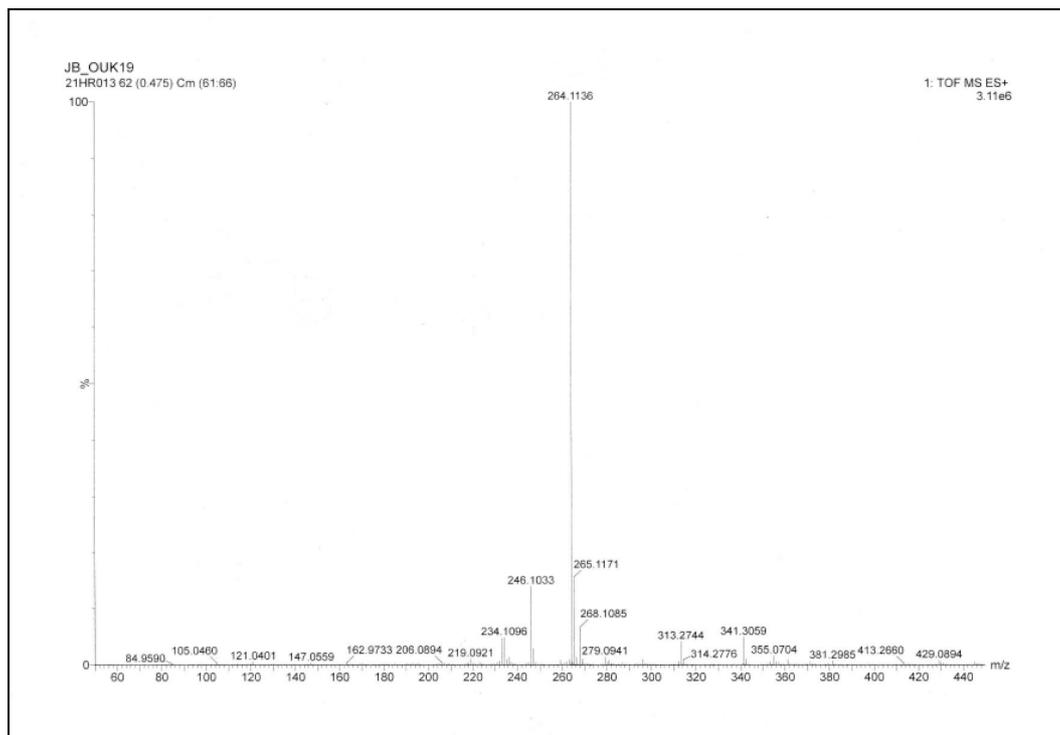


**Spectre de masse haute résolution du composé 4i.**

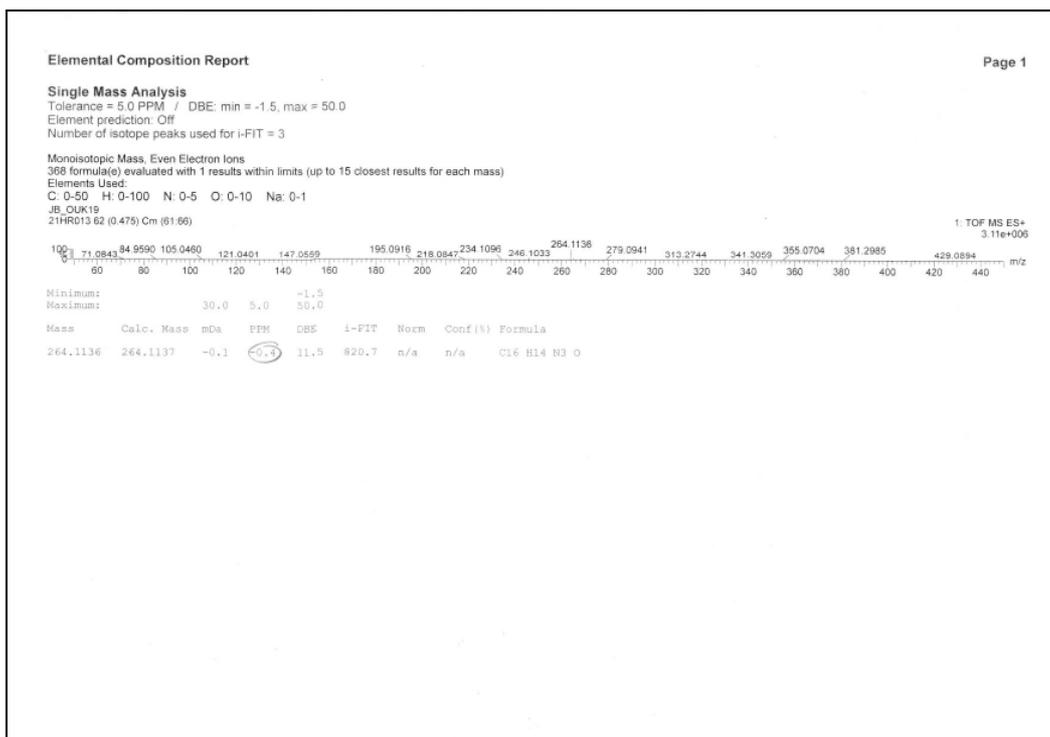




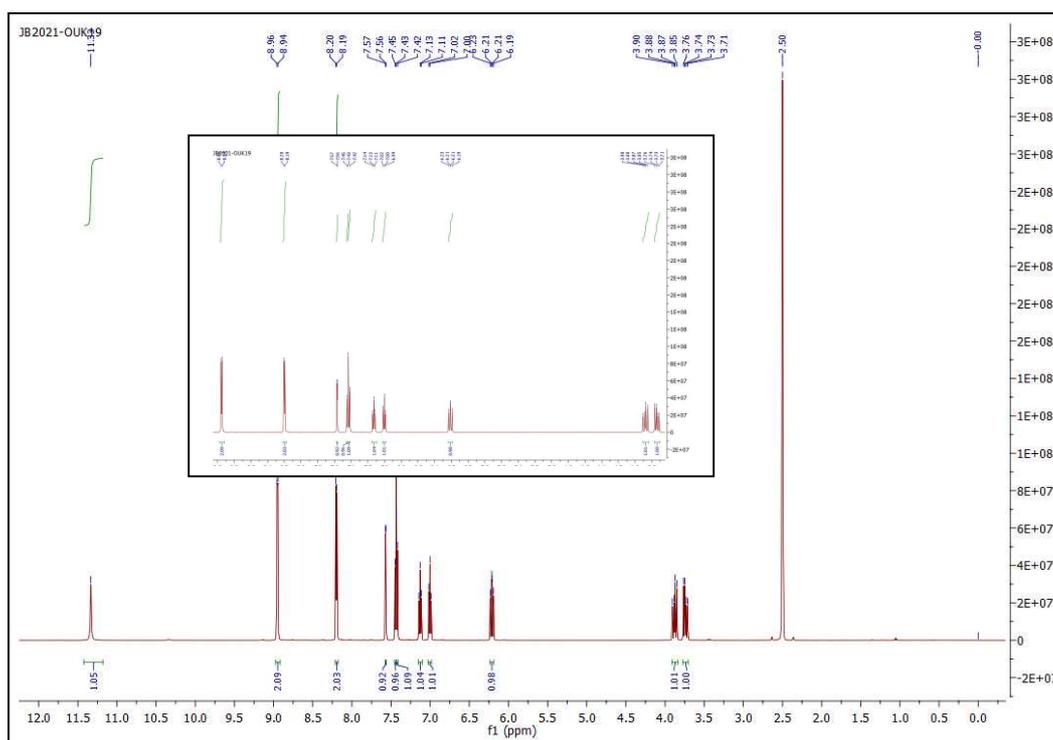
Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125.8 