الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDIA

FACULTE DES TECHNOLOGIE

Département du Génie des procédés de l'environnement

Mémoire de Fin d'études pour l'obtention du Diplômede Master en

Génie des procédés

Spécialité : Génie des Procédés de l'environnement

THEME

Etude de l'activité Biologique de nouveaux hétérocycles azotés synthétisés

Proposé et dirigé par :

M^r^: LETTREUCH Hichem

Préparé et présenté par :

M^elle^: BOUADJADJA Atika

M^elle^: HAMDI Hamida

Jury:

D^r^: TERKMANE Naila	Université D^r^ YAHIA FARES	Président
M^r^: BELAISSA Yahia	Université D^r^ YAHIA FARES	Examinateur

2017-2018

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce Niveau. Ses sacrifices et privations ne l'ont pas empêché d'accomplir son devoir de Mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.

A mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa Chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

A mon marie Ridha, Mon cher qui m'a accompagné durant mon cursus universitaire ainsi que sa famille.

A mes frères Faiçal, Mohamed, Amar.

Et mes chères sœurs Razika, Khira, Ghania, Saloua.

A toutes les familles Bouadjadja et Bourkiza

A mon camarade: Hamida.

A mes amies: Ahlem, Sara, Nor elhouda.

À tous mes amies et mes collègues, pour les sympathiques moments Qu'on a passé ensemble.

À tous ceux qui me connaissent, et surtout qui m'aiment.

Atika

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

L'esprit de mon cher père

A ma très chère mère

A mes frères

Mohamed, Abde Aziz, Yahia, Ayach

A toute la famille : Hamdi

A mon camarade Atika

A mes amis Sarah, Ahlam, Nor Elhouda

A tous mes amies qui étudier en spécialité

De génie du procédé de l'environnement

Promotion de **2018**

A tous les personnes qui m'ont aidé de proche

Ou de loin pour réaliser ce travail.

HAMDI HAMIDA

Remerciements

Tout d'abord nous tiendrons à remercier ***Dieu*** *le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce travail.*

La première personne que nous tenons à remercier est Mr. LETTREUCH Hichem. D'avoir accepté de nous encadrer, et qui nous a extrêmement aidé et encouragé tout au long de ce travail, nous lui adressons nos remerciements les plus sincères.

Nous remercions les membres de jury qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail.

Nous tenons à remercier tous les gens qui nous ont aider, surtout Kouidri, Chabba mouna, Djimakji, responsables de laboratoire du hall technologique de la faculté des technologie de l'université Dr. YAHIA fares à Médéa et M.fares.

Nous remercions les éléments de groupe SAIDAL de Médea et spécialement M^{elle} Sara de laboratoire microbiologie et Mr. BEN YAHIA le responsable laboratoire de toxicité

Nous remercions les éléments de l'université de Saad dahlab de Blida et spécialement le laboratoire 232 surtout M. DRIOUCHE.

Nous remercions tous les enseignants de l'université Yahia fares qui nous ont guidés tout au long de notre vie universitaire.

Nous remercions aussi tous nos collègues et amies qui nous ont soutenu et encouragé pour terminer ce travail.

Nous remercions enfin toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

الملخص

يمكن أن نجد ثنائي هيدروزونات لأستر الميثيليك والإيثيليك من حامض ثنائي أوكسوغلوتاريك على صيغتين (E / E) و (Z / Z).

كما يمكن لمشتقات ال 2-4-نترو فينيل هدرا زونو غليتارات الميثيل التواجد على صيغة متماكبين (E) و(Z).

إرجاع المماكب (E)/ (E) باستعمال ديتيونيت الصوديوم سمح بالحصول على مركب جديد، دراسة خصائصه الأولية تتم باستخدام الرنين المغناطيسي النووي والمطيافية تحت الأشعة الحمراء لتبين أنه المركب المطلوب.

في حين أن إرجاع المماكب(Z) ل 2-4-نترو فينيل هدرازونوغليترات المثيل لم يشكل أي مركب، لهذا اضفنا له هيدرازين منوهيدرات لنتحصل على مشتق البنزوديازبين.
المشتق بنزوديازبين هو ايضا تم استرجاعه بواسطة ديتيونيت الصوديوم.
تحديد هذه المركبات تم عن طريق المطيافية تحت الاشعة الحمراء وباستخدام الرنين المغناطيسي النووي C^{13} والكربون H^1 البروتون.
بعض من هذه المركبات المتحصل عليها خضعت لاختبارات بيولوجية(ضد البكتيريا، ضد الفطريات، ضد الالتهاب) أكدت نشاطها.

الكلمات المفتاحية: هيدرازون، المركبات الحلقية، الإرجاع الحلقي، النشاط البيولوجي.

Résumé

Le bis hydrazone des esters méthylique et éthylique de l'acide 2- oxoglutarique peuvent exister sous deux configurations (E/E) et (Z/Z).

De même, le (E)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyle peut exister sous deux configurations diastérioisoméres (E) et (Z).

La réduction de l'isomère (E)/(E) par le dithionite de sodium a donné un produit dont la caractérisation par RMN (résonance magnétique nucléaire) et IR (infrarouge) correspond à une cyclisation menant au composé escompté. Ce nouveau composé qui n'est pas encore décrit dans la littérature.

La réduction de l'isomére (Z)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyle n'à mener à aucune cyclisation ; donc on a opté à le condenser avec de l'hydrazine monohydrate pour avoir des dérivés benzodiazépines.

Les dérivés de benzodiazépines ont été aussi réduitent par le dithionite de sodium.

Les composé synthétisés ont été caractérisés par le spectre IR, et RMN du proton ^{1}H et du carbone C^{13}.

Quelques composés synthétisés ont été soumis à des tests biologiques (antibactérien, antifongique et anti-inflammatoire) qui ont montré une activité remarquables.

Mots clés : hydrazone, hétérocycle, cyclisation réductive, activité biologiques.

Abstract

The bis hydrazone of the 2-oxoglutaric acid methyl and ethyl esters can exist in (E / E) and (Z/Z) configurations.

Likewise, dimethyl (E)-2, 4-dinitrophenylhydrazonoglutarate may exist in two configurations (E) and (Z).

The reduction of the (E) /(E) isomer by sodium dithionite gave a product whose NMR(nuclear magnetic resonance) and IR(infrared) characterization correspond to a reductive cyclization leading to the expected compound.

The reduction of the isomer dimethyl (Z)-2, 4-dinitrophenylhydrazonoglutarate did not lead to any cyclisation, so we opted to condense the hydrazine monohydrate to get benzodiazepines derivatives.

The benzodiazepines derivatives were also been reduced by sodium dithionite.

IR spectroscopy, nuclear magnetic resonance of the proton ^{1}H and C^{13} carbons characterized the synthesized compounds.

Some synthesized compounds were been subjected to biological tests (anti-bacterial, antifungal, anti-inflammatory) to which they showed activity.

Key words: hydrazone, heterocyclic, reductive cyclization, biological activity.

Sommaire

Dédicace.

Remerciement.

Résumés

Sommaire.

Abréviations.

Liste des tableaux.

Liste des figures.

Liste des Schéma.

Introduction général ……1

Chapitre I : partie bibliographie.

I.1. Introduction….....3

I.2. Synthèse d'hétérocycle à 5 chainons ……...3

I.3. Synthèse d'hétérocycles à 6 chainons …….5

I.4. Synthèse d'hétérocycles à 7 chainons……..8

I.5. Activité antibactérienne et antifongique……...9

I.5.1. Les bactéries….....9

1.5.1.1. *Escherichia coli*……10

1.5.1.2. *Staphylococcus aureus*……10

1.5.2. Les antibactériens……11

1.5.3. Les champignons…….11

1.5.3.1. *Candidas Albicanes*……12

1.5.4. Les antifongiques……13

I.6. Définition……13

I.7. Les cause de l'inflammation……...…13

I.8. Les phases de l'inflammation……..…13

I.9. Les anti-inflammatoires……14

I. 9.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (A.I.N.S.)……...……14

I.9.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (A.I.S.)……...……14

Chapitre II : partie expérimentale.

II.1. Synthèse des composés de départ……..…..……17

II.1.1. Préparation de 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène……17

II.1.2. Préparation de (E) -2,4-dinitrophénylhydrazine……..…18

II.1.3. Préparation de 2-oxoglutarate de dialkyles……..…19

II.1.3.1.Préparation de 2-oxoglutarate de diméthyle……..19

II.1.3.2. Préparation de 2-oxoglutarate de d'éthyle……20

II.1.4. Préparation de (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle……..…21

II.1.5. Préparation de (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de d'éthyle……22

II.2. Réduction……23

II.2.1. Réduction de (E)/(E) 4,6-dinitrophényl -1,3-dihydrazono oxoglutarate de dialkyles par le dithionite de sodium……...…23

II.2.1.1. Réduction de (E)/(E) 4,6-dinitrophényl -1,3-dihydrazono oxoglutarate de diméthyle……23

II.2.1.2. Réduction de (E)/(E) 4,6-dinitrophényl -1,3-dihydrazono oxoglutarate de d'éthyle……...24

II.3. Préparation des dérivés de (E)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyle…...……25

II.4. Préparation de (Z)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyle……..……26

II.5. Préparation des dérivés 1,2-diazépines ……..……27

II.6. Réduction des dérivés 1,2-diazépines……..……28

II.7. Partie biologique ……29

II.7.1. Evaluation de l'activité biologique……..……29

II.7.1.1. Activité antimicrobienne des hétérocycles synthétisés……..……29

II. 7.1.2. Préparation des solutions……..…...……29

III.7.1.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des produits 2, 3, 4, 5 et 6……..……...31

II.8. Evaluation de l'activité antifongique des produits 2, 3, 4, 5 et 6……..…32

II.9. Etude de l'activité anti-inflammatoire……...….32

II.9.1. Mode opératoire……...…33

Chapitre III : Méthode et discussion.

III.1. Synthés des composés de départs……...……38

III.1.1. Synthèse du 1, 3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène……..……38

III.1.2. Synthèse du 2,4-dinitrophénylhydrazine……40

III.1.3. Synthèse du 2-oxoglutarate de dialkyles……..…41

III. 1.3.1. Synthèse du 2-oxoglutarate de diméthyle……...41

III.1.3.2. Synthèse du 2-oxoglutarate de diéthyle……..43

III.2. Synthèse des hydrazones……46

III.2.1. Synthèse de 4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate d'alkyles……...……46

III.2.1.1. Synthèse de 4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle……..……46

III.2.1.2. Synthèse de 4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle……48

III.3. Réductions……..…50

III.3.1. Réduction de (E)/(E) 4,6-dinitrophényl -1,3-dihydrazono oxoglutarate d'alkyle par le dithionite de sodium……...… 50

III.3.1.1. Réduction de (E)/(E) 4,6-dinitrophényl -1,3-dihydrazono oxoglutarate de diméthyle…...…50

III.3.1.2. Réduction de (E) /(E) -4,6-dinitrophénylen-1,3dihydrazono glutarate de diéthyle……56

III.4. Synthése de (E) - 2,4-nitrophénylehydrazono glutarate de diméthyle……...…61

III.5. Synthése de dérivé 1,2- diazépine……..…63

III.6. réduction des dérivés 1,2- diazépine…….…64

III.6.1. Réduction de 4-[(2,4-dinitrophényl)-hydrazono]-[1,2] diazépane-3,7-dione……64

III.7. L'activité biologique…….…66

III.7.1 Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque)……...…66

III.7.2 Technique en milieu liquide (méthode de dilution)……66

III.7. 3 Méthode utilisées……...……67

III.8. Etude de l'activité anti-inflammatoire……..……73

Conclusions générale…….……76

Références bibliographie.

Annexe.

Liste des abréviations

$CDCl_3$: Chloroforme deutérié.

HSQC-RMN : Corrélation quantique-unique hétéonucléaire.

IR : Infrarouge.

Pka : l'acidité.

P_f : Point de fusion.

n_d^{25} : Indice de réfraction**.**

DMSO : Diméthyl sulfoxyde.

Ph_3p : Triphénylphosphine.

pph_3 : Triphosphine.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

R : Radical.

DMF : Diméthyle formamide.

Pd (dpa) $_2$: Bis- (dibenzylidèneacétone) palladium**.**

m_f : Masse finale**.**

$Sncl_2.2H_2O$: chlorure d'étain dihydraté.

DME : dimethoxyethane.

NUH : N-hydroxyindole.

DIEA N, N : Diso propyl thylamine et deoxides.

TFA : Trifluoroacetic acid.

DCM : Dichloromethane.

CMI : concentration minimale inhibitrice.

SFM : Société Française Microbiologie.

D.O : densité optique.

DI : diamètre de diffusion sur disque (mm).

ATCC : Américain Type Culture Collectif.

CAB : A cetrimide agar.

N.M.R.I : Naval Médical Research Institute.

GP : Groupement protecteur.

THF : Tetrahydrofuran.

MEB : Microscopie électronique à balayage.

A.I.S : Anti – inflammatoire stéroïdiens.

A.I.N.S : Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Δ **:** Chauffage.

Liste des tableaux

Chapitre II : partie expérimentale.

Tableau. II. 1 : Structures et concentrations et désignation des produits testés……..**30**

Tableau. II. 11 : les matériel animal utilise et ses condition opératoires……**33**

Chapitre III : Méthode et discussion.

Tableau. III. 1 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre souche bactériennes testées pour le produit (2)…….……**71**

Tableau. III. 2 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre souche bactériennes testées pour le produit (3)…….…….**71**

Tableau. III. 3 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre souche bactériennes testées pour le produit (4)…….….**71**

Tableau. III. 4 :L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre souche bactériennes testées pour le produit (5)……..**72**

Tableau. III. 5 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre souche bactériennes testées pour le produit (6)……..……**72**

Tableau. III. 6 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre les levures et les Fongique pour le produit (2)…….**73**

Tableau. III. 7 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre les levures et les Fongique pour le produit (3)…….……**73**

Tableau. III. 8 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre les levures et les Fongique pour le produit (4)…….**73**

Tableau. III. 9 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre les levures et les Fongique pour le produit (5)…….……**74**

Tableau. III. 10 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre les levures et les Fongique pour le produit (6)…….……**74**

Tableau. III. 11 : Récapitulation des résultats de l'administration des hétérocycles sur les souris……**76**

Liste de figure

Chapitre I : partie bibliographie.

Figure. I. 1 : Image MEB *d'Escherichia coli* [38]……..10

Figure. I. 2 : Image MEB *d'staphylococcus aureus* [38]……11

Figure. I. 3 : Image MEB de *Candidas albican* [45]……...12

Chapitre II : partie Expérimentale.

Figure. II. 1 : les quatre lots de souris…….34

Figure. II. 2 : photo d'injection des doses (gavage)……...…….35

Figure. II.3 : Injection de la carragénine…….36

Figure. II.4 : Gonflement après injection……36

Figure. II.5 : souris tuées par l'éther d'éthyle…….37

Figure. II.6 : Découpage des pattes postérie Droites et gauches…….37

Chapitre III : Méthode et discussion.

Figure. III. 1 : Spectre IR de 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzéne…….….39

Figure. III. 2 : Spectre IR de 2,4-dinitrophéylhydrazine……41

Figure. III.3 : Spectre IR du 2-oxoglutarate de diméthyle……..……42

Figure. III.4 : Spectre IR du 2-oxoglutarate de diéthyle…….434

Figure. III. 5 : Spectre IR du (E) / (E) 4,6-dinitrophénylen-1,3dihydrazono glutarate de diméthyle……...47

Figure. III. 6 : Spectre IR du (E)/(E) 4,6-dinitrophénylen-1,3dihydrazono glutarate de diéthyle……..49

Figure. III. 7 : Spectre IR de du composé de réduction de (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate diméthyle avec le dithionite de sodium…….53

Figure. III. 8 : Spectre ^{1}H-RMN du composé de réduction de (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate diméthyle avec le dithionite de sodium……..54

Figure. III. 9 : Spectre ^{13}C-RMN du composé de réduction de(E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diméthyle avec le dithionite de sodium……..55

Figure. III. 10 : Spectre HMBC-RMN du composé de réduction de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diméthyle avec le dithionite de sodium……...55

Figure. III. 11 : Spectre HSQC-RMN du composé de réduction de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diméthyle avec le dithionite de sodium……...56

Figure. III. 12 : Spectre IR de du composé de réduction E/E-4,6 dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle……60

Figure.III.13 : Spectre ^{1}H-RMN de (E)-2,4- dinitrophénylehydrazono glutarate de diméthyle……...62

Figure. III.14 : Spectre ^{1}H-RMN de (Z)-2,4- dinitrophénylehdrazonoglutarate de diméthyle……...63

Figure III.15 : Spectre IR de (Z)-2,4- dinitrophénylehdrazonoglutarate de diméthyle……...64

Figure III.16 : Spectre IR de dérivé 1,2- diazépine……65

Figure III.17 : Spectre IR de réduction dérivé 1,2- diazépine……68

Figure. III.18 : Comparaison des zones d'inhibition des cinq produits d'activité anti bactérien……72

Figure. III.19 : Comparaison des zones d'inhibition des cinq produits d'activité anti fongique……74

Figure. III.20 : Evolution de poids moyenne des pattes droites et pattes gauches des souris des quatre lots……..76

Figure. III.21 : Le pourcentage d'augmentation de l'œdème des pattes gauche par rapport aux pattes droites des quatre lots…….……77

Figure. III.22 : Le pourcentage de réduction de l'œdème de lot de référence et les deux lots d'essai par rapporte ou témoin……..77

Liste de Schéma

Chapitre II : Partie expérimentale.

Schéma. II.1 : Structure de 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène……**17**

Schéma. II.2 : Structure de (E)-2,4- dinitrophénylhydrazine……..**18**

Schéma. II.3 : Structure de 2-oxoglutarate de diméthyle……**19**

Schéma. II.4 : Structure de 2-oxoglutarate de diéthyle ……..……**20**

Schéma. II.5 : Structure de (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle……...…**21**

Schéma. II.6 : Structure de (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diéthyle……..……**22**

Schéma. II.7 : Structure de réduction (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle……..**23**

Schéma. II.8 : Structure de réduction (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diéthyle……..……**24**

Schéma.II.9 : Structure des dérivés de (E)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyle……...…**25**

Schéma.II.10 : Structure de (Z)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyle……...…**26**

Schéma.II.11 : Structure des dérivés 1,2-diazépines……...……**27**

Chapitre : III. Partie méthode et discussion.

Schéma. III. 1 : mécanisme réactionnel de la synthèse du 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène……...…38

Schéma. III. 2 : Mécanisme réactionnel de la synthèse du 2,4-dinitrophénylhydrazine……...…..40

Schéma. III. 3 : Mécanisme réactionnel de la synthèse du 2-oxoglutaratede diméthyle..……..42

Schéma. III. 4 : Mécanisme réactionnel de la synthèse du 2-oxoglutarate de diéthyle…...…43

Schéma. III. 5 : Mécanisme réactionnel suivie lors de la synthèse du 2-oxoglutarate de diméthyle……...……45

Schéma. III. 6 : Mécanisme réactionnel de synthèse des isomères (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle…….……46

Schéma. III. 7 : Mécanisme réactionnel de synthèse des isomères (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle……48

Schéma. III. 8 : 1^{ér} Mécanisme réactionnel de la cyclisation réductive éventuelle de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diméthyle……..……51

Schéma. III. 9 : 2^{éme} Mécanisme réactionnel de la cyclisation réductive éventuelle de(E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate diméthyle……52

Schéma. III. 10 1^{ér} Mécanisme réactionnel de la cyclisation réductive éventuelle de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle……..57

Schéma. III. 11 : 1^{ér} Mécanisme réactionnel de la cyclisation réductive éventuelle de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle……59

Schéma. III. 12 : 1^{ér} Mécanisme réactionnel de la cyclisation réductive éventuelle de (E) -2,4-nitrophénylehydrazono glutarate de diméthyle…….……..61

Schéma. III. 13 : Mécanisme réactionnel de de dérivé 1,2- diazépine……64

Schéma. III. 14 : possibilité de cyclisation réductive……..66

Schéma. III. 15 : Première possibilité de cyclisation……..67

Schéma. III. 16 : deuxième possibilité de cyclisation…….67

Introduction Générale

Un très grand nombre de substances naturelles et des médicaments sont des composés Hétérocycliques.