MHz) du composé 4i.



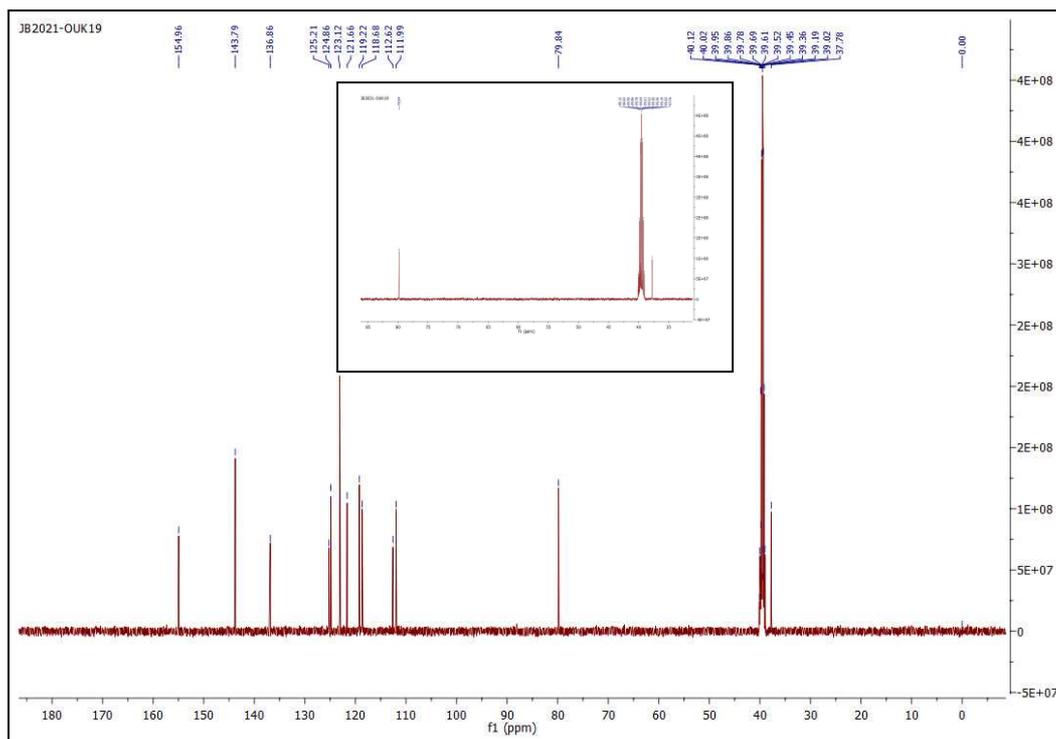
Spectre de masse ES- $\text{MS}^+$  du composé 5j.



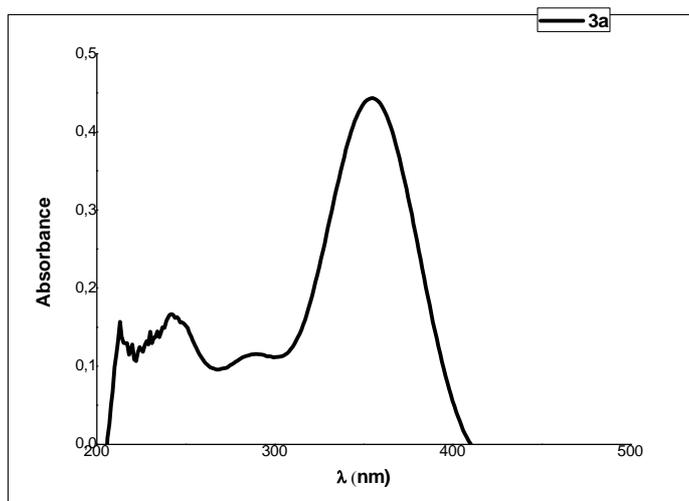
Spectre de masse haute résolution du composé 5j.



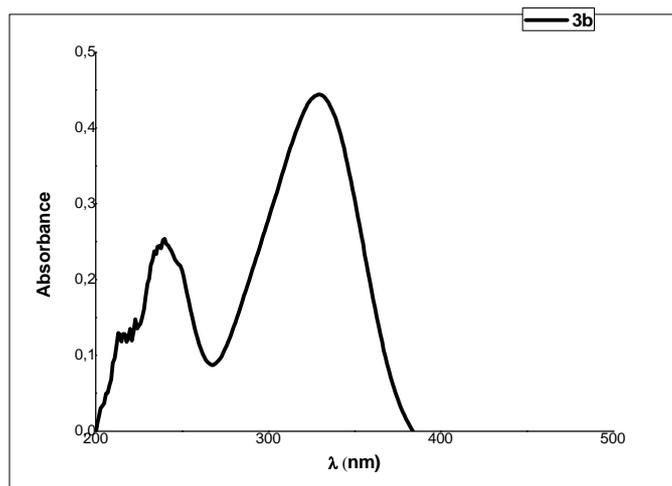
Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 500.28 MHz) du composé 5j.



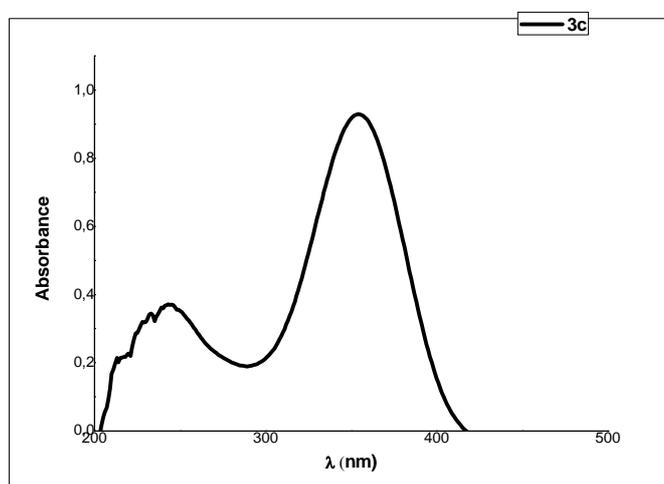
Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125.8 MHz) du composé 5j.



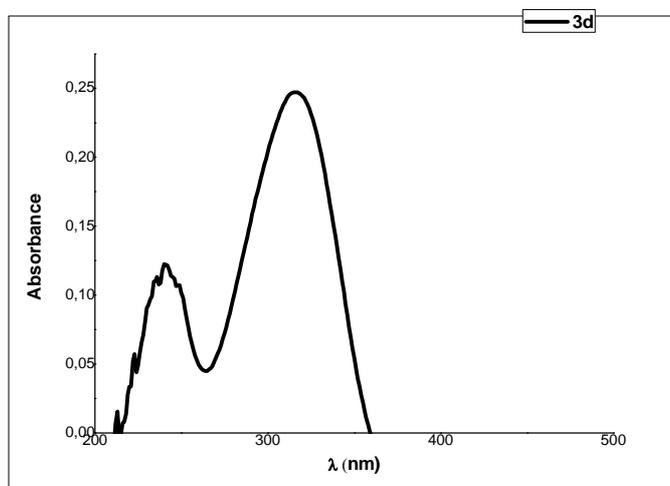
Spectre d'absorption UV-Vis de la chalcone 3a dans le chloroforme à  $3 \times 10^{-5}$  M.



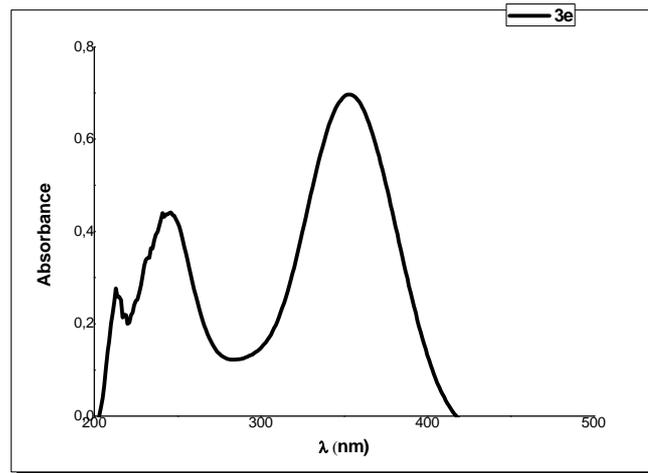
Spectre d'absorption UV-Vis de la chalcone 3b dans le chloroforme à  $3 \times 10^{-5}$  M.



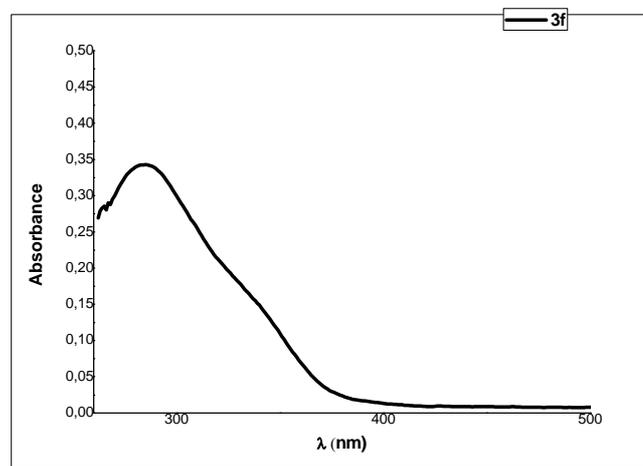
Spectre d'absorption UV-Vis de la chalcone 3c dans le chloroforme à  $3 \times 10^{-5}$  M.