Les hétérocycles sont des composés chimiques très intéressants dans les recherches Scientifiques en raison de leurs potentialités d'application dans différents domaines, pour cela Leur synthèse est devenue un sujet très important.

Ce sont une classe de composés chimiques dans lesquels un atome ou plus D'un carbocycle est remplacé par un hétéroatome comme l'oxygène, l'azote, le phosphore, le Soufre, etc. Les hétérocycles les plus courants contiennent de l'azote et de l'oxygène.

D'un point de vue chimique, la plupart des composés hétérocycliques ont comportés Un système conjugué ou aromatique, qui a été l'origine de leurs stabilités [1].

Les nitro-aromatiques ont une importance remarquable dans la synthèse et leur utilisation en comme matières premières pour la préparation de divers hétérocycles azotés ont été intensivement étudiés par les chimistes. Historiquement, ils sont connus comme des explosifs, des propulseurs et des précurseurs de colorant azoiques.en même temps, ils sont des réactifs très importants pour la synthèse de molécules cibles complexes.

Plusieurs réactions organiques sont réalisées en exploitant l'effet attracteur du groupe nitro .En raison de sa transformation facile en divers groupements fonctionnels, l'importance des composés nitrés dans la synthèse de molécules complexes a été largement étendue .Les Composés aromatiques nitrés sont des bons précurseurs pour introduire des substituant de l'azote tels que NH_2, CN ou pour la génération d'intermédiaires très actifs comme les nitrées.

Jusqu'à présent, les cyclisations réductives de composés intro aromatique ont été

Utilisées pour synthétiser des différentes types et classes d'hétérocycles ainsi que les indoles, les carbazoles et leurs dérivés.

A cet effet les objectifs de ce travail sont les suivants :

- Synthèse et caractérisation de 1,3-dihydrazono-4,6-dinitrobenzéne et de 2,4-dinitrophénylhydrazine.
- Synthèse et caractérisation de 2-oxoglutarate de dialkyles.
- Synthèse et caractérisation des diastéréoisoméres des bis hydrazones d'esters méthyliques et éthyliques de l'acide 2-oxoglutarique.

- Synthèse et caractérisation des diastéréoisoméres de 2,4- dinitrophényl hydrazono glutarate de diméthyle.
- Synthèse des benzodiazépines par condensation de l'isomère (Z) avec l'hydrazine monohydrate.
- Etude de la réduction des hydrazones et benzodiazépines obtenues par le dithionite de sodium.
- Etude de l'activité biologique des composés obtenus.

Notre travail est subdivisé en trois parties :

- ✓ Une partie bibliographique qui comporte quelques exemples de travaux réalisé dans le domaine de la synthèse d'hétérocycles par cyclisation réductive et la présentation de leurs activités biologiques.
- ✓ Une deuxième partie qui a été consacré aux modes opératoires détaillé, caractéristiques et de l'activité biologique.
- ✓ Une troisième partie, contient la discussion du résultat par le détail, des mécanismes réactionnels, spectres ainsi que l'activité biologique.

Chapitre I :
Partie bibliographique

I.1. Introduction :

Cette méthodologie, connue depuis les années 1950, s'avère être efficace afin dégénérer des structures polycycliques comportant le motif dihydroquinoléine ou quinoléine.

Ainsi, en fonction des différentes structures moléculaires mises en jeu, un certain nombre de méthodes ont été décrites pour réaliser ces réactions de réduction-cyclisation avec des rendements plus ou moins bons.

En parcourant la littérature, nous pouvons constater que l'une des meilleures façons d'obtenir les motifs attendus est d'employer un métal associé à un solvant portique. Certaines Méthodes montrent l'usage d'un acide et d'un bullage de dihydrogène en plus de l'utilisation du métal comme catalyseur [2].

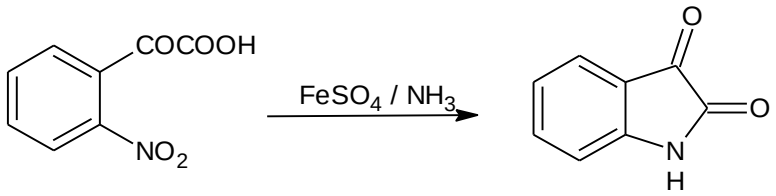
Parmi les exemples les plus récents, nous pouvons évoquer les travaux qui utilise du palladium sur charbon en présence de dihydrogène ou du $Na_2S_2O_4$, et même des réductions en utilisant différentes métaux (Fe ; Zn…)

Il faut toutefois noter que l'obtention d'hétérocycles à 5 et 6 chainons est facile vu leurs situation stérique favorable contrairement aux hétérocycles à 7 chainons ou leurs formation est plus exigeante et se déroule en règle générale dans des étapes séparées de la réduction.

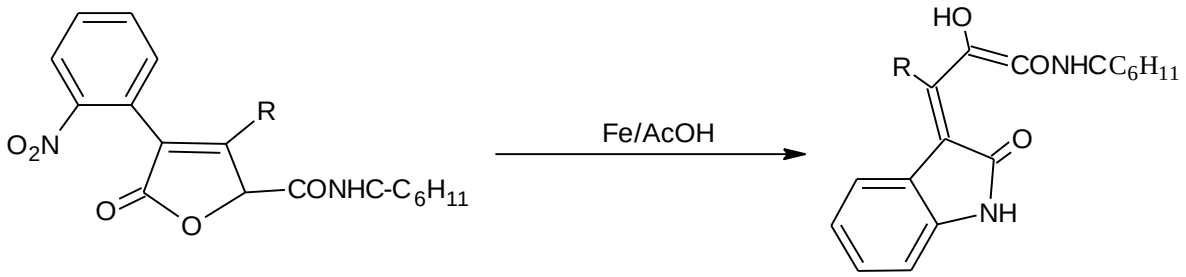
Nous rapportons dans ce qui suit des exemples choisis de l'utilisation large de cette méthode de synthèse d'hétérocycles azotés.

I.2.Synthèse d'hétérocycle à 5 chainons :

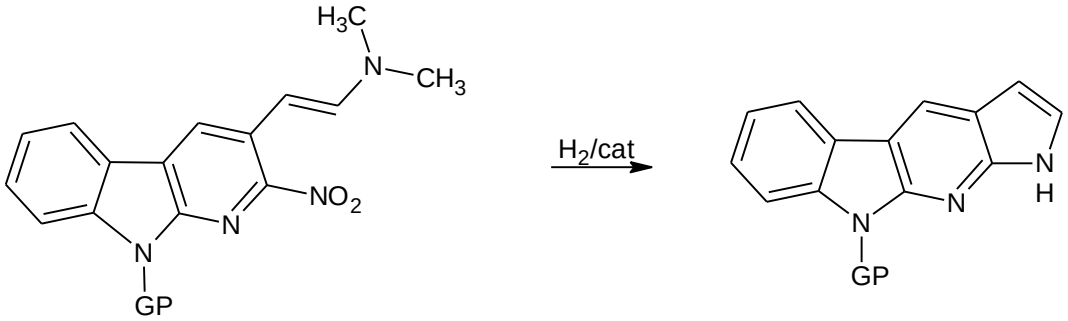
Le 1H-indole-2,3-dione à était préparé à partir de l'acide o-nitro benzoïque, le groupe nitro est réduit en amino suivie d'une cyclisation réductive ; par le sulfate ferreux ($FeSO_4$) en présence d'ammoniaque [3].



Les dérivés de buténolides ont été préparés avec des bons rendements (80-91%) par réduction avec le fer dans l'acide Acétique pour former des dérivés indoliques [4].

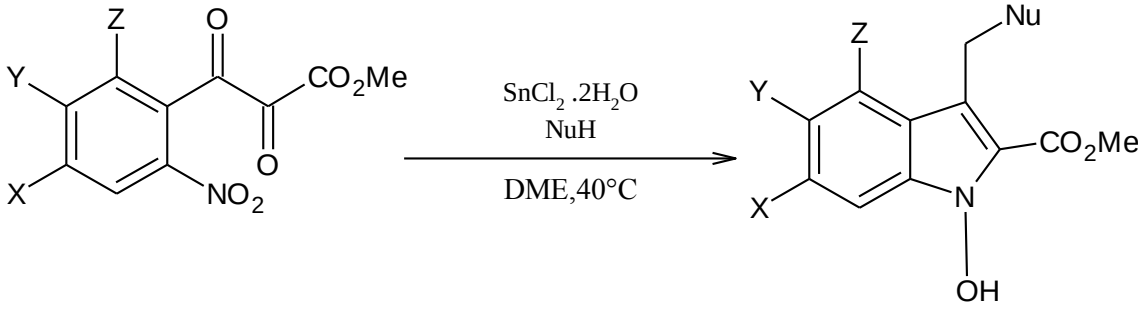


La réduction de(E)-N, N-dimethyl-2-(2-nitro-9H-pyrido [2,3-b] indol-3-yl) et henamine par hydrogénation catalytique à mener aux pyrazolobenzopyridine [5].



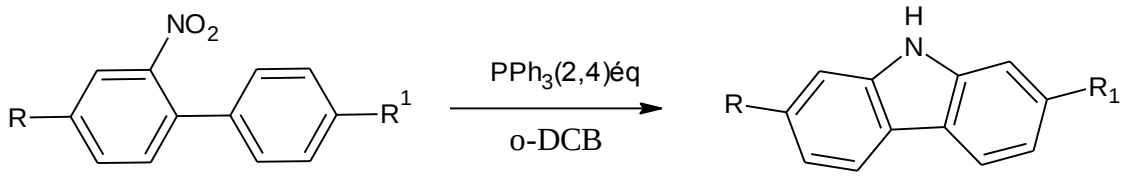
GP = Groupement protecteur

Des nouveaux dérivés des benzazépines ont été synthétisés à partir des dérivés de 2-nitrophényl-2,3-dioxobutanoate par cyclisation réductive en utilisant le chlorure d'étain [6].



X=H, F, CN Y=F, H Z=Br, H, F

A.W. Freeman et ses collaborateurs ont synthétisé des dérivés de carbazoles par cyclisation réductive des dérivés des 2-nitrophényles en utilisant le triphénylphosphine comme agent réducteur dans différentes solvants [7].

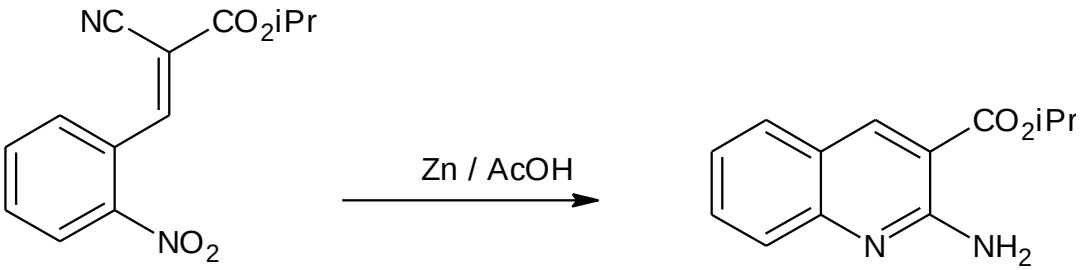


Intérêt biologique :

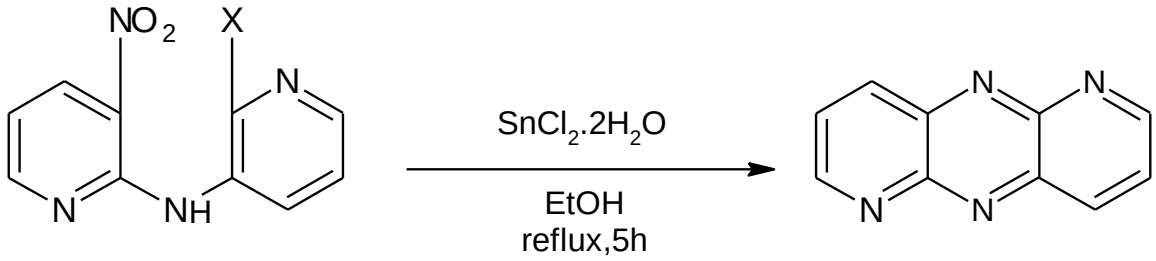
Ces vingt dernières années, la littérature a rapporté un grand nombre de travaux concernant l'activité biologique des dérivés imidazopyridine et imidazopyridazine. Il s'est avéré que ces dérivés possédaient des activités dans des domaines variés : anti-inflammatoires [8], agents utilisés dans le traitement de certaines pathologies du système nerveux central [9], antibactériens [10], et antiviraux [11], antagonistes des récepteurs CRF1 (facteur de libération du corticotropine actif dans le traitement des troubles psychiques, des maladies neurologiques [12], cardio-pulmonaires et certaines douleurs somatiques [13].

I.3.Synthèse d'hétérocycles à 6 chainons :

Le isopropyle 2-aminoquinoline-3-carboxylate est obtenue à partir de isopropyle -2-cyano-3-(2-nitrophenyle) acrylate par cyclisation réductive avec la poudre de zinc dans l'acide acétique comme solvant [14].

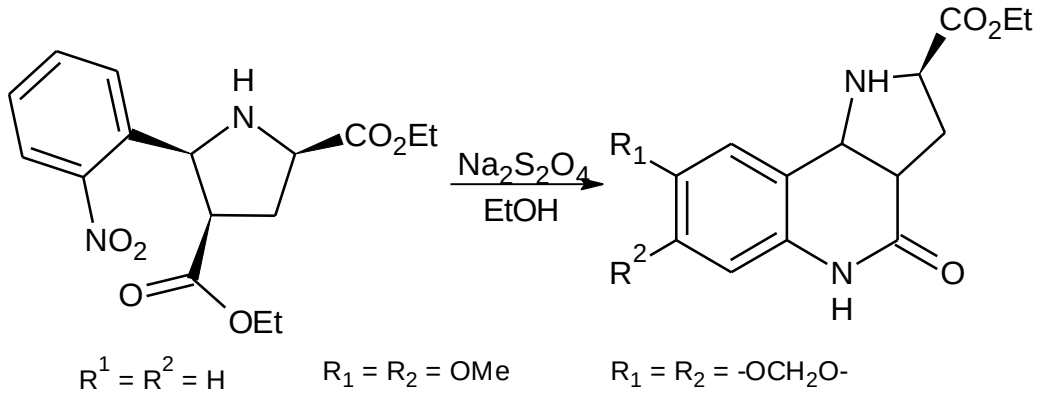


Le traitement avec du $Sncl_2 .2H_{2O}$ dans l'éthanol à température ambiante du composé illustré sur le schéma a conduit directement au dyhydrodipyridopyrazine avec des rendements acceptables [15].



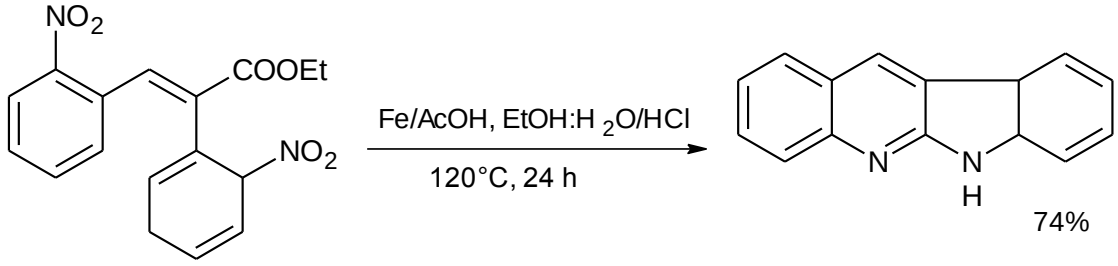
X= Cl Rd= 43% ; X= F R= 30%

Les dérivés de (2R)-4-oxo-2,3,3a,4,5,9b-hexahydro-1H-pyrrolo[3,2-c]quinoline-2-carboxylate ont été synthétisé à partir des dérivés de d'éthyle (2R,4R,5S)-5-(2-nitrophenyl)pyrrolidine-2,4-dicarboxylate en utilisant le dithionite de sodium ($Na_2S_2O_4$) ou l'hydrogène moléculaire comme agent de réduction [16].

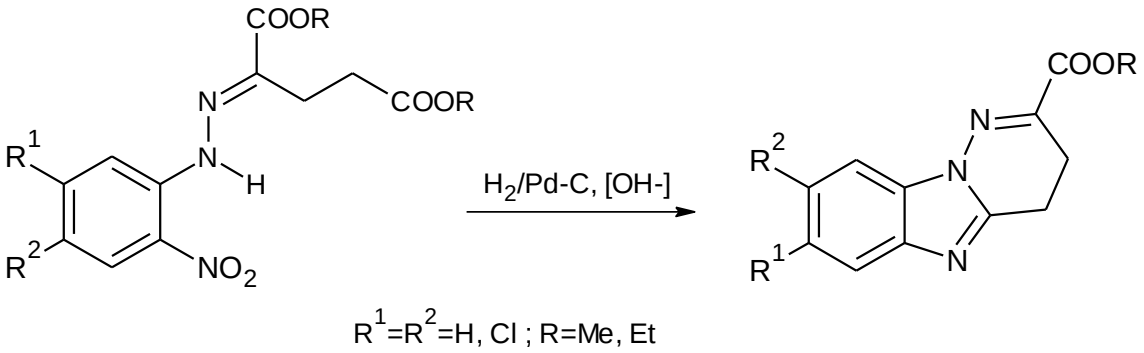


$R^1 = R^2 = H$ $R_1 = R_2 = OMe$ $R_1 = R_2 = -OCH_2O-$

L'alcaloïde cryptotackieine : 6*H*-indolo[2,3-b]quinoline doué d'activité pharmacologique isolé à partir de la plante tropicale *Criptoleipis Sanguinolenta* est synthétisé à partir de (2E)-2,3-bis(2-nitrophényl)prop-2-ènoate d'éthyle par une double cyclisation réductive avec la poudre de fer dans l'acide acétique en présence d'acide chlorhydrique [17].

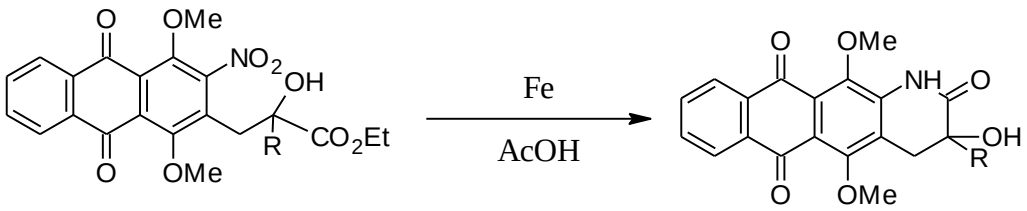


Le dérivé pyridazino [1,6-a]Benz imidazole est obtenu à partir de (E)-2-nitrophényl-hydrazono glutarate de dialkyle par cyclisation réductive par hydrogénation catalytique avec traitement ultérieur du mélange réactionnel avec NaOH [18].