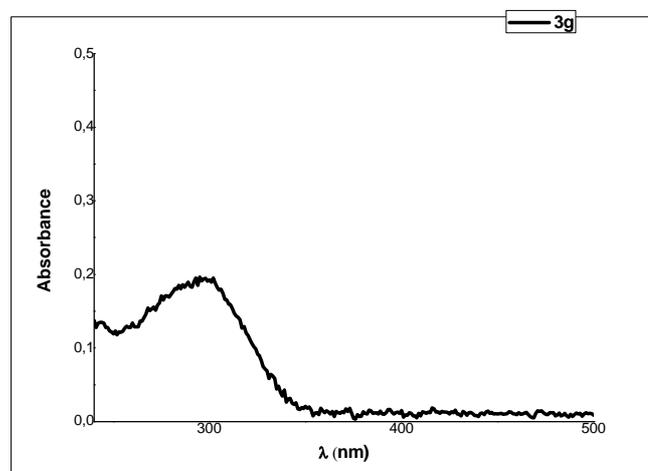
Spectre d'absorption UV-Vis de la chalcone 3d dans le chloroforme à  $3 \times 10^{-5}$  M.



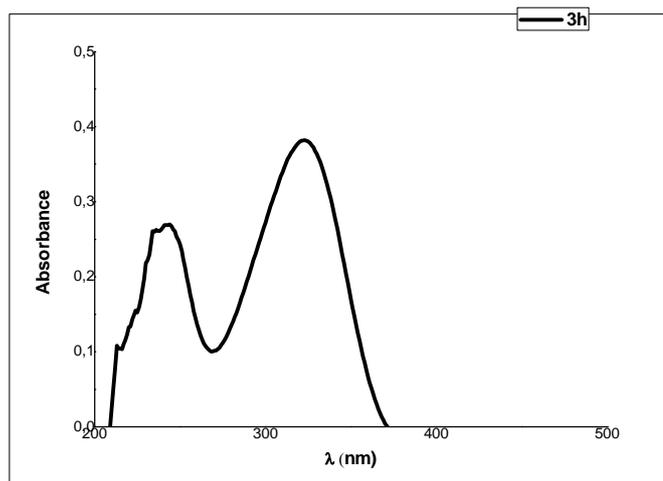
Spectre d'absorption UV-Vis de la chalcone 3e dans le chloroforme à  $3 \times 10^{-5}$  M.



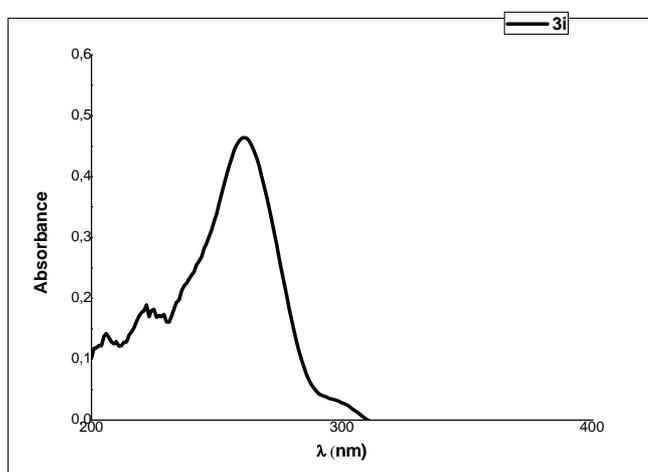
Spectre d'absorption UV-Vis de la chalcone 3f dans le chloroforme à  $3 \times 10^{-5}$  M.



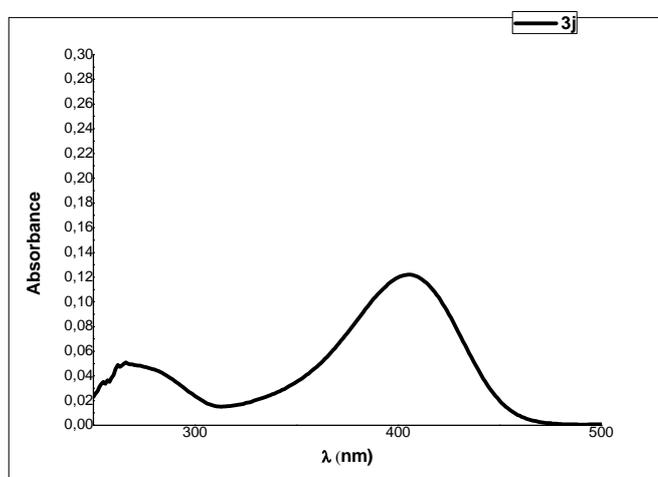
Spectre d'absorption UV-Vis de la chalcone 3g dans le chloroforme à  $3 \times 10^{-5}$  M.



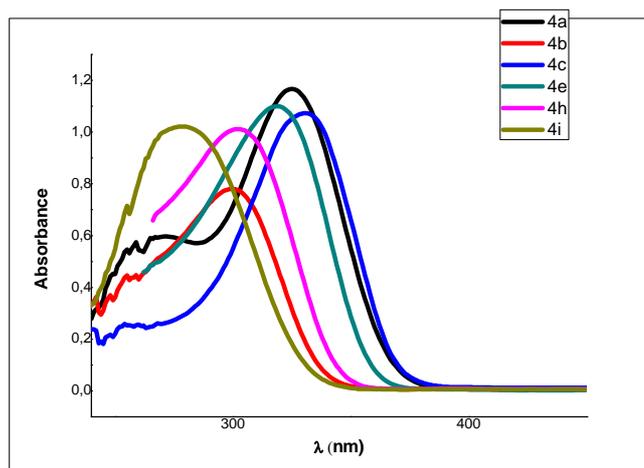
Spectre d'absorption UV-Vis de la chalcone 3h dans le chloroforme à  $3 \times 10^{-5}$  M.



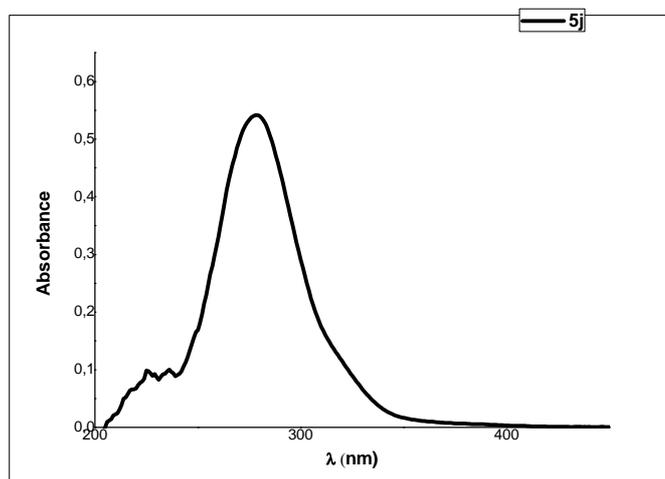
Spectre d'absorption UV-Vis de la chalcone 3i dans le chloroforme à  $3 \times 10^{-5}$  M.



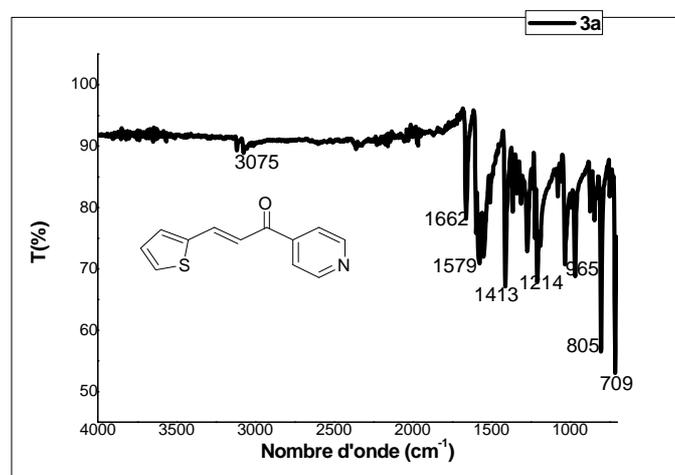
Spectre d'absorption UV-Vis de la chalcone 3j dans le DMSO à  $10^{-5}$  M.



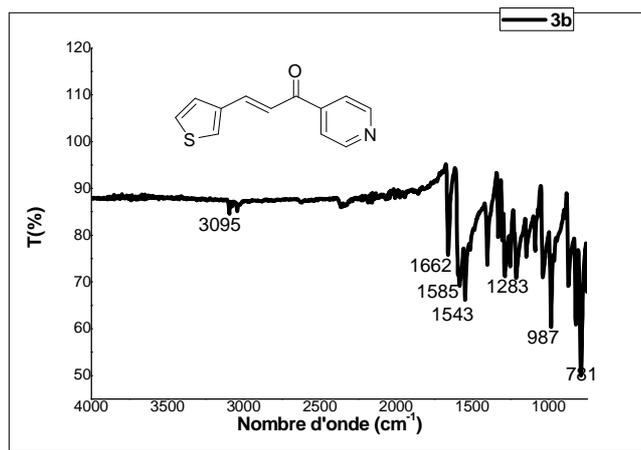
**Spectre UV-visible des nouvelles chalcones-oximes synthétisées préparées dans le DMSO.**



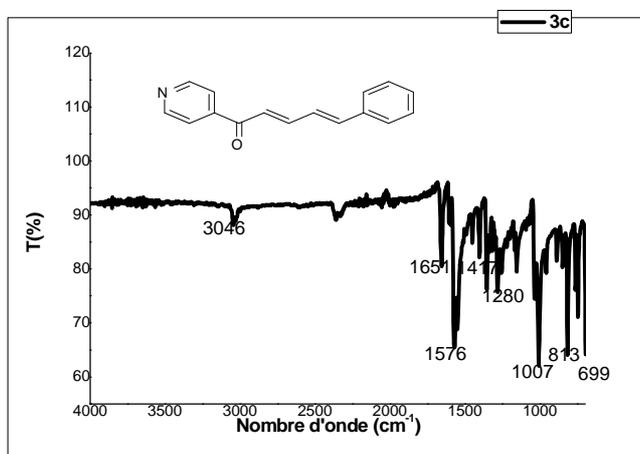
**Spectre UV-visible du composé 5j préparé dans le DMSO.**