$R^1=R^2$=H, Cl ; R=Me, Et

L'obtention de 2, 6,11-trioxonaphto [2,3 -g] quinoléines a été effectuée à Partir D'anthraquinones en présence de fer et d'acide acétique. Les rendements de la réduction ont était acceptables [19].

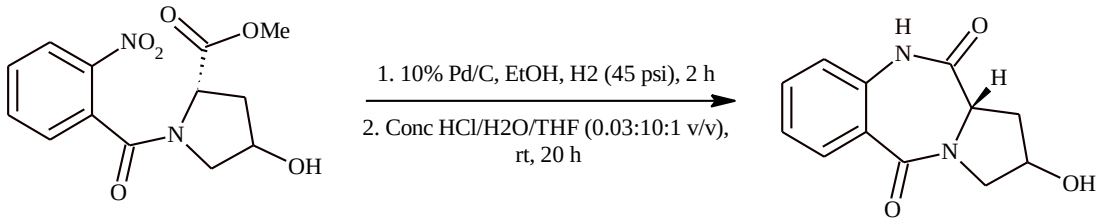


Intérêt biologique :

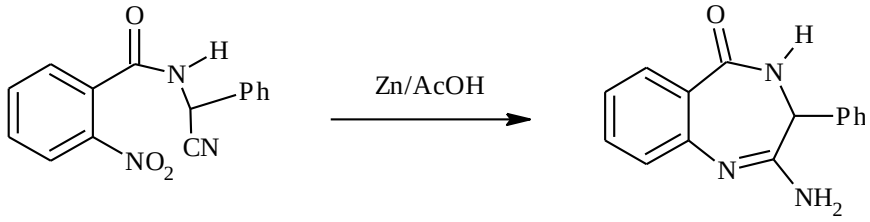
Les quinoléines sont de plus en plus fréquemment rencontrées dans les structures de composés d'intérêt pharmaceutique ayant une activité biologique. Parmi les applications les plus récentes, les dérivés quinoléines sont utilisés comme anticancéreux [20], antibactériens, antifongiques [21,22], anti malariques [23], anti hypertensives [24], anti-inflammatoires [25], antivirales [26].Les quinoxalines ont des activités biologiques telles que l'activité antivirale [27] et antibactérienne et antifongique [28].

I.4. Synthèse d'hétérocycles à 7 chainons :

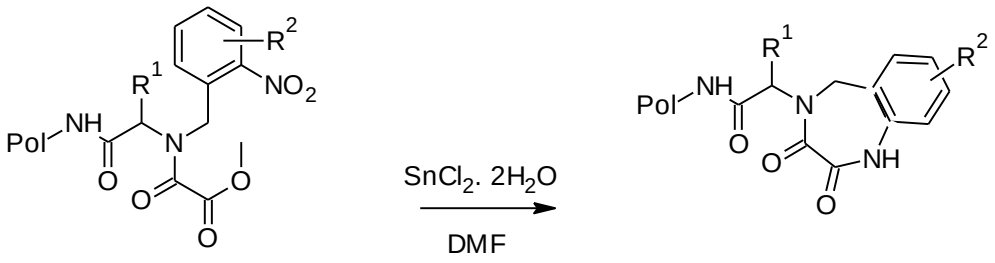
La réduction de 4-hydroxy-1-(2-nitrobenzoyl) pyrrolidine-2-carboxylique acide méthyle ester en deux étapes donne le dérivé 2R-hydroxy-1, 2, 3, 10, 11, 11aS-hexahydro-5*H*-pyrrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazépin-5,11-dione avec un rendement de 82% [29].



Le 2-amino-3-phényl-3,4-dihydro-5*H*-1,4-benzodiazépin-5-one est obtenu aussi en une étape à partir de *N*-[cyano(Phenyle) méthyl]-2-nitrobenzamide par réduction avec la poudre zinc dans l'acide acétique [30].



Le benzo [E]-[1,4] diazepine-2,3-diones est obtenue à partir de méthyle aminooxoacetate par cyclisation réductive en présence de chlorure d'étain dihydraté et le DMF avec un rendement 65-96% [31].



R^2= H, Cl, OMe.

Intérêt biologique :

Les hétérocycles azotés à sept membres présentent diverses activités biologiques dans le domaine pharmacologique.

Les dérivés benzodiazépines, sont largement utilisés comme agents anti tumorales [32], anticancéreux [33], anticonvulsants [34,35], hypnotiques [34]. Les applications thérapeutiques des dérivés benzodiazépines (Diazépam, Triazolam, Midazolam) sont très connues comme anxiolytiques [36], sédatives [37].

I.5. Activités antibactérienne et antifongique :

I.5.1. les bactéries :

Ce sont des micro-organismes, utiles pour la vie sur terre, inoffensifs dans leur grande majorité bien que certains soient pathogènes et dangereux pour la santé. Les bactéries pathogènes sont responsables des infections. Elles peuvent provoquer une inflammation des parois intestinales. Certaines d'entre elles peuvent même traverser ces parois et infecter d'autres organes en provoquant des dommages graves et parfois mortels. Elles sont la cause de 90 % des intoxications alimentaires. Elles peuvent être divisées en deux groupes (Gram négatif et Gram positif) [38].

Bactéries étudiées :

Dans les travaux scientifiques de la littérature de nombreuses bactéries sont étudiées mais deux d'entre-elles focalisent une majorité des études : *Escherichia coli* et *Staphylococus aureus*. Ces deux bactéries sont présentées dans ce paragraphe et elles ont été ensuite utilisées dans notre travail.

I.5.1.1. *Escherichia coli :*

E. coli est un bacille à Gram négatif. C'est l'une des espèces bactérienne les plus souvent rencontrées en pathologie humaine. C'est une bactérie de « référence » pour la recherche. Typiquement elle se présente sous la forme de bâtonnets de 2-4 µm de longueur (Figure I.1).

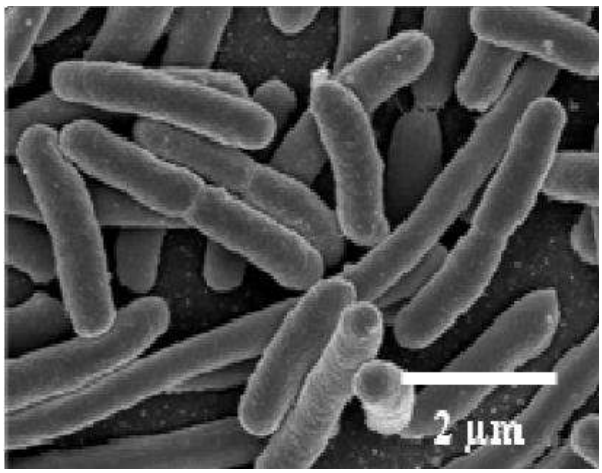


Figure I.1: Image MEB *d'Escherichia coli* [39].

Certaines souches d'*E. Coli* présentent un pouvoir pathogène comme *E. coli* qui se retrouve dans les aliments non stériles tels que le lait cru, les plats non cuisinés et dans la viande (steak haché). Les symptômes couramment associés avec cette bactérie sont la diarrhée et la gastro entérite [40].

Dans notre cas l'E. coli servira de référence pour la famille des bactéries à Gram négatif.

I.5.1.2. Staphylococcus aureus :

S. aureus est une cocci à Gram positif. C'est une bactérie pyogène et toxinogène, responsable de nombreuses infections communautaires et nosocomiales qui représente donc un problème de santé publique important. Elle provoque de nombreuses infections suppuratives dues à la multiplication de la bactérie et des infections toxiniques liées à la diffusion de toxines spécifiques [41]. Typiquement elle se présente sous forme de coques sphériques de diamètre 1 µm (Figure I.2).

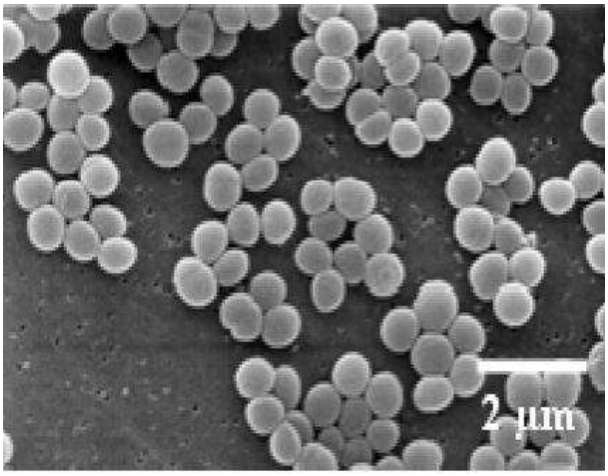


Figure I.2 : Image MEB de Staphylococcus aureus [39].

S. aureus se trouve généralement dans les fosses nasales et sur la peau de personnes en bonne santé. Si elle pénètre dans le corps, elle peut causer des infections cutanées légères, telles que des furoncles ou des anthrax, ou des infections plus graves, comme des pneumonies ou des bactériémies [38].

S. aureus sera utilisé dans nos travaux comme bactérie de référence pour les Gram positif.

I.5.2. Les antibactériens :

Les antibactériens sont des substances naturelles ou de synthèse capable d'inhiber la croissance ou même de détruire certains micro-organismes. Ils peuvent être bactéricides, c'est-à-dire tuant les bactéries, ou bactériostatiques, empêchant leur développement. Les antibiotiques, par exemple, sont des médicaments antibactériens [42].

I.5.3. Les champignons :

Les champignons sont des organismes uni ou pluricellulaires dépourvus de chlorophylle. Ils peuvent être soit bénéfiques pour la transformation des matières premières dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique ou encore dans la production d'enzymes… ; soit nuisibles par altération des matières premières et produits alimentaires, par la formation de métabolites toxiques, les mycotoxines ou par la présence d'agents pathogènes entraînant mycoses et allergies [43].

Champignons étudiés :

I.5.3.1. *Candidas albicans* :

Candidas albicans est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue de genre candida. C'est un organisme vivant à l'état naturel sur la peau, dans la bouche et les voies génitales de l'être humain. Quelque fois la *candidas albicans* est à l'origine de manifestations au niveau des muqueuses (couche de cellules recouvrant les organes creux en contact avec l'air) et de la peau, plus rarement entraine des septicémies (présence dans le sang) ou des lésions viscérales. Elle provoque des infections fongiques (candidas ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique [44].

Candidas albicans sera utilisé comme champignon de référence pour l'étude de l'activité antifongique.

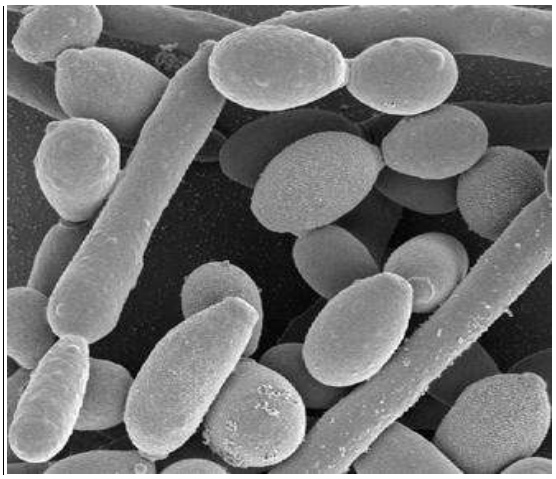


Figure 1.3 : Image MEB de *Candidas albicans* [45].

I.5.4. Les antifongiques :

Les antifongiques sont des molécules bioactives utilisées contre les champignons. Ces organismes forment un groupe phylogénétique homogène constitué de champignons macroscopiques et de champignons microscopiques (mycètes) à savoir les levures et les moisissures qui peuvent être saprophytes ou parasites. Dans ce dernier cas, ils peuvent attaquer soit l'être humain et on parle de mycose, soit les plantes causant ainsi des maladies cryptogamiques.

Selon l'activité qu'il exerce, un antifongique peut avoir un effet fongistatique (arrête la croissance des champignons) ou fongicide (détruit complètement la cellule fongique).Comparé aux infections bactériennes, le traitement des mycoses est souvent beaucoup plus difficile.

L'inflammation :

I.6.Définition :

La réaction inflammatoire est un ensemble de phénomènes par lesquels les leucocytes et les médiateurs se concentrent dans un territoire agressé de l'organisme, quelle que soit la nature de l'agresseur ; physique, chimique, infectieux, immunologique**.** C'est une réaction du tissu conjonctif et des vaisseaux [46]. Selon [47] l'inflammation est une réaction de défense des êtres vivants à une lésion ou une stimulation cellulaire excessive ou anormale.

I.7.Les causes de l'inflammation :

D'après [48], elles déterminent des lésions cellulaires ou tissulaires qui vont déclencher l'inflammation :

- Causes physiques (traumatisme, chaleur, froid, rayonnement, courant électrique).
- Causes trophiques par défaut de vascularisation.
- Causes chimiques (acides, bases).
- Causes biologiques (germes, bactéries, virus, parasites, champignons).

I.8.Les phases de l'inflammation :

Selon [49], le déroulement du processus inflammatoire est toujours le même. Il évolue en 3 stades successifs :

- Phase vasculaire
- Phase cellulaire
- Phase de réparation tissulaire

L'inflammation peut aussi causer une perte fonctionnelle dans la région touchée, selon

l'étendue de la lésion et l'endroit où elle se trouve. Elle circonscrit les microbes, les toxines et les substances étrangères aux environs de la lésion et prépare le site pour la réparation tissulaire. C'est ainsi qu'elle contribue à rétablir l'homéostasie des tissus.

I.9.Les anti-inflammatoires :

Les anti-inflammatoires, inhibe la réponse inflammatoire quel que soit l'agent pathogène responsable, par réduction de la vasodilatation et de l'œdème en diminuant le chimiotactisme et la migration leucocytaire vers le foyer inflammatoire [50]**.**

Selon **PIERI et *al.* (1992).**

Il existe deux grandes catégories des médicaments antiinflammatoires :

I.9.1.Anti-inflammatoires non stéroïdiens (A.I.N.S.) :

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (A.I.N.S.) forment un groupe de médicaments destinés à traiter la réaction inflammatoire et les maladies qui en résultent :

- ✓ Manifestation rhumatismales (arthrites, polyarthrites).
- ✓ Fractures, stomatites.
- ✓ Inflammation génito-urinaires.

I.9.2.Anti-inflammatoires stéroïdiens (A.I.S.) :

Ce sont des médicaments destinés à lutter contre l'inflammation qui constitue la réponse de l'organisme à un agent pathogène, en vue de son élimination, suivie de la régénération des tissus lésés.

Chapitre II :
Partie expérimentale

APPAREILLAGES

- ✓ Les pointes de fusion $\mathbf{P_f}$ sont déterminées à l'aide d'un appareil à plaque chauffante **FICHER-JONES** (à lamelles)**.**
- ✓ Les spectres infrarouges(**IR**) sont enregistrés sur un spectromètre à transformer de Fourier, de marque **PARAGON 1000pc.**
- ✓ Les spectres de résonance magnétique nucléaire (**RMN**) sont enregistrés sur un spectromètre de marque **BRUKER AVANCE 300 et 400 MHz**
- ✓ Une pompe à vide de marque **DREHSCHIEBER** avec une pression jusqu'à 135 mmHg**.**
- ✓ Evaporateur rotatif de marque **SLUART.**
- ✓ Indice de réfraction par un réfractomètre de marque **Carl Zeis.**
- ✓ Agitateur vortex de marque Heidolph.D **8420 Kelheim.**
- ✓ Gabarie de gavage de marque TUBERCOLINE**.**

PRODUITS UTILISES

Réactifs	Formule Chimique	Pureté	firme
1-chloro-2,4-dinitro benzène	$C_6H_2ClN_2O_4$	99,9%	Aldrich
1,3-dicloro-2,dinitro benzène	$C_6H_2Cl_2N_2O_4$	99,9%	Aldrich
Acide 2-oxoglutarique	$C_5H_6O_5$	99%	Biochim
Acide acétique	$C_2H_4O_2$	99-100%	Aldrich
Acide chlorhydrique	HCl	36-38%	Riedel-de Haën
Dithionite de sodium	$Na_2S_2O_4$	86%	Riedel-de Haën
Ethanol	C_2H_5OH	99,8%	Aldrich
Hydrazine monohydrate	$N_2H_4.H_2O$	99,9%	Fluka
Méthanol	CH_3OH	99%	Aldrich
Carragénine®	$C_{24}H_{36}O_{25}S_2^{-2}$	/	Saidal
Dichlofénac de sodium	$C_{14}H_{10}Cl_2NO_2Na$	99%	Saidal
Eau physiologique	/	/	Saidal

Matériel biologique :

Nous avons évalué le potentiel biologique des hétérocycles. L'objectif est de mettre en évidence une corrélation entre la structure chimique et l'effet d'inhibition observé sur les souches étudiées. Pour cela six souches microbiennes dont deux bactéries Gram positifs et deux bactéries Gram négatifs et un champignon et une levure ont été sélectionnées :

Staphylococcus aureus ATCC16404, *Staphylococcus epidermides* ATCC 12228.

Escherichia coli ATCC 11105, *Pseudomonas aérogènes* ATCC 9027.

Candida Albicanes ATCC10231, *Saccharomyces cervicie* ATCC 97363.

II.1. Synthèse des composés de départs :

II.1.1. Préparation de 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène :

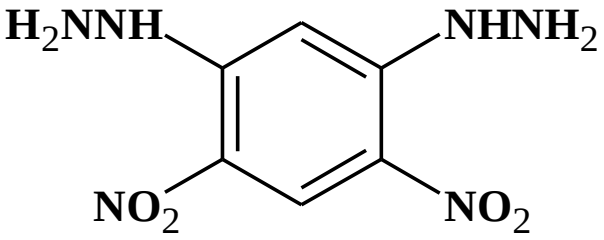


Schéma.II.1 : Structure de 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène.

Dans un ballon Bicol muni d'un réfrigérant et d'une ampoule à brome on dissout 2g de 1,3-dicloro-2,4-dinitrobenzène dans 40 ml d'éthanol et on égoutte sous agitation 2 ml d'hydrazine monohydrate dissout dans 20 ml de même solvant. Le précipité formé est porté sous reflux pendant une heure pour achever complètement la réaction. Après refroidissement à température ambiante, on filtre sous vide le précipité formé et on le recristallise dans l'éthanol.

$C_6H_8N_6O_4$ (228g/mol) : cristaux rouge brique.

P_f =255 °C

Rendement = 98,2% (m_f = 1,89g)

IR: 3200-3400 cm^{-1} (NH et NH_2); 1500 cm^{-1}(NO_2). (Figure III.1).

II.1.2. Préparation de (E) -2,4-dinitrophénylhydrazine :

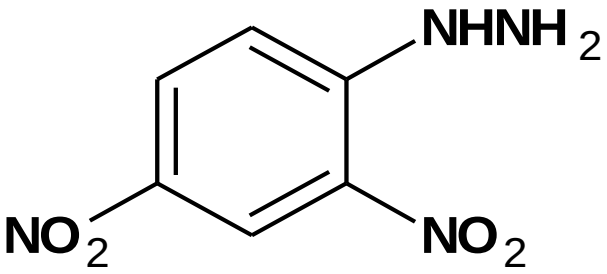


Schéma.II.2 : Structure de (E)-2,4- dinitrophénylhydrazine.

Dans un ballon Bicol muni d'un réfrigérant, on dissout 2,5 g de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène dans 50 ml d'éthanol et on égoutte, sous agitation à l'aide d'une ampoule à brome, 2,5 ml d'hydrazine monohydrate dissout dans 20 ml d'éthanol. Le précipité formé est porté sous reflux pendant une heure pour achever complètement la réaction. Après refroidissement à température ambiante on filtre sous vide le précipité formé et on le recristallise dans l'éthanol.