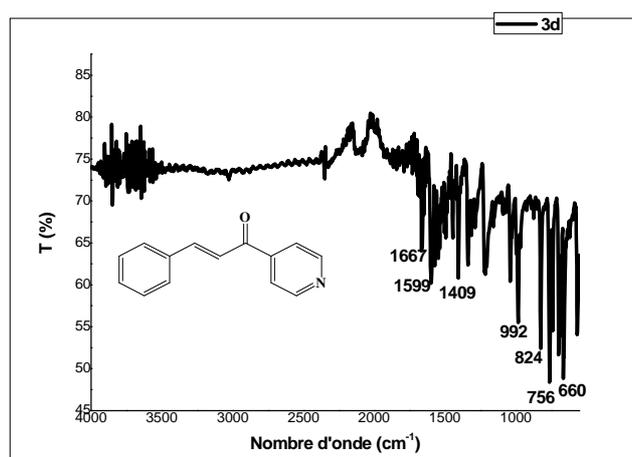
**Spectre IR de la chalcone 3a dans du KBr.**



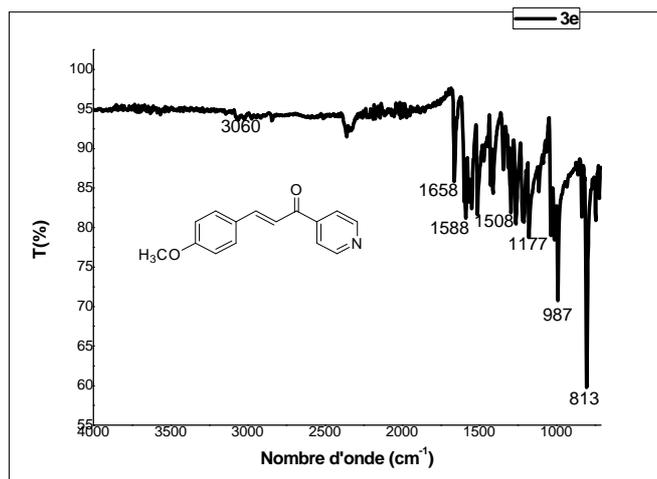
Spectre IR de la chalcone 3b dans du KBr.



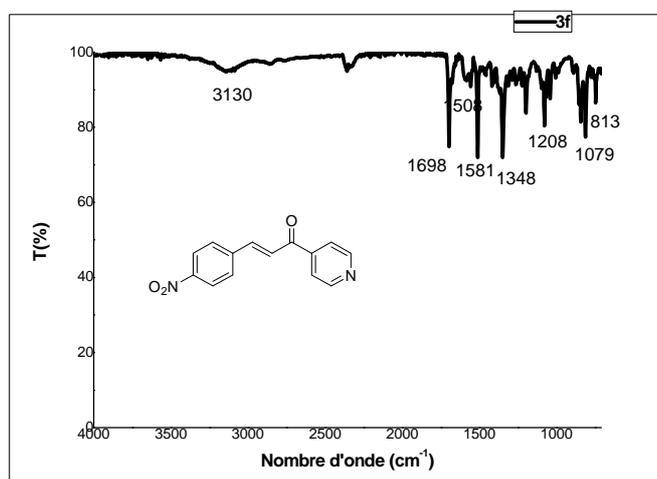
Spectre IR de la chalcone 3c dans du KBr.



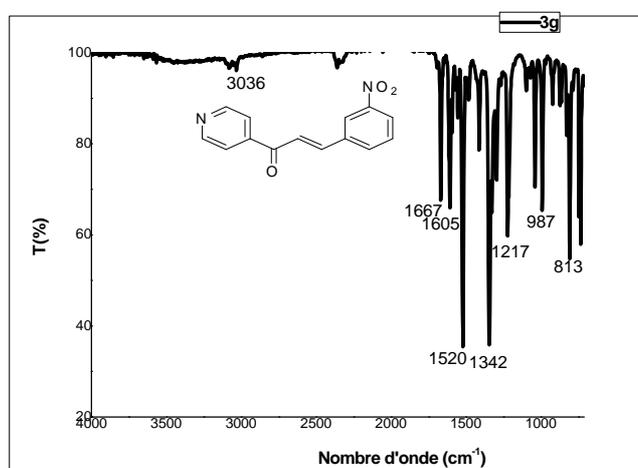
Spectre IR de la chalcone 3d dans du KBr.



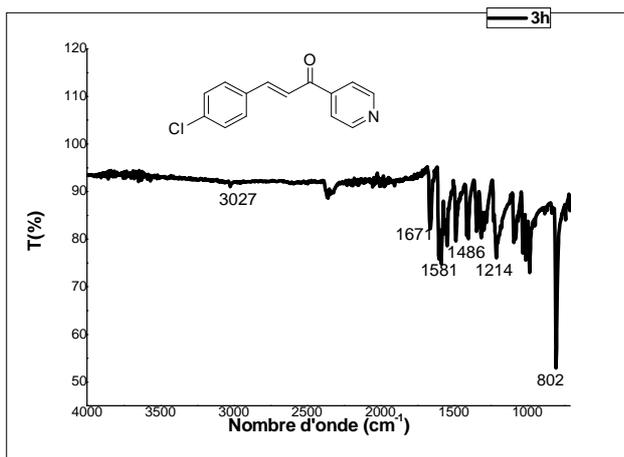
Spectre IR de la chalcone 3e dans du KBr.