$C_6H_6N_4O_4$ (198 g/mol) : cristaux rouge.

P_f = 200°C

Rendement = 90% (m_f = 2,19 g).

IR : 3102,75 et 3323,03 cm^{-1} (NH et NH_2) ; 1487,75 et 1513,11 cm^{-1} (NO_2). (Figure III.2).

II.1.3. Préparation de 2-oxoglutarate de dialkyles :

II.1.3.1. Préparation de 2-oxoglutarate de diméthyle :

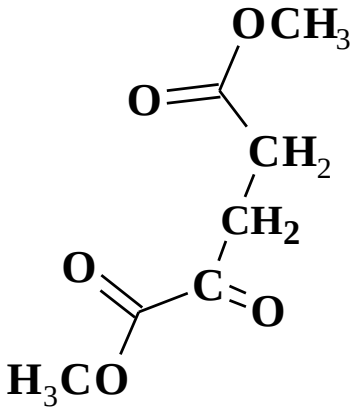


Schéma.II.3 : Structure de 2-oxoglutarate de diméthyle.

Dans un ballon on dissout 50 g (0,34 mol) d'acide 2-oxoglutarique dans 205 ml de méthanol absolue, on ferme le ballon sous protection de l'humidité et on le laisse se reposer à température ambiante pendent 5 jours tout en agitant occasionnellement.

Le 6^{éme} jours, on chauffe le mélange réactionnel pendant 6 heures. Puis on distille l'excès de méthanol et d'acétone formé sous vide dans un évaporateur rotatif. Ensuite on fractionne sous vide le produit huileux restant.

$C_7H_{10}O_5$ (174 g/mol), produit huileux incolore.

Rendement = 44,6% (m_f = 26,6g).

n^{25}_d = 1,4395

IR=1726,35 cm^{-1} (C=O); 1080,46 cm^{-1} (C-O). (Figure III.3).

II.1.3.2. Préparation de 2-oxoglutarate de diéthyle :

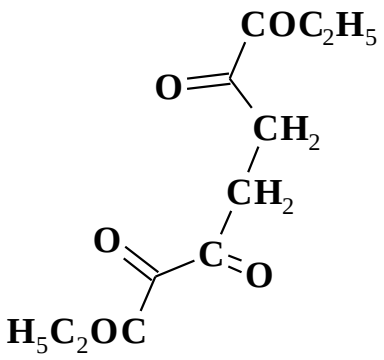


Schéma.II.4 : Structure de 2-oxoglutarate de diéthyle.

Dans un ballon on dissout 20 g d'acide 2-oxoglutarique dans 82 ml de l'éthanol absolu, on ferme le ballon sous protection de l'humidité et on le laisse se reposer à température ambiante pendent 5 jours en agitant occasionnellement.

Le 6^{éme} jours, on distille l'excès de l'éthanol formé sous vide dans un évaporateur rotatif. Ensuite on fractionne sous vide le produit huileux restant.

$C_9H_{14}O_5$ (202 g/mol), produit huileux incolore.

Rendement = 75,17% (m_f = 20,80g)

n^{25}_d = 1, 4365

IR=1724,99 cm^{-1} (C=O); 1079,46 cm^{-1} (O-C). (Figure III.4).

II.1.4.Préparation de (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle :

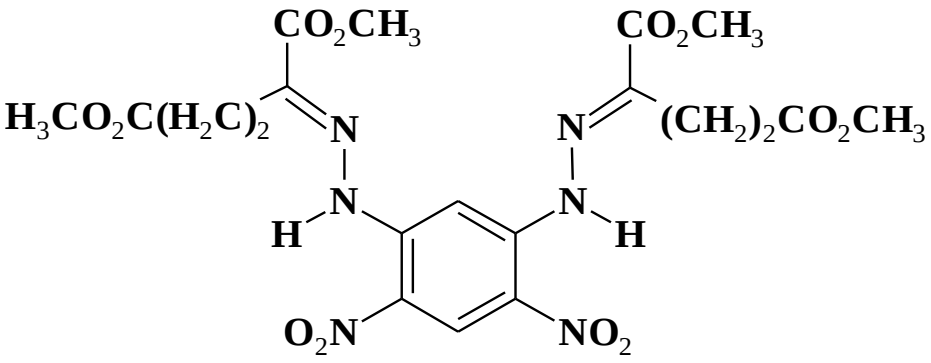


Schéma.II.5 : Structure de (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle.

Dans un erlenmeyer, on dissout 1 g de 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène dans 50 ml de méthanol et sous agitation on égoutte 1,55 g de 2-oxoglutarate de diméthyle. On laisse sous agitation jusqu'à formation d'un précipité de couleur jaune. On filtre le produit obtenu sous vide et on le recristallise dans le méthanol.

$C_{20}H_{24}N_6O_{12}$ (540g/mol): cristaux jaunes.

P_f = 87°C

Rendement = 83%; (m_f = 2,22g).

IR=1724, 33 cm^{-1} ($RCOOCH_3$); 3234, 96 cm^{-1} (NH); 1574, 22 cm^{-1} (NO_2); 1236, 92 cm^{-1} (CN) (Figure III.5).

II.1.5. Préparation de (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diéthyle :

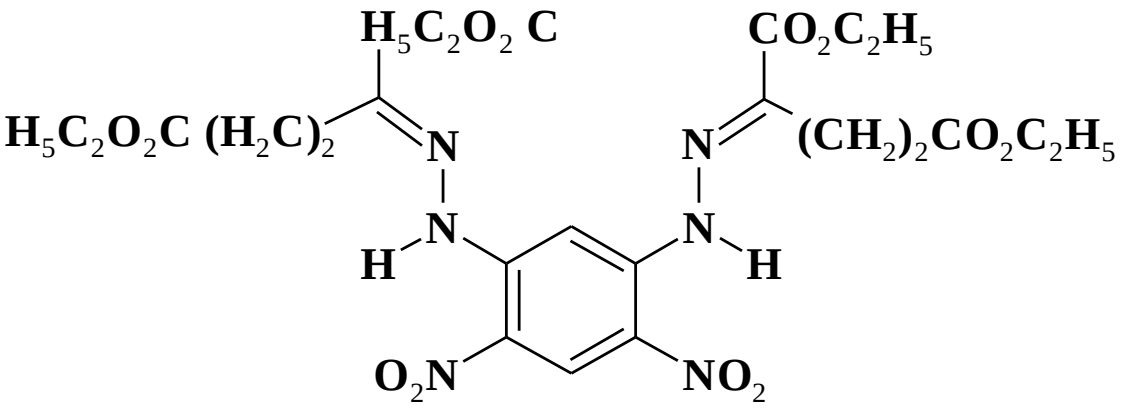


Schéma.II.6 : Structure de (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diéthyle.

Dans un erlenmeyer, on dissout 1 g de 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène dans 50 ml de l'éthanol. On ajoute 1,8 g de 2-oxoglutarate de d'éthyle et on laisse sous agitation jusqu'à formation d'un précipité de couleur jaunes. On filtre le produit obtenu sous vide et on le recristallise dans l'éthanol.

$C_{24}H_{32}N_6O_{12}$ (596 g/mol): cristaux jaunes.

P_f = 90°C

Rendement = 32% (m_f = 0.84 g).

IR=1728, 09 cm^{-1} ($RCOOC_2H_5$) ; 2980, 71 cm^{-1} (NH) ; 1564, 07 cm^{-1} (NO_2) ; 1210, 94 cm^{-1} (CN) (Figure III.6).

II.2 Réduction :

II.2.1.Réduction de (E)/(E) 4,6-dinitrophényl -1,3-dihydrazono oxoglutarate de dialkyles par le dithionite de sodium :

II.2.1.1.Réduction de (E)/(E) 4,6-dinitrophényl -1,3-dihydrazono oxoglutarate de diméthyle :

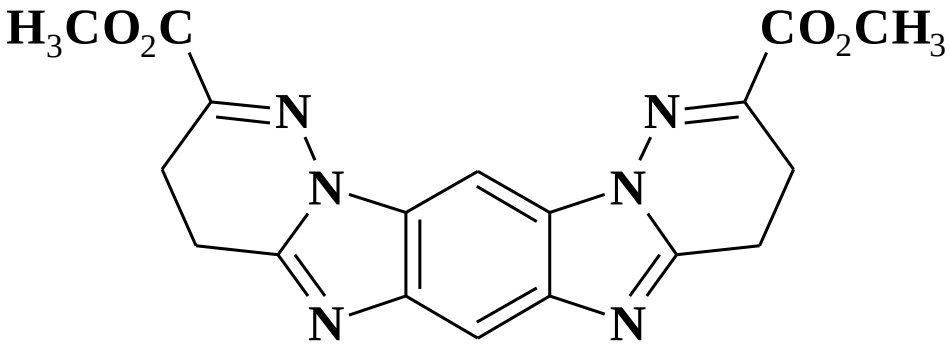


Schéma.II.7 : Structure de réduction (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle.

Dans un ballon Bicol on dissout 0,5 g (0,0007mol) de (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diméthyle dans 45 ml de méthanol. On égoutte sous agitation à l'aide d'une ampoule à brome 7,8 g de dithionite de sodium dissous dans 30 ml d'eau distillé. On maintient le mélange sous reflux et agitation jusqu'au changement de la couleur d'un rouge foncé en un jaune. On filtre la solution pour éliminer le sel formé, on ajoute deux à trois volumes d'eau distillée au filtrat et on chauffe la solution jusqu' à ébullition. On laisse refroidir à température ambiante, des cristaux se forment. On le filtre et on le recristallise dans le méthanol.

$C_{18}H_{16}N_6O_4$ (380g/mol): cristaux jaunes.

P_f = 244°C

Rendement = 2,7 %; (mf =0,028g).

IR= 1708,86 cm^{-1} (C=O); 1104,97cm^{-1} (CN). (Figure III.7).

^{1}H -RMN ($CDCl_3$) = 3,86 et 4,05 ppm (C**H**$_2$) ; 3,05 et 3, 35 ppm (C**H**$_3$) ; entre 7,9 et 8,06 ppm (**H**$_{arom}$). (Figure III.8).

^{13}C-RMN ($CDCl_3$) = entre 19,58 et 21,25 ppm (**C**H_2) ; 53,04 ppm (O**C**H_3) ; entre 90,62 et 139,41 ppm (**C**$_{arom}$) ; 163,56 ppm (**C**O_2) ; et entre 144,13 et 174.20 ppm (N=C). (Figure III.9).

II.2.1.2.Réduction de (E)/(E) 4,6-dinitrophényl -1,3-dihydrazono oxoglutarate de diéthyle :

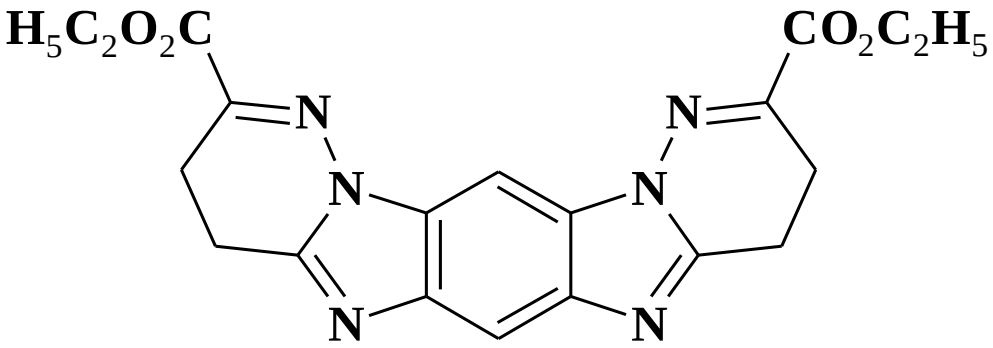


Schéma.II.8 : Structure de réduction (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diéthyle.

Dans un ballon Bicol on dissout 0,5 g de (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate d'éthyle dans 50 ml de l'éthanol. On égoutte sous agitation à l'aide d'une ampoule à brome 7,8 g de dithionite de sodium dissous dans 30 ml d'eau distillé. On maintient le mélange sous reflux et agitation jusqu'au changement de la couleur d'un rouge foncé en un jaune. On filtre la solution pour éliminer le sel formé, on ajoute deux à trois volumes d'eau distillée au filtrat et on chauffe la solution jusqu' à ébullition. On laisse refroidir à température ambiante des cristaux se forment. On le filtre et on le recristallise.

$C_{20}H_{20}N_6O_4$ (388g/mol): couleur jaune claire.

Pf= 256°C

Rendement = 28%; (m_f = 0.092 g).

IR =1708,91cm^{-1} (C=O); 1104.93 cm^{-1} (CN). (Figure III.12).

II.3.Préparation des dérivés de (E)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyle :

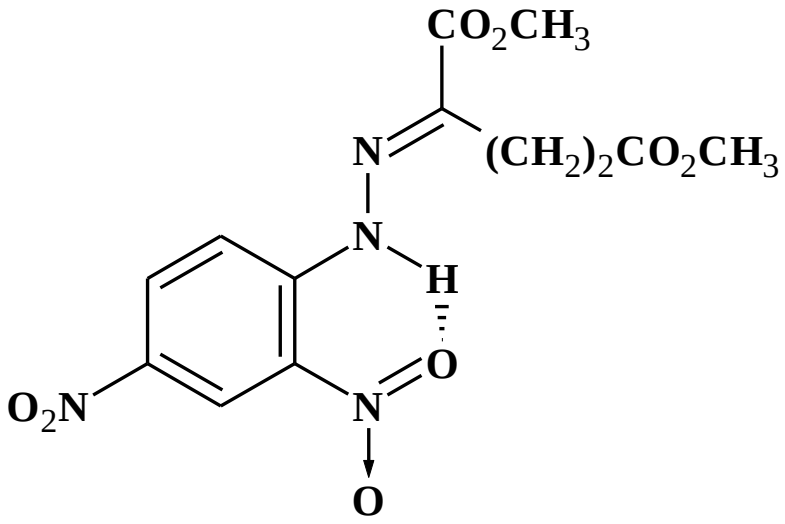


Schéma.II.9 : Structure des dérivés de (E)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyle.

Dans un erlenmeyer on suspend 1g (0.01 mole) de 2,4-dinitrophényl-hydrazine dans 50 ml de méthanol On ajoute 1,55g de 2-oxoglutarate de diméthyle et on laisse le mélange réactionnel jusqu'à formation d'un précipité qui est ensuite filtré et recristallisé dans le méthanol.

$C_{13}H_{14}N_4O_8$ (343,74 g/ mol): cristaux jaunes.

P_f = 120-123°C

Rendement = 70% ; m_f = (2.66 g).

IR =3430 et 3201 cm^{-1} (N-H) ; 1720,4 cm^{-1} (COOR) ; 1604,7 et 1504,4 cm^{1} (NO_2).

II.4.Préparation de (Z)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyle :

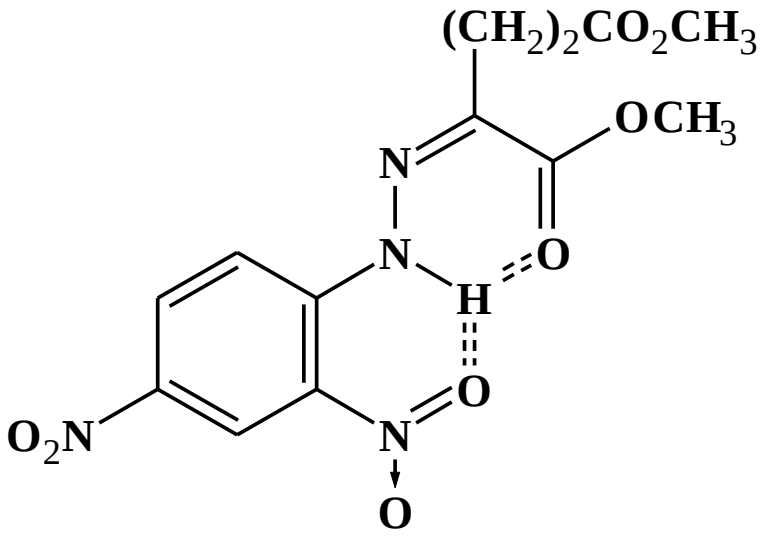


Schéma.II.10 : Structure de (Z)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyle.

Dans un erlenmeyer on suspend 1 g (0,01 mole) de (E)-2,4-dinitrophénylhydrazono glutarate de diméthyle dans 30 ml de méthanol et on ajoute 1 ml d'acide chlorhydrique concentré ; on laisse sous agitation pendant 1 heure. Ensuite on filtre et on recristallise dans le méthanol**.**

$C_{13}H_{14}N_4O_8$ (354,28 g/mol) : cristaux jaunes de citron.

$P_{f\,=}$ 129-130°C

Rendement = 86%; m_f = (2,36g).

IR = 3420 et 3200 cm^{-1} (N-H) ; 1728,4 cm^{-1} (COOR) ;

1596,9 et 1512,1 cm^{-1} (NO_2).

II.5.Préparation des dérivés 1,2-diazépines :

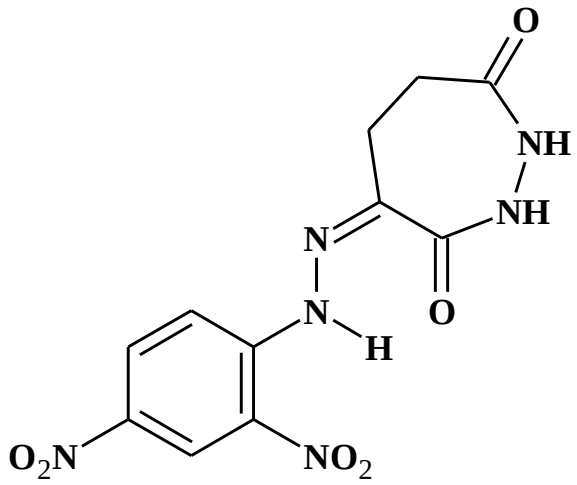


Schéma.II.11 : Structure des dérivés 1,2-diazépines.

Dans un ballon on dissout 1 g (0.003 mole) de (Z)-2,4-dinitrophénylhydrazono glutarate de diméthyle dans 40 ml d'éthanol absolue et après ajout de 2 g (0.04 mole) d'hydrazine monohydrate on porte le mélange réactionnel à l'ébullition sous reflux jusqu'à formation d'un précipité, environ 3 heures. Après refroidissement le produit est filtré et lavé avec de l'éthanol.

$C_{11}H_{10}N_6O_6$ (322 g/mole) : cristaux rouges foncés.

P_f = 195-198°C

Rendement = 33%; m_f = (0.58g).

IR = 3348 ,2 et 3242,8 cm^{-1} (N-H); 1596,9 cm^{-1} (NCO lactame); 1404,4 cm^{-1} (NO_2).

II.6.Réduction des dérivés 1,2-diazépines :

Dans un ballon Bicol on dissout 0,5g des dérivés 1,2-diazépines dans 50 ml de l'éthanol .On égoutte sous agitation à l'aide d'une ampoule à brome 7,8g de dithionite de sodium dissous dans 30 ml d'eau distillé. On maintient le mélange sous reflux et agitation jusqu'au changement de la couleur d'un rouge foncé en un jaune .On filtre la solution pour éliminer le sel formé, on ajoute deux à trois volumes d'eau distillée au filtrat et on chauffe la solution jusqu' à ébullition. On laisse refroidir à température ambiante des cristaux se forment. On le filtre et on le recristallise.

cristaux orange claire.

m_f = (0.03 g).

II.7.Partie biologique :

II.7.1.Evaluation de l'activité biologique :

II.7.1.1.Activité antimicrobienne des hétérocycles synthétisés :

Les tests microbiens ont été réalisés au niveau de laboratoire microbiologique de l'unité Antibiotical de « Saidal » à Médéa. L'activité antimicrobienne des produits synthétisés a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Cette technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou encore méthode des disques, est une méthode en milieu gélosé réalisée dans des boîtes à pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée de produit à tester.

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester, les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque produit à tester diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration.

Les bactéries se croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance, on observe ainsi autour des disques une zone circulaire échappé de colonies appelée « zone d'inhibition ».

II. 7.1.2. Préparation des solutions :

On dissout 0,02 g et 0,01g de produit dans 1 ml de DMSO. On obtient une solution avec une concentration de 20 mg/ ml et 10 mg/ ml. On met la solution dans un tube à essai stérilisé. On refait ce travail avec les autres produits. Les produits testés sont :

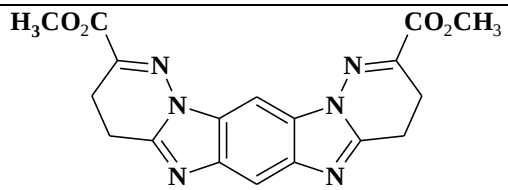
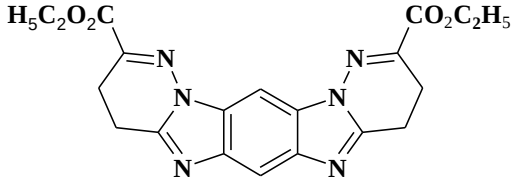
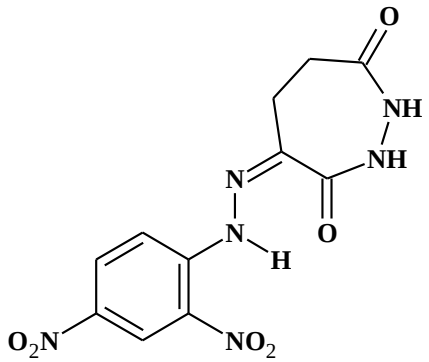
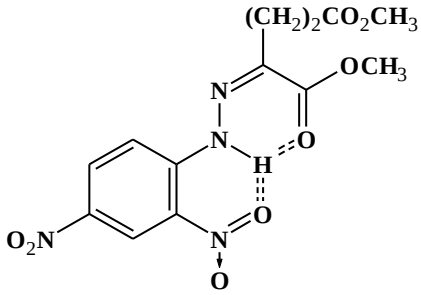
N°	Structures	[mg/ml]	Nom
2		20	Réduction de (E)/(E) 4,6-dinitrophényl -1,3-dihydrazono oxoglutarate de diméthyle par le dithionite de sodium.
3		10	Réduction de (E)/(E) 4,6-dinitrophényl -1,3-dihydrazono oxoglutarate de diéthyle par le dithionite de sodium.
4		20	Dérivés 1,2-diazépines.
5		20	(Z)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyle.
6	/	20	Réduction de Dérivés 1,2-diazépines.
7	/	20	Amoxicilline®.

Tableau II. 1 : Structures et concentrations et désignation des produits testés.

III.7.1.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des produits 2, 3, 4, 5 et 6 :

- Microorganismes :

Au cours de ce travail ont a utilisé six souches bactériennes :

Gram(-) : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aérogénosa*.

Gram(+) : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus Epidermidi.*

- Milieux de cultures **:**

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus Epidermidi* et *Pseudomonas aérogénosa* : les trois bactéries sont cultivées sur un milieu Soja agar et le dernier sur un milieu (CAB) cetrimid agar.

- L'ensemencement **:**

En premier lieu il faut chauffer le milieu de culture à 100 °C dans un bain marie, le laisser refroidir jusqu'à 50 °C, et couler les boites de pétri à une épaisseur de 4 mm, les sécher pendant 30 minutes, ensuite verser 2 à 6 ml de l'inoculation bactérienne d'une façon à recouvrir toute la surface gélosée, enfin sécher les boites ensemencées pendant 15 minutes.

- La distribution des disques :

Avec un distributeur de disques en respectant les précautions d'asepsie habituelles on place les disques stériles de 9 mm de diamètre en papier filtre imbibent dans les produits synthétisés à tester, de telle sorte que leurs centres soient distants d'au moins 24 mm du bord de la boite de pétri, on appuie doucement sur chaque disque avec une pince stérile pour assurer un contacte uniforme avec la surface de la gélose. On place les boites de pétri avec le coté gélose tourné vers le haut dans un incubateur à 35°C pendant 16 à 18 h.

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des solutions.

II.8. Evaluation de l'activité antifongique des produits 2, 3, 4, 5 et 6 :

- Micro-organismes

Deux souches sont utilisées pour l'activité anti- fongiques :
Champignon non filamenteux *Candidas albicanes* (Levure).
Champignon filamenteux *saccharomyces cervisie* (moisissure).

- Milieu de culture :

Saccharomyces cervisie et *Candidas albicans* : Les deux champignons sont cultivés sur un milieu gélose sabouraud.

- Inoculation du milieu de culture et évaluation de l'activité antifongique :

Le milieu gélose sabouraud 20 ml est mis dans chaque boite de pétri. Après solidification, 2 ml de la solution physiologique contenant des spores de champignons sont ajoutés dans chaque boîte et répartis équitablement à la surface du milieu.

Les disques circulaires de 9 mm de diamètres en papier filtre et préalablement stérilisés, sont imbibés dans les produits et déposés à la surface du milieu ensemencé.

Les disques imbibés de solvants utilisés ont été testés en même temps comme références. L'activité antifongique est évaluée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition se trouvant autour du disque et exprimée en millimètres.

Les observations effectuées sur l'effet de nos produits (produit (2) et (3) et (4) et (5) et (6) sur la croissance des souches fongique testées *Candida albicanes* (Levure) et *saccharomyces cervisie* (moisissure) et on apprit comme référence un médicament (Nystatine®).

II.9.Etude de l'activité anti-inflammatoire :

1. Animaux :

Des souris mâles, dont le poids varie entre 17 à 24 g, les animaux ont été placés dans des cages en polypropylène où ils sont privés d'eau et d'alimentation, 17 h avant le teste.

La distribution et le mécanisme d'action des anti-inflammatoire seraient proche des phénomènes observés chez l'homme, vue que la souris est l'espèce plus comparable à

L'humaine sur le plan métabolique

2. Principe :

Le principe consiste à injecter, sous l'aponévrose plantaire de la patte arriéré gauche de la Carragénine provoquant ainsi une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un produit

Anti-inflammatoire.

Ce test nous a permis de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration des doses égales de chacun du produit à tester et celui de référence.

3. Préparation de la solution :

Les préparations des solutions des hétérocycles de deux doses (0.02mg/ml) pour le produit (1) et (0.01 mg/ml) pour le produit (2).

Et la solution de Dichlofénac de sodium à 75mg /750ml et la carragénine à 1%.

II.9.1.Mode opératoire :

1. Matériel animal :

Animal	Souris albinos
Nom scientifique	Souche N.M.R.I (Naval Médical Research Institute. D'origine swiss, importée d'IFFA-CREDO (Lyon).
Effectif	4 lot +14souris chacun lot 4 souris + lot + témoin.
Poids (g)	17-24 g.
Sexe	Male et femelle.
Nourriture	Tourteau, agglomérés, composés de mais, son remoulalage, soja, CMV.
Boisson	Eau de robinet (eau potable).
Température de laboratoire (C°)	18-24 T^0 ambiante.
Elevage	Complexe antibiotical site de production de Médéa (Saidal).

Tableau II.2 : le matériel animal utilisé et les conditions opératoires.

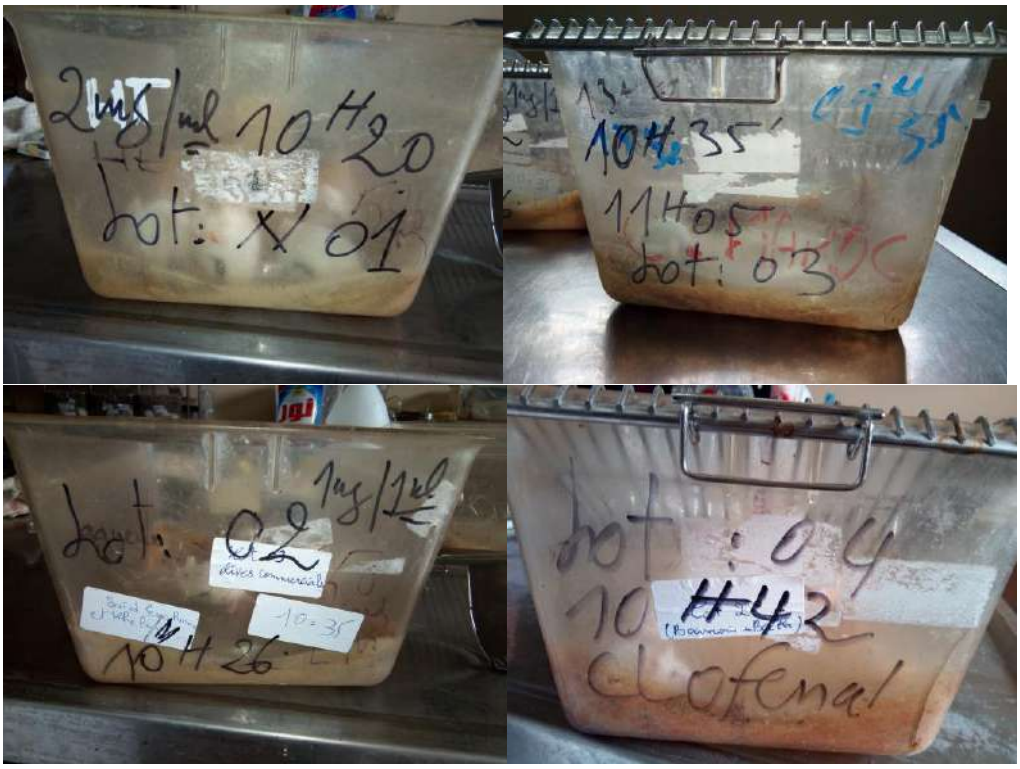
1. animaux :

Panser les souris dont le poids varie entre 17 à 24g, les animaux ont été placés dans des cages en polypropylène ou ils sont privés d'eau et d'alimentation pendant 17 h avant de faire les tests.

2. Répartition des animaux :

Les souris ont été réparties en 4 lots de 4 souris :

- Lot témoin négatif
- Lot témoin positif
- Lot dose1
- Lot dose 2



FigureII.1 : les quatre lots de souris

3. Administration et injection :

Au temps T_0 (gavage) : Dans notre cas les souris ont été mises à jeune, nous avons administré par voie intra-gastrique (gavage) les suspensions suivant :

- Lot témoin négatif : chaque souris a reçu 0,5 ml de l'eau physiologique,

- Lot témoin positif : chaque souris a reçu 0,5 ml de référence (Dichlofénac de sodium®).

- Lot dose 1 : chaque souris a reçu 0,02 mg /ml

- Lot dose 2 : chaque souris a reçu 0,01mg /ml



Figure II.2 : photo d'injection des doses (gavage).

Après 30 minutes d'injection **;** les souris des quatre lots reçoivent 0,5 ml de la Carragénine par injection sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche.



Figure II.3 : Injection de la carragénine.

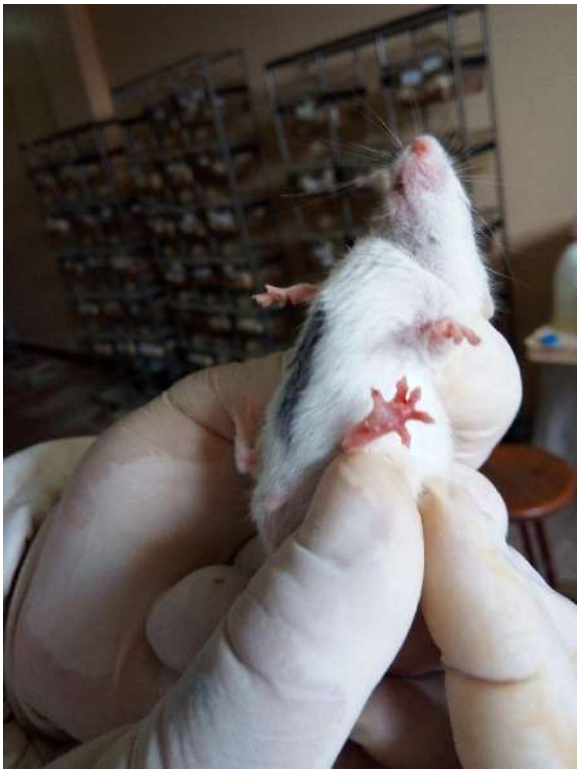


Figure II.4 : Gonflement après injection

Après 3h30 d'injection de carragénine. Les souris ont été Sacrifié par dislocation cervicale, et après, on découpe les pattes postérieures droites et gauches à hauteur de l'articulation et ont les pèses sur une balance analytique.



Figure II.5 : souris tuées par l'éther d'éthyle



Figure II.6 : Découpage des pattes postérie Droites et gauches.

4. Expression des résultats :

- On calcule les moyennes arithmétiques des poids de la patte gauche et la patte droite pour chaque lot.

- On calcule le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (% d'œdème) est on donne par l'expression suivant équation (II.1) :

$$\%\ \text{d'œdème} = \frac{\text{Moyenne des poids de patte droite –moyenne des poinds de patte gauche}}{\text{moyenne des poids de patte droite}} \times 100 \quad \text{(II.1)}$$

- calcul du pourcentage de réduction de l'œdème cher les souris traitées par rapport au témoin équation (II.2).

$$\%\ \text{de réduction de l'œdème} = \frac{\%\ \text{de l'oedème témoin} - \%\ \text{l'odoéme essai}}{\%\ \text{de l'odéme témoin}} \times 100 \quad \text{(II.2)}$$

Chapitre III :
Méthodes et discussion

III.1.Synthés des composés de départs :

III.1.1. Synthèse du 1, 3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène :

Le 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène est obtenu facilement à partir de 1,3-dichloro-4,6-dinitrobenzène. Les groupements nitro étant des attracteurs d'électrons appauvrissent le noyau benzénique en densité électronique. Ceci rend une substitution nucléophile facile des atomes de chlore par l'hydrazine en un mécanisme en deux étapes (addition /élimination) (Schéma III. 1).

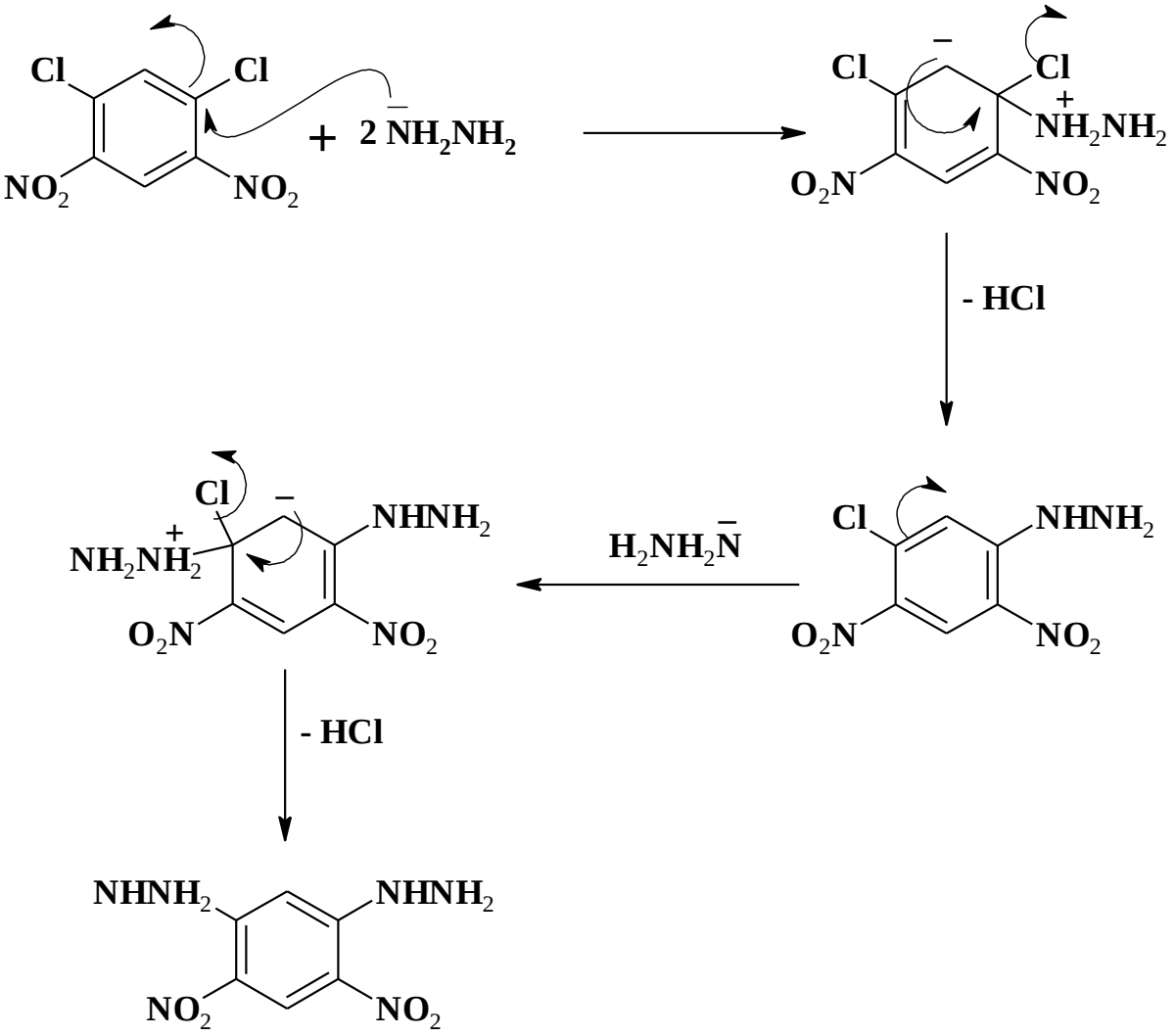


Schéma.III.1 : mécanisme réactionnel de la synthèse du 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène.

D'après le mode opératoire décrite dans la partie suivante, le 1,3-dichloro-4,6-dinitrobenzène est mélangé à froid avec l'hydrazine monohydrate en excès dans l'éthanol et porté sous reflux pendant une heure. Le 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène est obtenu avec un haut rendement.

Le spectre IR montre les vibrations caractéristiques des groupements NH et NH_2 entre 3200 et 3400 cm^{-1}, Les bandes d'absorption du groupement (NO_2) apparaissent aux alentours de 1500 cm^{-1} (Figure III.1).