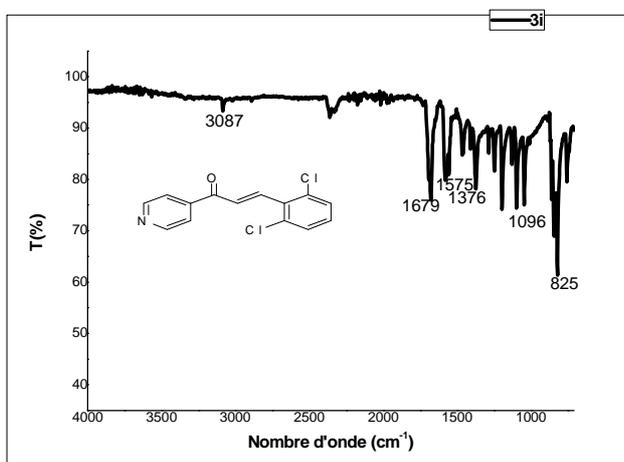
Spectre IR de la chalcone 3f dans du KBr.



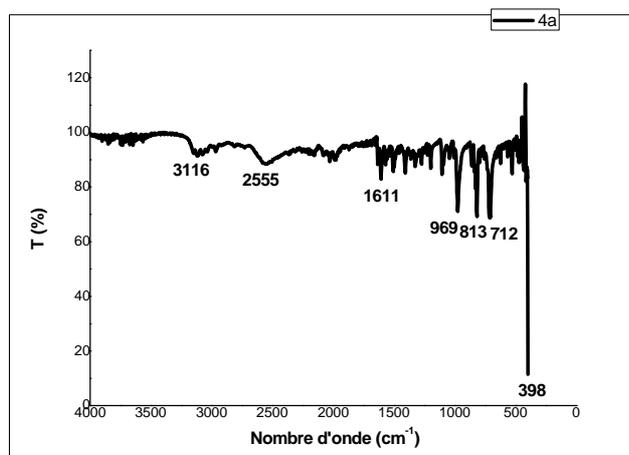
Spectre IR de la chalcone 3g dans du KBr.



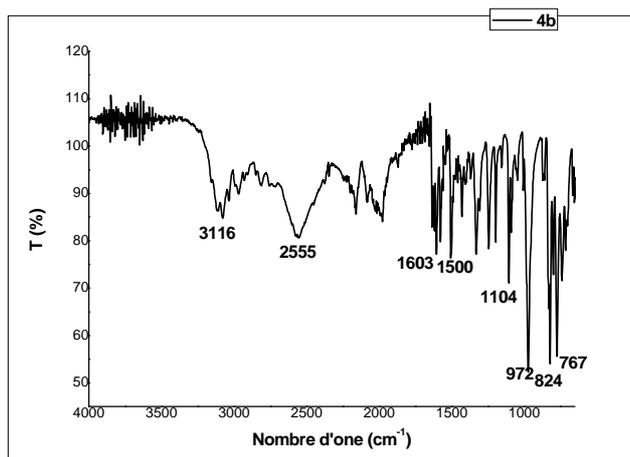
Spectre IR de la chalcone 3h dans du KBr.



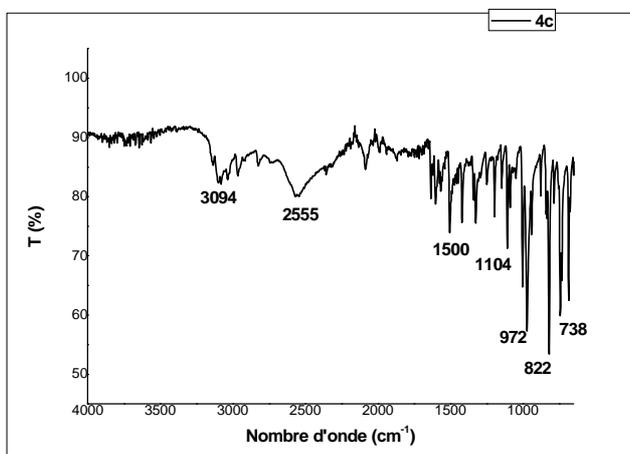
Spectre IR de la chalcone 3i dans du KBr.



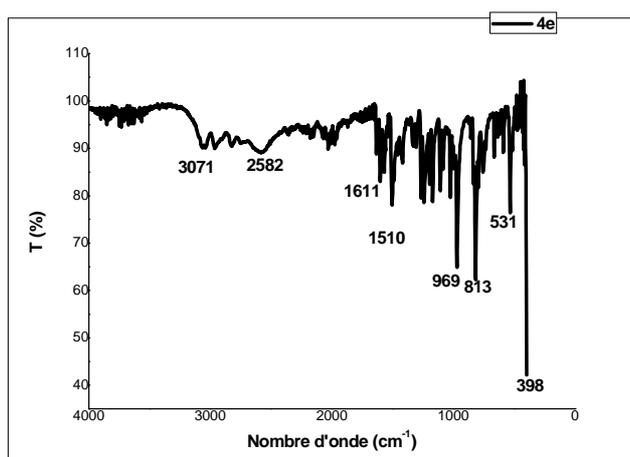
Spectre IR de la chalcone-oxime 4a dans du KBr.



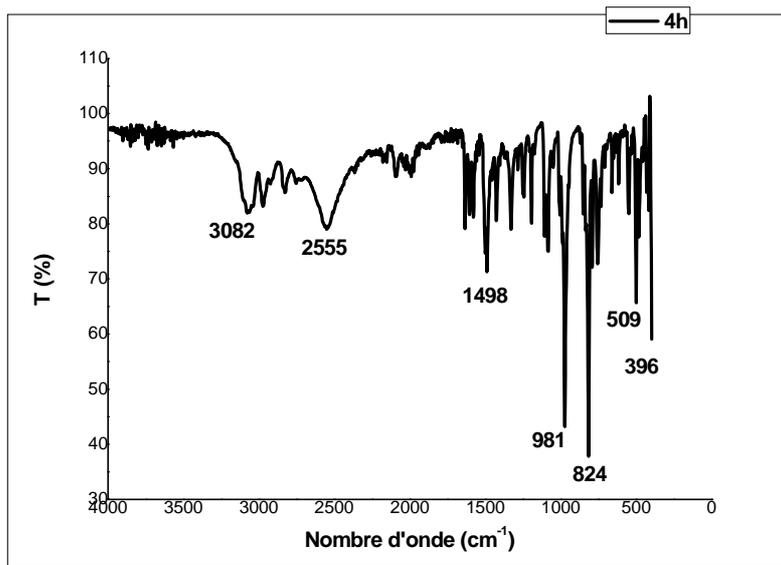
Spectre IR de la chalcone-oxime 4b dans du KBr.