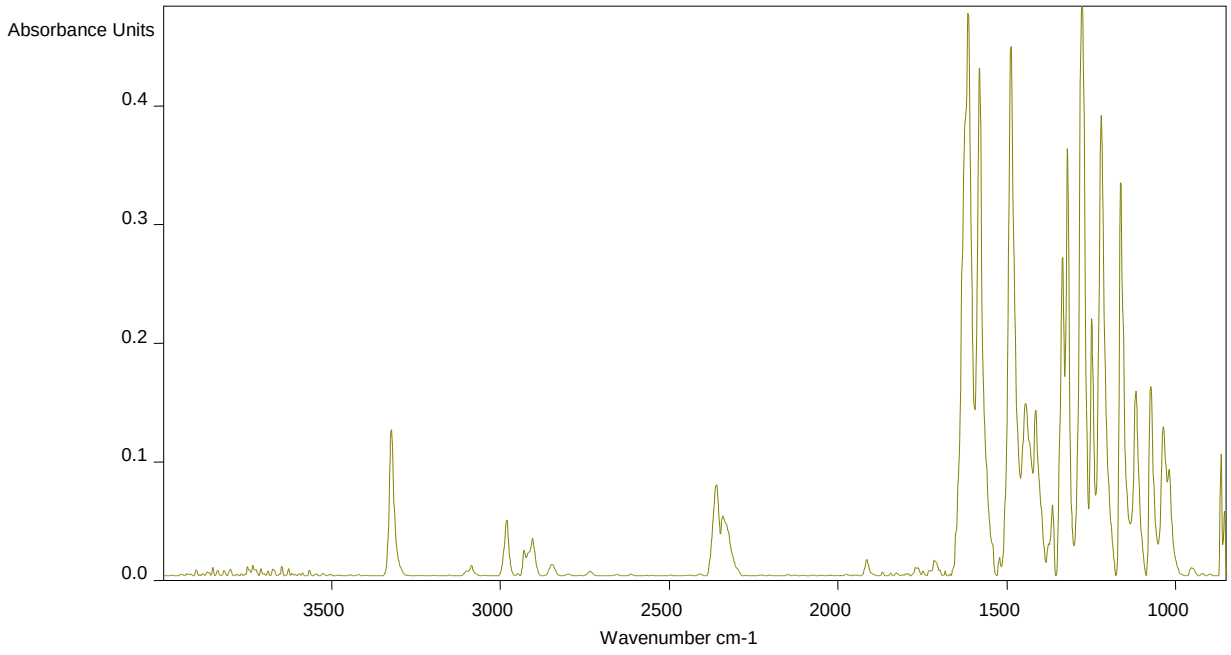


Figure.III.1 : Spectre IR de 1, 3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène.

III.1.2.Synthèse du 2,4-dinitrophénylhydrazine :

On peut obtenir le 2,4-dinitrophénylhydrazine à partir de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène selon le mécanisme réactionnel précédent en éliminant l'acide chlorhydrique comme sous-produit :

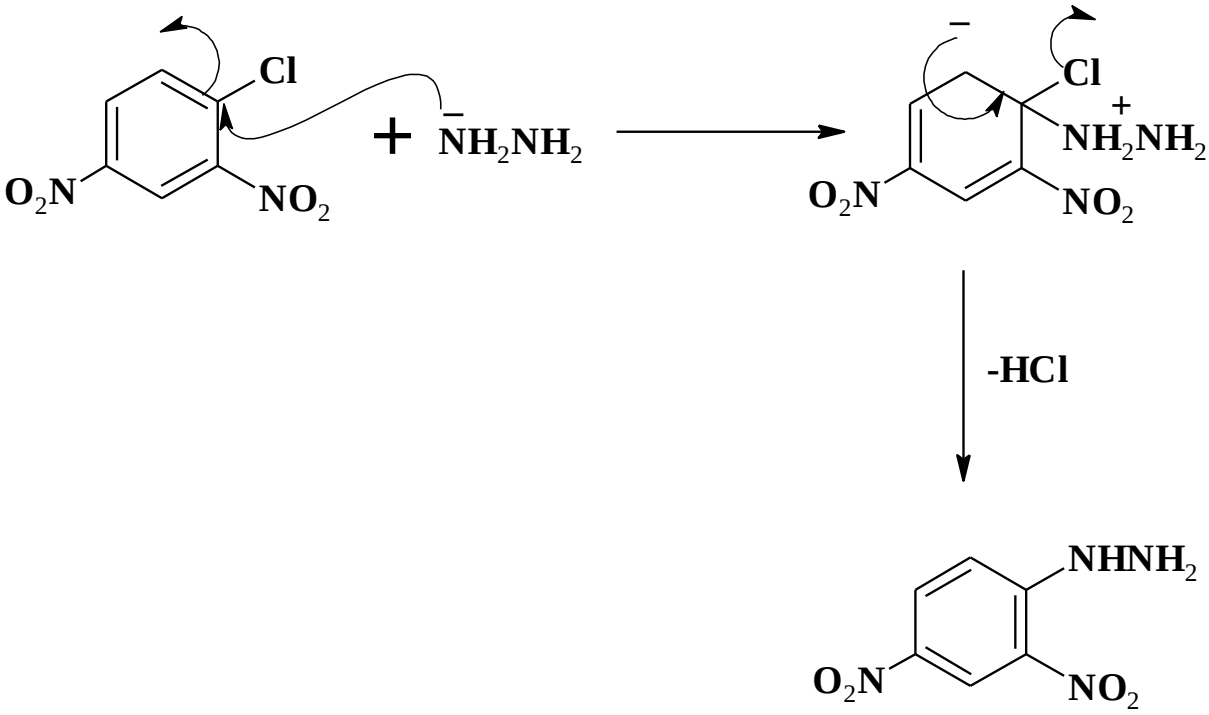


Schéma.III.2 : Mécanisme réactionnel de la synthèse du 2,4-dinitrophénylhydrazine.

D'après le mode opératoire, le 1-chloro-4,6dinitrobenzène est mélangé à froid avec l'hydrazine monohydrate en excès dans l'éthanol et porté sous reflux pendant une heure. Le 2,4-dinitrophénylhydrazine est obtenu avec un haut rendement.

Le spectre IR montre les vibrations caractéristiques des groupements NH et NH_2 entre 3102,75 et 3323,03 cm^{-1}. Les bandes d'absorption du groupement (NO_2) apparaissent à 1487,75 et 1513,11 cm^{-1} (Figure. III.2).

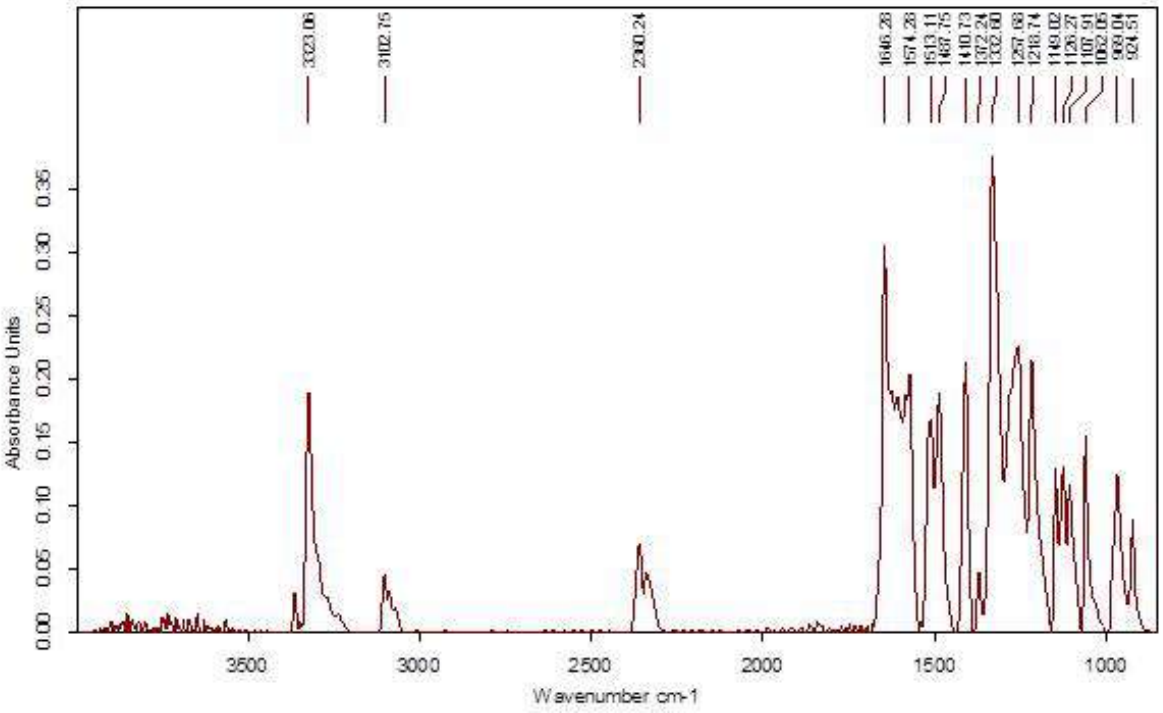


Figure.III.2 : Spectre IR de 2,4-dinitrophénylhydrazine

III.1.3.Synthèse du 2-oxoglutarate de dialkyles :

III. 1.3.1.Synthèse du 2-oxoglutarate de diméthyle :

D'après une procédure générale de synthèse du 2-oxoglutarate de diméthyle qui consiste à chauffer l'acide 2-oxoglutarique dans méthanol en présence d'acide sulfurique et finalement extraction avec l'éther donne un rendement maximal de 50% seulement d'ester.

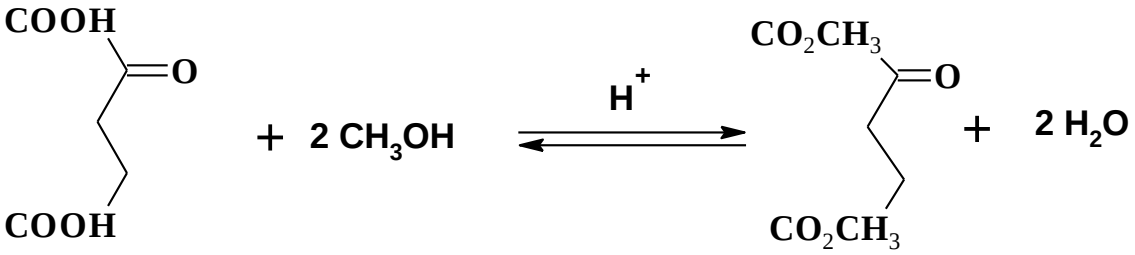


Schéma.III.3 : Mécanisme réactionnel de la synthèse du 2-oxoglutarate de diméthyle.

Le spectre IR fait apparaitre une bande forte caractéristique des groupements carbonyles (C=O) à 1726,35cm^{-1} ; et 1080,46cm^{-1} pour les groupements méthoxy (O-CH_3), (figure III.3).

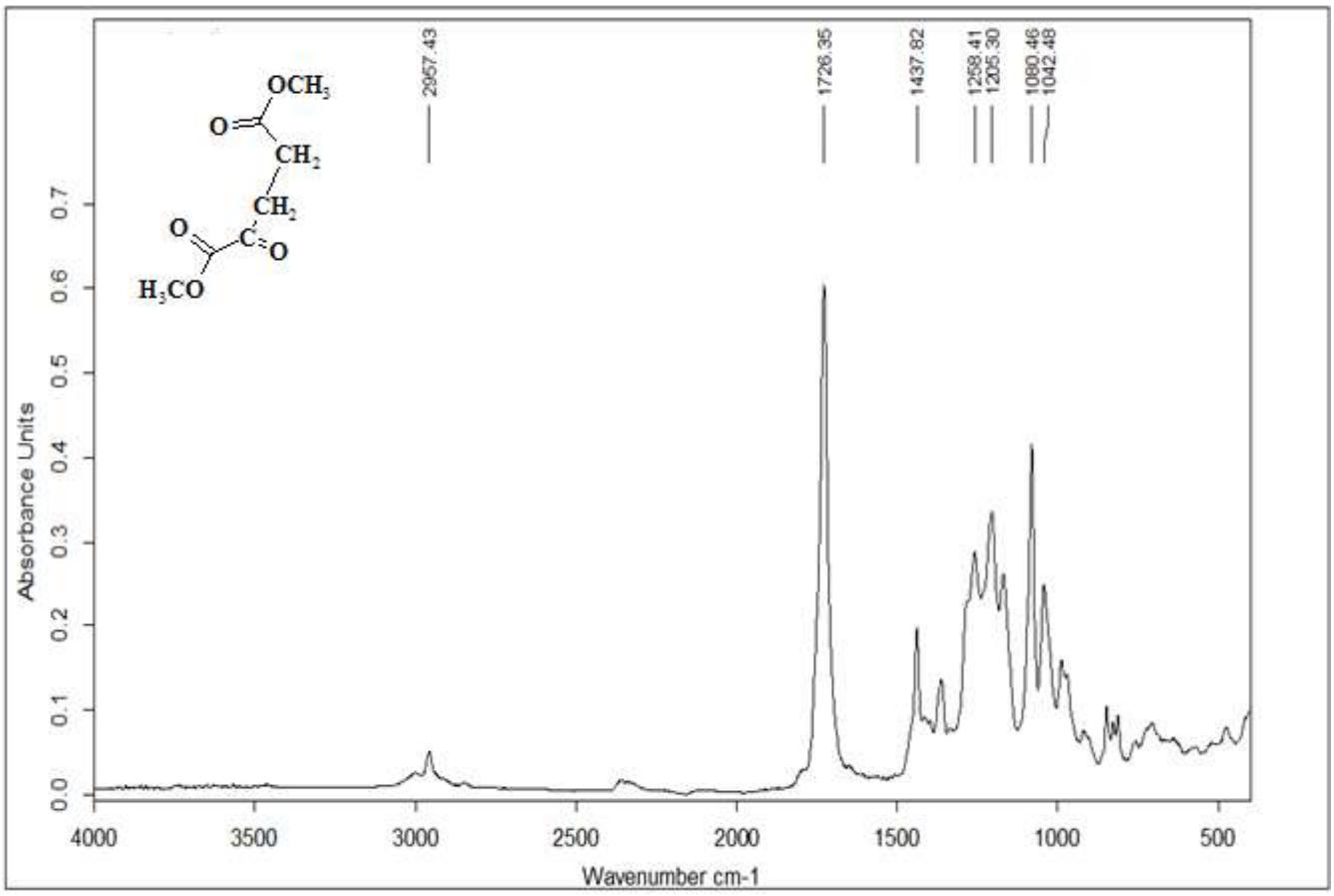


Figure.III.3 : Spectre IR du 2-oxoglutarate de diméthyle.

III.1.3.2. Synthèse du 2-oxoglutarate de diéthyle :

Pour la synthèse du 2-oxoglutarate de diéthyle qui consiste à chauffer l'acide 2-oxoglutarique dans l'éthanol en présence d'acide sulfurique et finalement extraction avec l'éther méthylique donne un rendement maximal de 50% seulement d'ester.

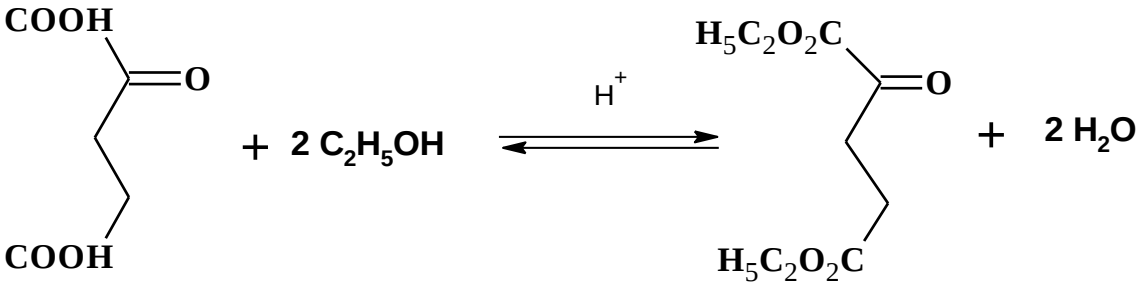


Schéma.III.4 : Mécanisme réactionnel de la synthèse du 2-oxoglutarate de diéthyle.

Le spectre IR fait apparaitre des bandes fortes caractéristiques du groupement carbonyle (C=O) à 1724,99 cm^{-1} et à 1079,46 cm^{-1} pour le groupement éthoxy, (figure III.4).

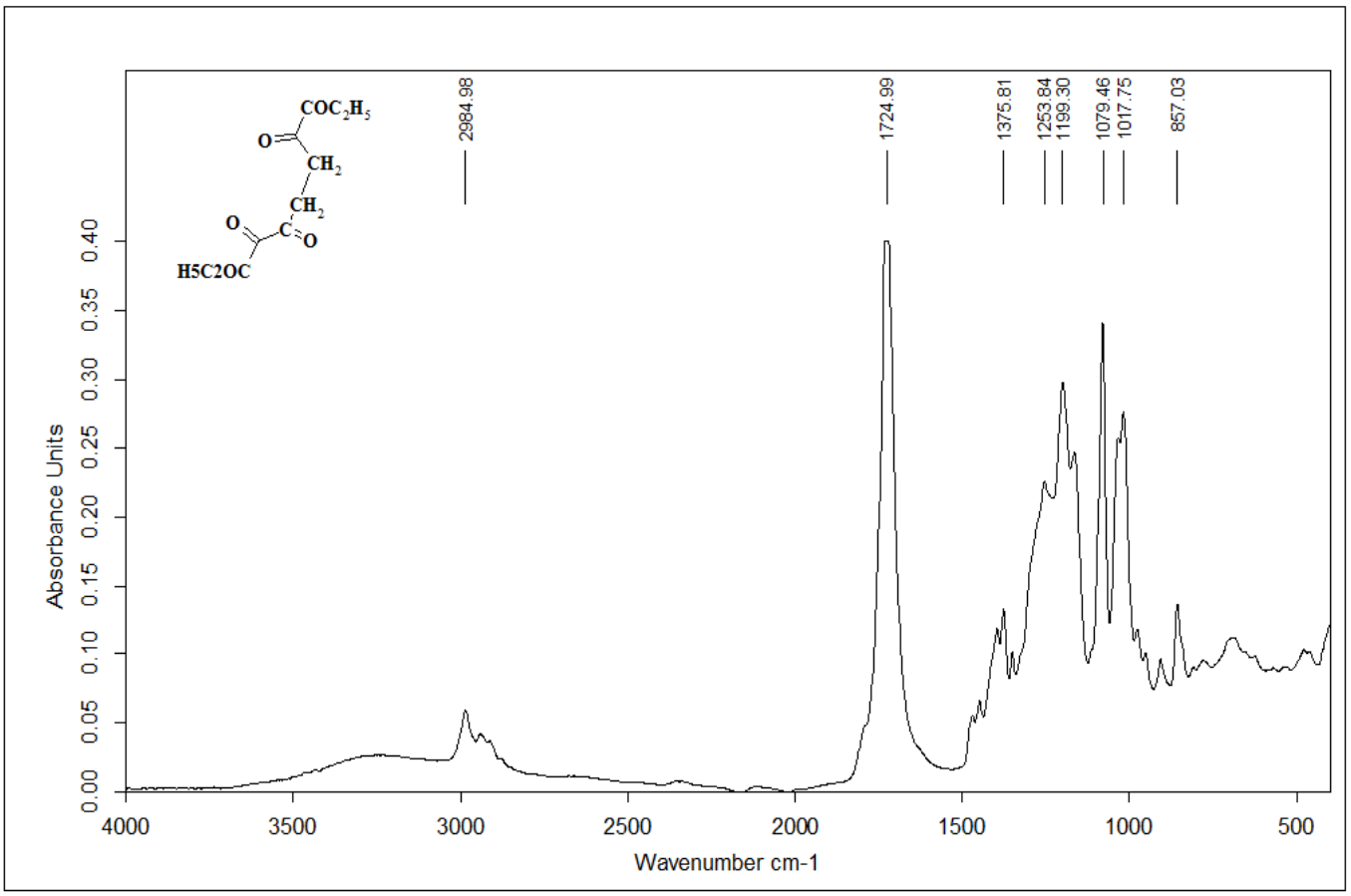


Figure.III.4 : Spectre IR du 2-oxoglutarate de diéthyle.

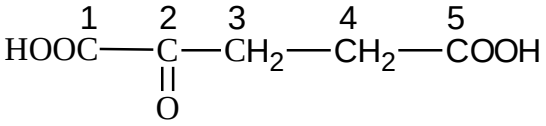
La variation des conditions opératoires (augmentation du temps de réaction, de l'excès de l'alcool correspondant, de la quantité catalytique d'acide et une distillation ménagée) n'améliora en aucun cas ce rendement.

La réaction d'estérification des acides carboxyliques est une réaction équilibrée. L'estérification est limitée par une réaction réversible appelée hydrolyse.

A l'équilibre les quatre constituants (l'acide, l'alcool, l'ester et l'eau) sont présents dans des proportions qui ne varient plus au cours du temps, par suite de l'égalité des vitesses de réaction dans les deux sens.

On peut déplacer l'équilibre dans le sens favorable à la formation de l'ester en utilisant un excès de l'un des réactifs par rapport à l'autre ou en éliminant l'un des produits de la réaction au fur et à mesure de sa formation. La méthode habituelle pour rendre l'estérification complète consiste précisément à éliminer l'eau qui se forme par divers procédés.

Les valeurs des pka de l'acide 2-oxoglutarique ont été déterminées.



Pka_1=2.44 Pka_2=4.90

En comparant l'acidité des deux groupements carboxyles (C_1 et C_5) il apparait une différence considérable de réactivité à l'intérieur de l'acide 2-oxoglutarique.

La différence de la valeur PKa_1 de l'acide oxo glutamique montre clairement l'effet fort attracteur de groupement carbonyle (2-oxo).Il s'ensuit que l'acidité de l'acide 2-oxoglutarique devrait être en fait suffisante pour agir autocatalytiquement sur l'estérification.

En laissant reposer l'acide 2-oxoglutarique dans un grand excès molaire de méthanol pendant un jour à température ambiante ensuite on distille on obtient déjà le 2-oxoglutarate de diméthyle avec un rendement de 50%.

Le problème est cependant l'élimination de l'eau de la réaction car lors d'une estérification avec le méthanol elle ne forme pas de mélange azéotrope. Une solution élégante pour éliminer l'eau de la réaction consiste à ajouter une quantité équimolaire d'acétone diméthyle acétal (2,2-diméthoxypropane). Celui-ci réagit exclusivement avec l'eau pour donner le méthanol et l'acétone.

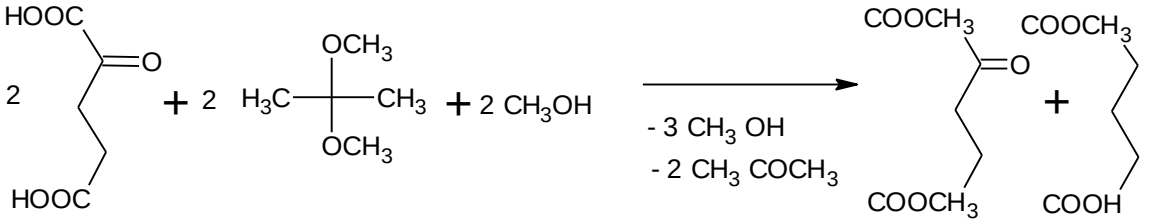


Schéma.III.5 : Mécanisme réactionnel suivie lors de la synthèse du 2-oxoglutarate de diméthyle.

La solution d'acide 2-oxoglutarique dans le méthanol repose à température ambiante pendant cinq jours, au sixième jour seulement une quantité correspondante équimolaire d'acétone diméthyle acétal est ajoutée et l'on distille le lendemain, on obtient le 2-oxoglutarate de diméthyle avec un rendement de 80%.

Le fractionnement du mélange réactionnel dans le vide livre tout d'abord le 2-oxoglutarate de diméthyle et après élévation de la température encore une petite quantité de 2-oxoglutarate de mono méthyle suit. Ceci explique la différence de réactivité des deux groupements acides dans l'acide 2-oxoglutarique, l'attaque nucléophile est portée de préférence sur le groupement carboxyle 1. L'ester mono méthylique peut être transformé en ester diméthylique par le procédé décrit ci-dessus, le rendement total en diméthyle ester peut alors atteindre 95%.

Dans le cas de l'ester éthylique, on laisse le mélange se reposer dans un excès d'éthanol, et on récupère directement l'ester correspondant par distillation fractionné.

Dans notre présent travail nous avons synthétisé l'ester diméthylique et diéthylique de l'acide 2-oxo- glutarique suivant le dernier procédé décrit ci-dessus.

Malheureusement nous n'avons pas pu reproduire les excellents rendements précités en haut, car lors du fractionnement du produit estérifié brut, une importante partie s'est décomposée à cause du faible vide (260 mm d'Hg) réalisé par la pompe à vide du laboratoire.

Les excellents rendements cité plus haut ont été réalisés par un fractionnement sous vide de 400 mm de mercure ce qui a considérablement abaissé le point d'ébullition de l'ester diméthylique.

III.2.Synthèse des hydrazones :

III.2.1.Synthèse de 4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate d'alkyles :

III.2.1.1.Synthèse de 4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle :

La synthèse de 4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle se produit d'après la réaction bien connue de condensation du groupement carbonyle avec le groupement amino selon un mécanisme en 2 étapes (addition/ élimination) (schéma III.6).

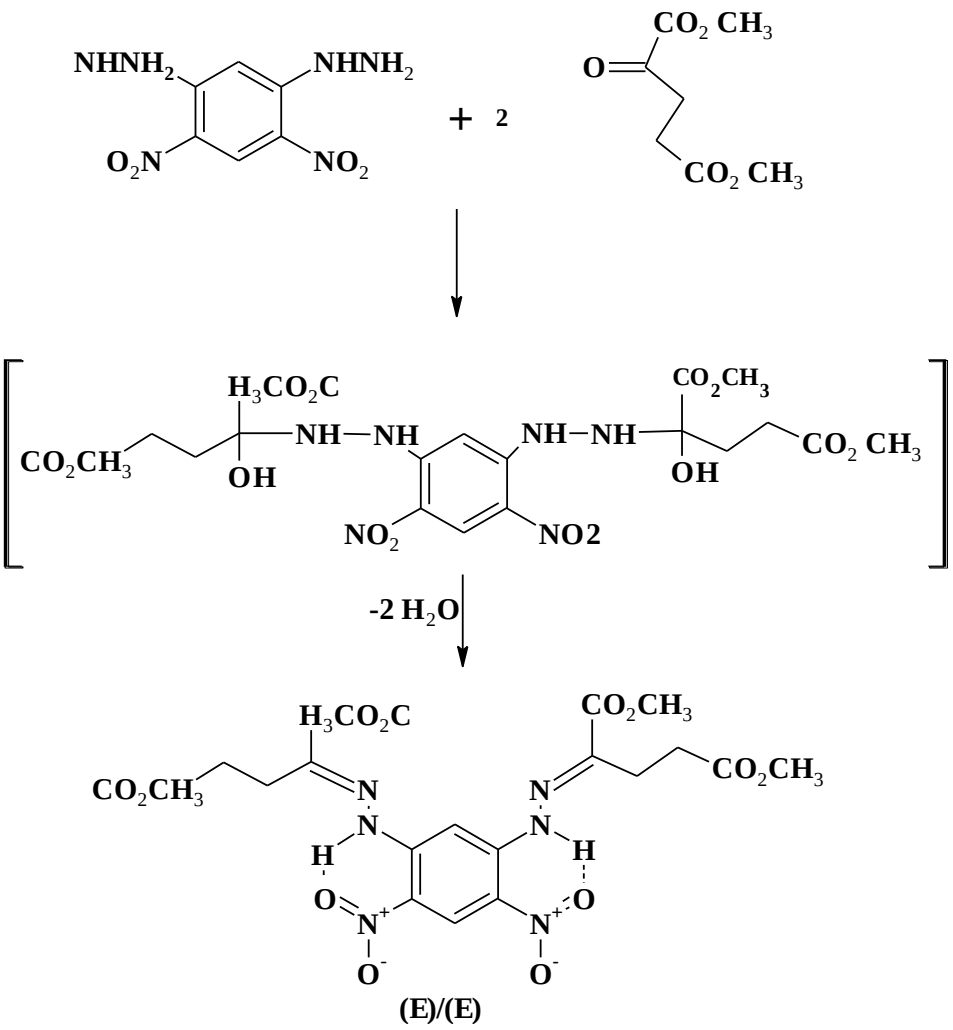


Schéma.III.6 : Mécanisme réactionnel de synthèse des isomères (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle.

Dans un premier temps il se forme un produit d'addition mais celui-ci instable évolue vers l'hydrazone indiqué .Cette réaction se déroule à température ambiante.

A une solution alcoolique de 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène est ajoutée sous agitation une solution de 2-oxoglutarate de diméthyle dans le méthanol.

Après l'ajout total de la solution et agitation pendant deux heures, le 4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle se précipite sous forme d'un produit solide.

A travers la formation de la double liaison C=N le 4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diméthyle peut exister sous diastéréoisomeres : la forme (E)/(E) .A température ambiante dans le méthanol il se forme exclusivement l'isomère (E)/(E). En traitant ce dernier dans le méthanol, ou mieux encore dans l'éther.

Le spectre IR montre la présence d'un seul mode vibrationnel d'élongation du lien NH vers 3234,96 cm^{-1}, à 1724,33 cm^{-1} de fortes bandes d'absorptions d'élongation caractéristique de l'ester (RCOOR), et montre aussi une bande d'élongations caractéristique de l'absorption (CN) à 1236,92 cm^{-1}ainsi l'absorption du groupement nitro (NO_2) vers 1574,22 cm^{-1} (figure III.5).

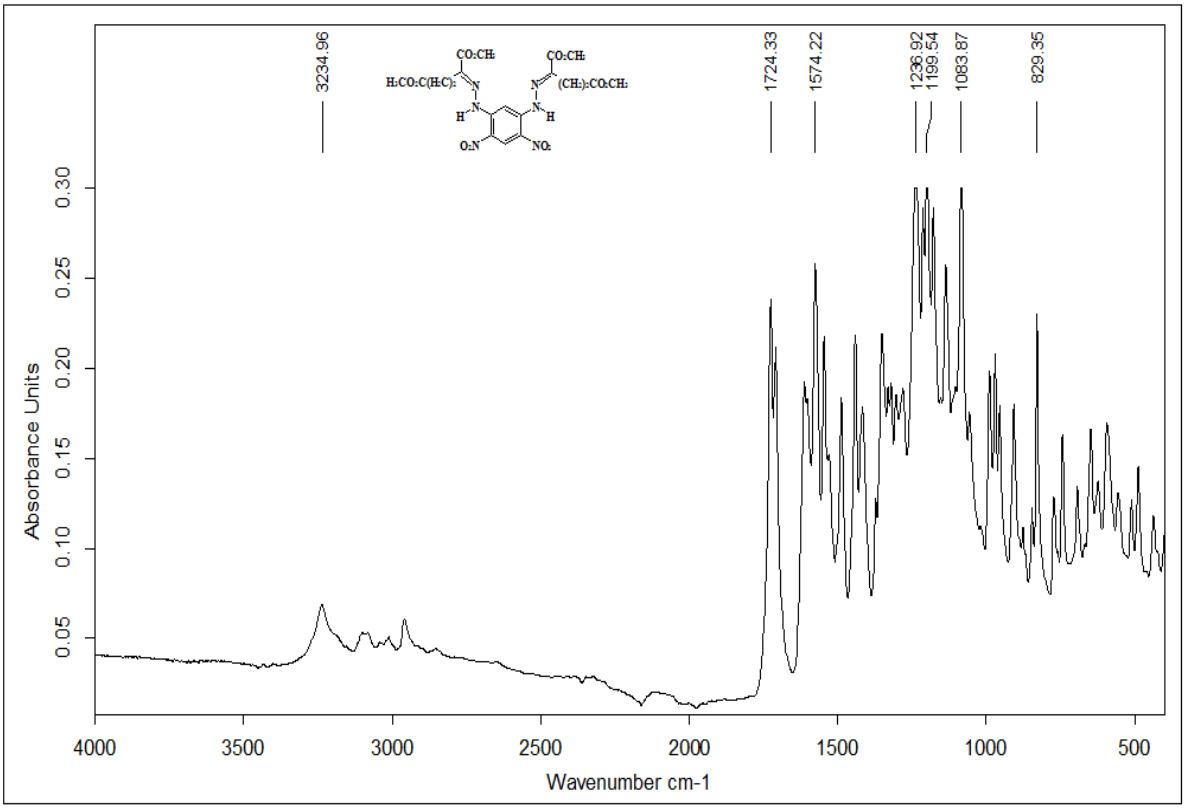
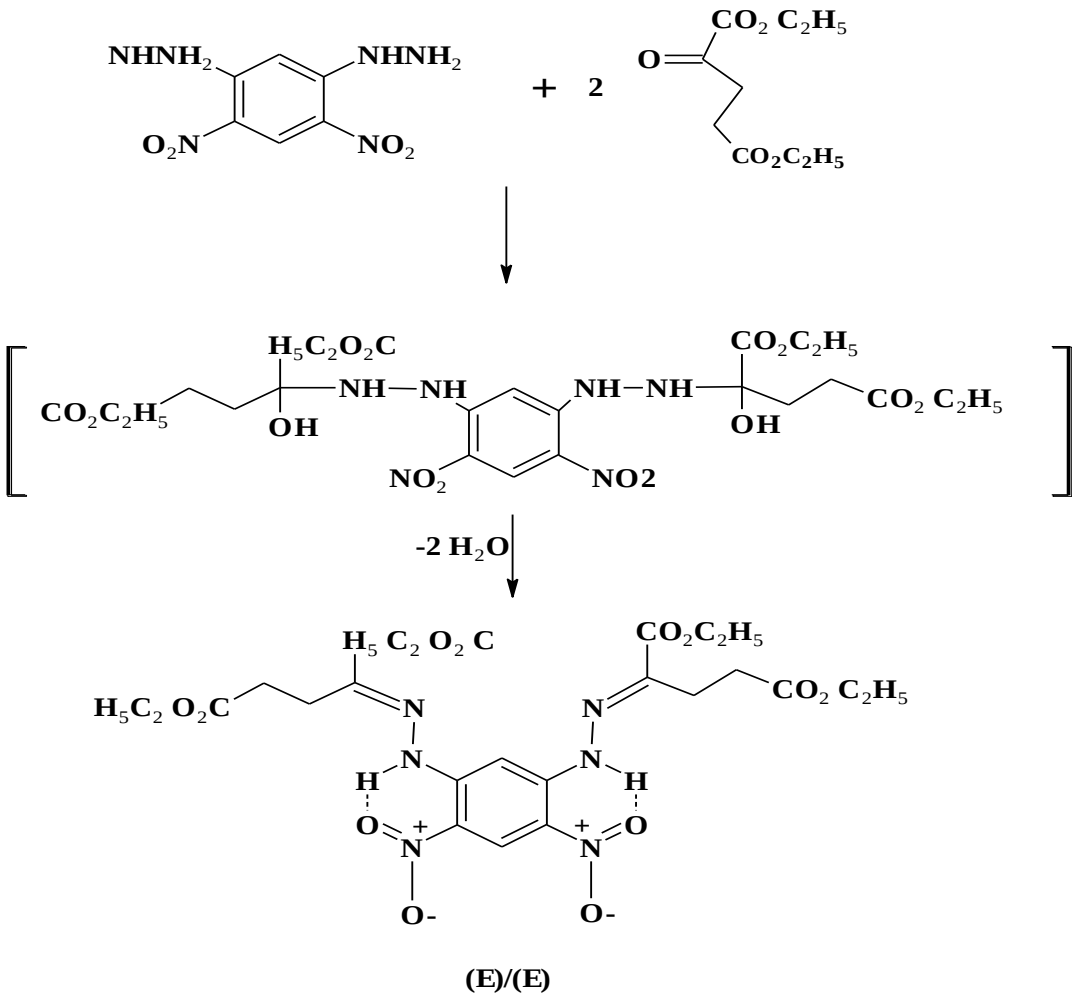


Figure.III.5 : Spectre IR du (E) / (E) 4,6-dinitrophénylen-1,3dihydrazono glutarate de diméthyle.

III.2.1.2.Synthèse de 4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle :

La synthèse de 4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle se fait d'après la même réaction décrit précédemment selon un mécanisme en 2 étapes (addition/ élimination) (schéma III.7).



(E)/(E)

Schéma.III.7 : Mécanisme réactionnel de synthèse des isomères (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle.

Dans un premier temps il se forme un produit d'addition mais celui-ci instable évolue vers l'hydrazone indiqué .Cette réaction se déroule à température ambiante.

A une solution alcoolique de 1,3-dihydrazino-4,6-dinitrobenzène est ajoutée, sous agitation, une solution de 2-oxoglutarate de diéthyle dans l'éthanol. Après l'ajout total de la solution et agitation pendant deux heures, le 4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle se précipite sous forme d'un produit solide.

A travers la formation de la double liaison C=N le 4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate de diéthyle peut, comme dans le cas du 2-nitrophénylhydrazono glutarate de de diéthyle, exister sous diastéréoisoméres de la forme (E)/(E).

A température ambiante dans l'éthanol, il se forme exclusivement l'isomère (E)/(E). En traitant ce dernier dans l'éthanol, ou mieux encore dans l'éther.

Le spectre IR montre la présence d'un seul mode vibrationnel d'élongation du lien NH vers 2980,71 cm^{-1} à 1728,09 cm^{-1} de fortes bandes d'absorptions d'élongation caractéristique de l'ester (RCOOR), et montre aussi une bande d'élongations caractéristique de l'absorption (CN) à 1210,94 cm^{-1}, ainsi l'absorption du groupement nitro (NO_2) vers 1564,07 cm^{-1} (figure III.6).