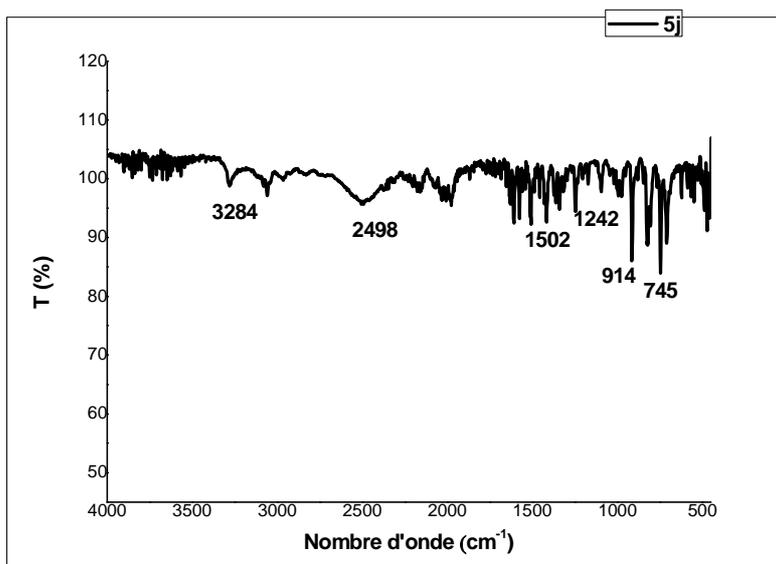
Spectre IR de la chalcone-oxime 4c dans du KBr.



Spectre IR de la chalcone-oxime 4e dans du KBr.



Spectre IR de la chalcone-oxime 4h dans du KBr.



Spectre IR de la chalcone 5j dans du KBr.

## Résumé

La synthèse de nouvelles molécules organiques hétérocycliques susceptibles de présenter une ou plusieurs activités biologiques, en ayant recours à des méthodes simples et efficaces est d'une importance capitale pour la compréhension de phénomènes biologiques de toutes sortes. Cette thèse est focalisée dans un premier temps sur l'étude de la sélectivité de la réaction des dérivés du salicylaldéhyde vis-à-vis la 4-hydroxycoumarine dans différentes conditions. Deux séries de composés hétérocycliques ont été isolées et un des produits obtenus montre une excellente activité antioxydante à de très faibles concentrations. Un composé de chaque série a été soumis au docking moléculaire et à une étude de la dynamique moléculaire dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules stables inhibitrices de la protéine Kinase activée par les mitogènes P38.

Dans un deuxième volet, la synthèse des cétones  $\alpha,\beta$ -insaturées associées à un noyau pyridinyle et à un aryle diversement substitué en utilisant la réaction classique de Claisen-Schmidt ou la condensation de Knoevenagel a été notre deuxième objectif. Ces cétones  $\alpha, \beta$ -insaturées présentant une très bonne activité antimicrobienne sont utilisées comme matières premières pour la synthèse de nouvelles chalcone-oximes. Les résultats de l'activité antioxydante *in-vitro* de ces dernières sont nettement meilleures que leurs précurseurs. Les résultats du docking moléculaire et de la dynamique moléculaire réalisés sur les chalcone-oximes obtenues montrent que ces composés peuvent agir de manière très intéressante comme inhibiteurs potentiels de l'acétylcholinestérase (fep-mAChE).

**Mots clés :** Hétérocycle, Coumarine, Chalcone, Oximes, Activité antioxydante, Activité antimicrobienne, Docking moléculaire, Dynamique moléculaire, Protéine MAPK P38, Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, Protéine fep-mAChE.

## Abstract

The synthesis of new heterocyclic organic molecules capable of exhibiting one or more biological activities, using simple and efficient methods, is of paramount importance for the understanding of biological phenomena of all kinds. This thesis is focused initially on the study of the selectivity of the reaction of salicylaldehyde derivatives vis-à-vis 4-hydroxycoumarin under different conditions. Two series of heterocyclic compounds were isolated and one of the products obtained shows excellent antioxidant activity at very low concentrations. A compound of each series was subjected to molecular docking and a study of molecular dynamics in the context of the search for new stable molecules inhibiting the protein Kinase activated by the P38 mitogens.

In a second part, the synthesis of  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated ketones associated with a pyridinyl ring and a variously substituted aryl using the classic Claisen-Schmidt reaction or the Knoevenagel condensation was our second objective. These  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated ketones exhibiting very good antimicrobial activity are used as raw materials for the synthesis of new chalcone-oximes. The results of the *in-vitro* antioxidant activity of the latter are significantly better than their precursors. The results of molecular docking and molecular dynamics carried out on the chalcone-oximes obtained show that these compounds can act in a very interesting way as potential inhibitors of acetylcholinesterase (fep-mAChE).

Keywords: Heterocycle, Coumarin, Chalcone, Oximes, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Molecular docking, Molecular dynamics, MAPK P38 protein, Acetylcholinesterase inhibitors, fep-mAChE protein.