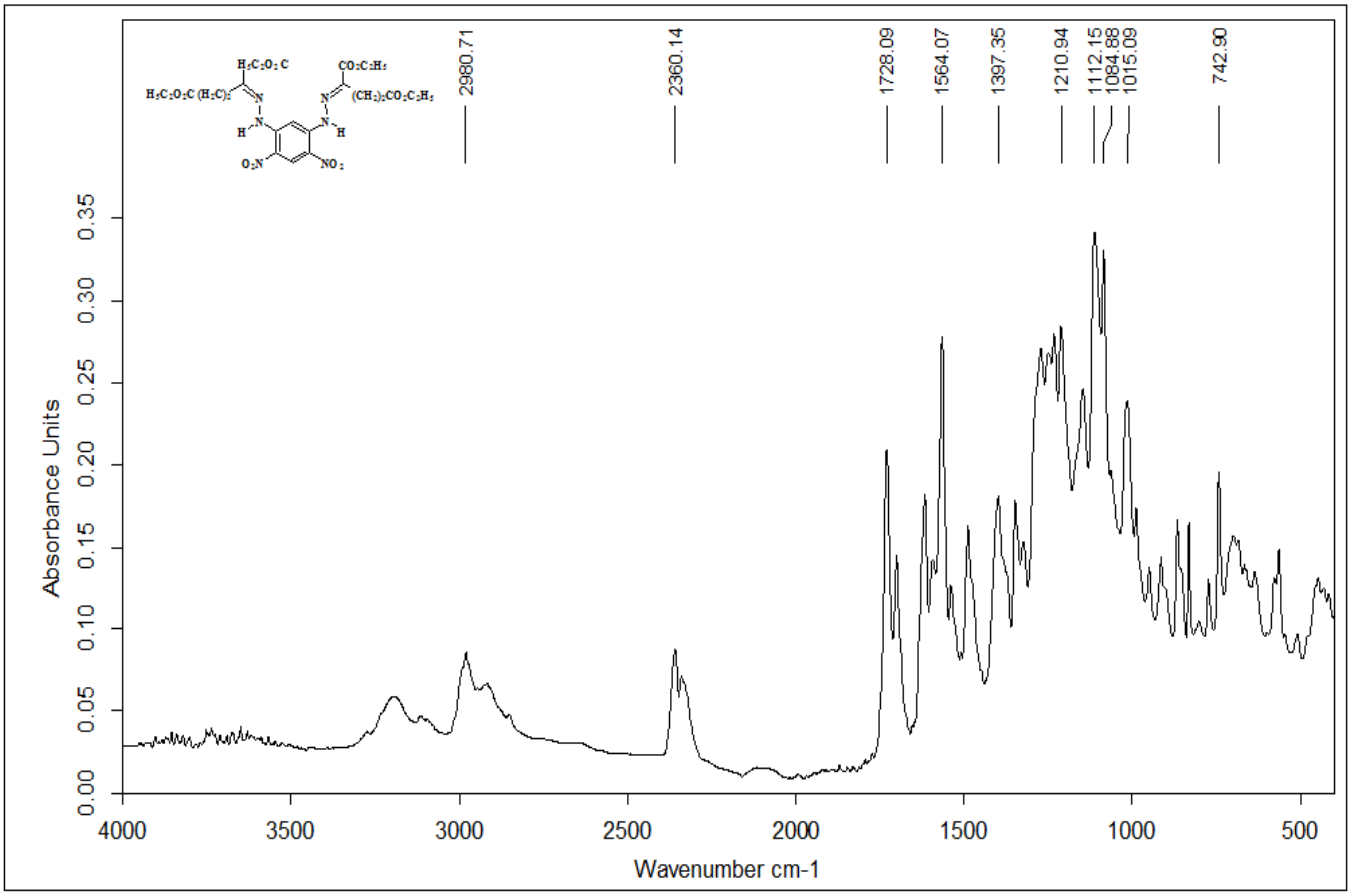


Figure.III.6 : Spectre IR du (E)/(E) 4,6-dinitrophénylen-1,3dihydrazono glutarate de diéthyle.

III.3. Réductions :

Après la synthèse des composés de départ ; on a opté à faire des réductions sur les différentes méthodes afin d'avoir des composées cyclisés par le dithionite de sodium.

III.3.1.Réduction de (E)/(E) 4,6-dinitrophényl -1,3-dihydrazono oxoglutarate d'alkyle par le dithionite de sodium :

III.3.1.1.Réduction de (E)/(E) 4,6-dinitrophényl -1,3-dihydrazono oxoglutarate de diméthyle.

En principe deux possibilités de cyclisation réductive pourraient avoir lieu par réduction de 4,6-dinitrophénylen -1,3-dihydrazono glutarate de diméthyle**.** Après réduction des deux groupements nitro aux groupements amino, des additions nucléophiles sur les atomes de carbone des deux liaisons azométhine N=C devrait mener au dérivé [1, 2,4] triazino [5,6-g] [1, 2,4] benzotriazine (schéma III.8).

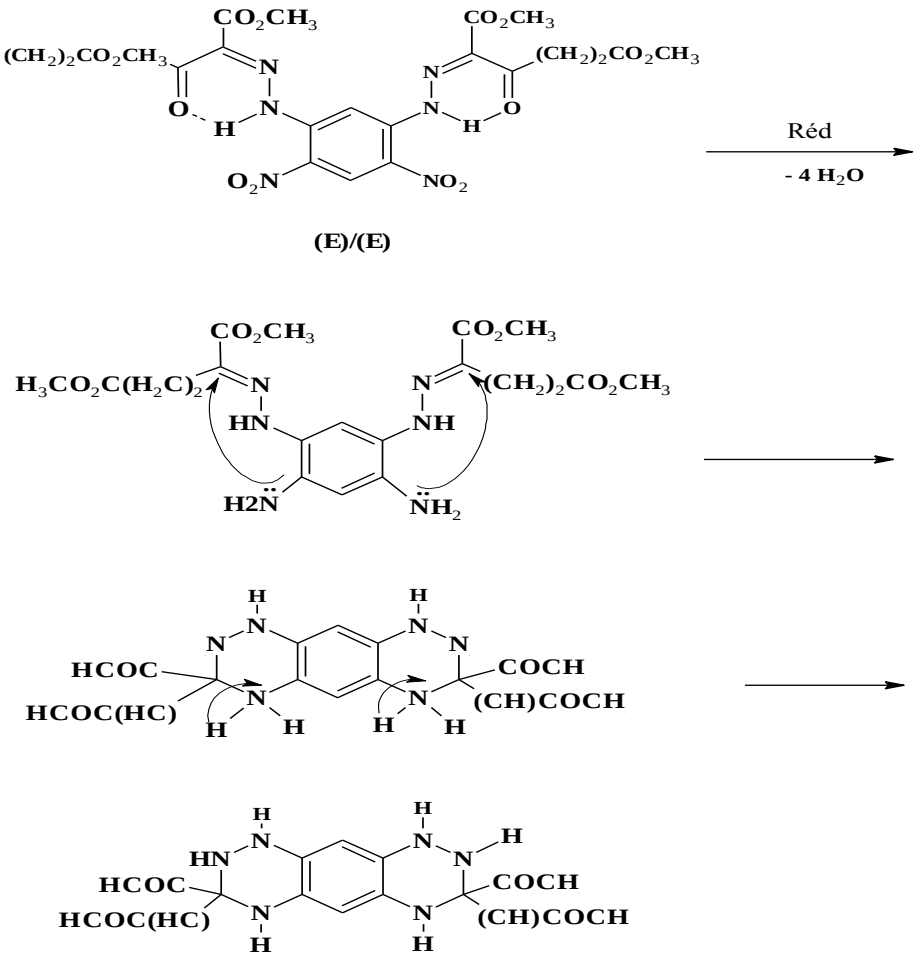


Schéma.III.8 : 1[ér] Mécanisme réactionnel de la cyclisation réductive éventuelle de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diméthyle.

De même la réduction des groupements nitro, attracteurs d'électrons, aux groupements amino, donneurs d'électrons, le noyau benzénique s'enrichit en densité électronique. de ce fait les doublets libres sur les atomes d'azotes NH seront plus disponibles et il s'ensuivrait une attaque nucléophile sur les atomes de carbone 5 avec élimination de méthanol mènerait a une première cyclisation aux dérivés pyridazines. En suite une attaque nucléophile des groupements amino sur les carbonyles se trouvant en position favorable des hétérocycles formés, mènerait, avec élimination d'eau, au dérivé illustré (schéma III.9).

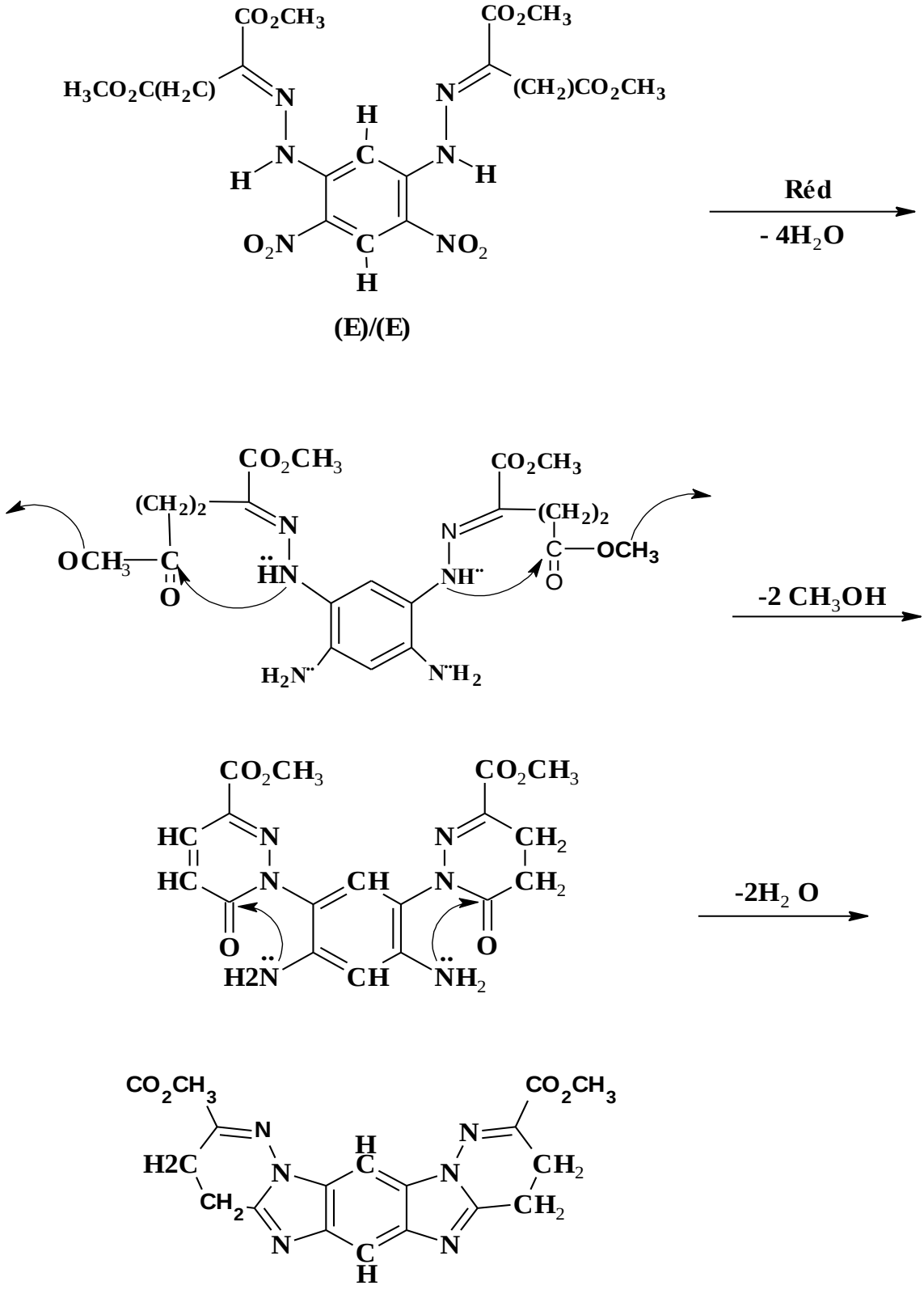


Schéma.III.9 : 2éme Mécanisme réactionnel de la cyclisation réductive éventuelle de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazonoglutarate diméthyle.

A cet effet le (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diméthyle est dissous, dans le méthanol et porté sous reflux et auquel une solution aqueuse de dithionite de sodium est égouttée. Après le chauffage pendant deux heures, ensuite refroidissement à température ambiante et finalement dilution avec de l'eau nous avons isolé un produit solide jaune.

Le spectre IR montre les absorptions caractéristiques du groupement carbonyle pour les groupements esters à 1708,86 cm^{-1} ainsi qu'une disparition des bandes caractéristiques des groupements NO_2 et montre aussi des bandes d'élongations caractéristique de l'absorption (CN) à 1104,97 cm^{-1} (figure III.7).

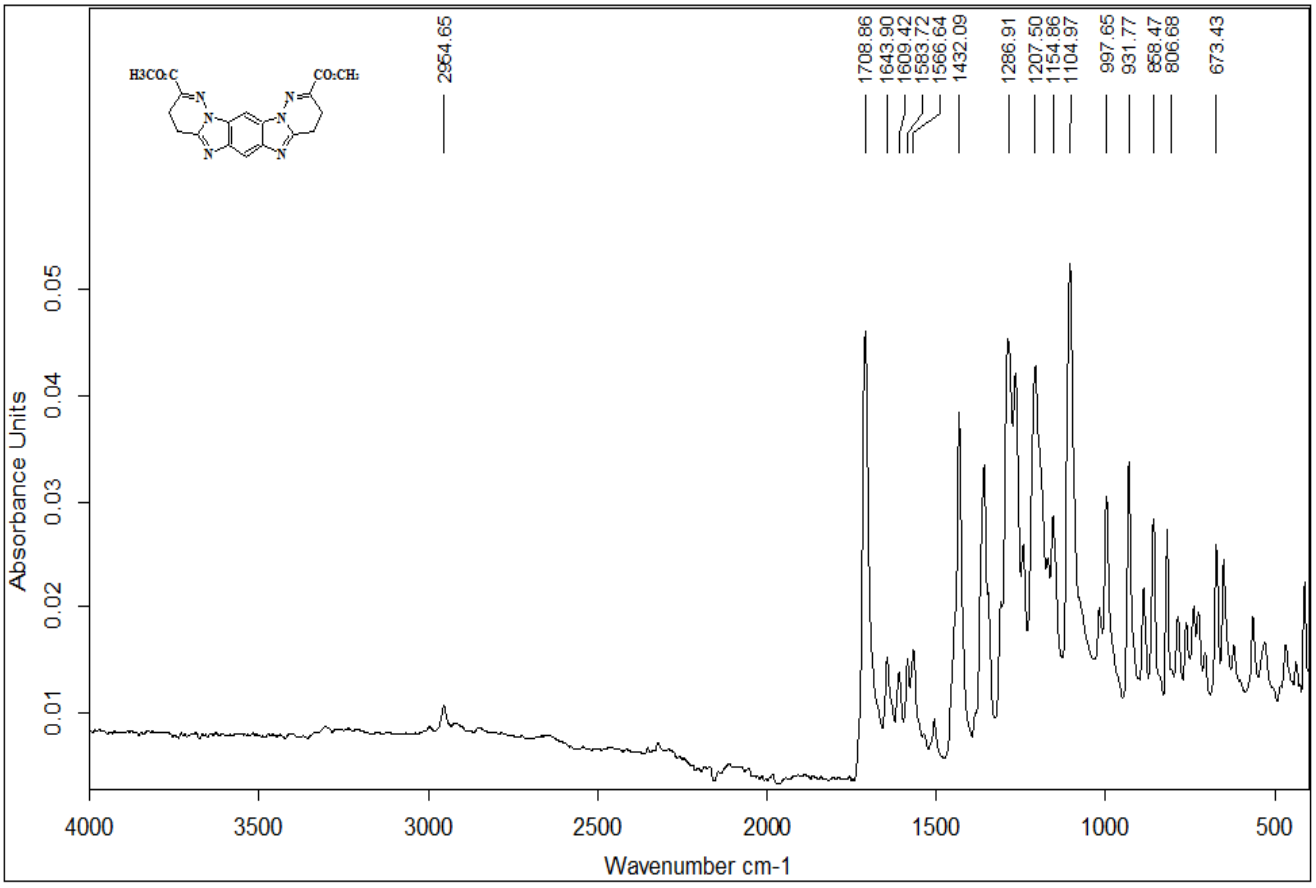


Figure.III.7 : Spectre IR de du composé de réduction de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate diméthyle avec le dithionite de sodium.

Le spectres ^{1}H-RMN pris dans le $CDCl_3$, montrent les signaux pour les groupements méthoxy entre 3,86 et 4,05ppm (deux singlets). Les groupements méthylènes apparaissent entre 3,05 et 3,35 ppm, pour Les protons aromatiques se trouvent entre 7,9 et 8,06 ppm (figure III.8).

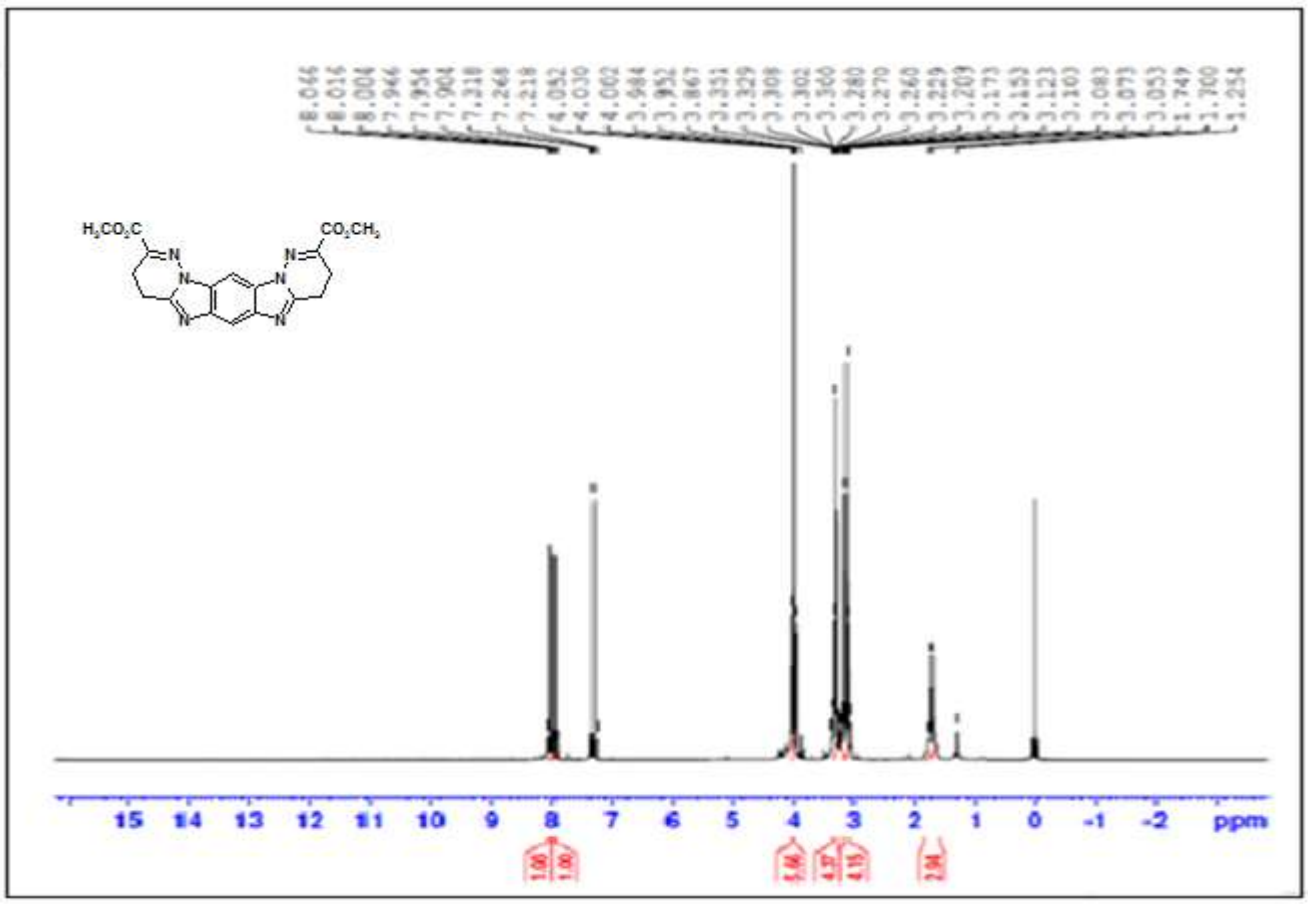


Figure.III.8 : Spectre ^{1}H-RMN du composé de réduction de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate diméthyle avec le dithionite de sodium.

Le spectre ^{13}C-RMN pris dans $CDCl_3$ montre 10 pics. Ceux-ci sont situés, entre 19,58 et 21,25 ppm (CH_2) ; 53,04 ppm (OCH_3) ; entre 90,62 et 139.41 ppm (C_{arom}) ; 163,56 ppm (CO_2) ; et entre 144,13 et 174,20 ppm (N=C) (figures III.9).

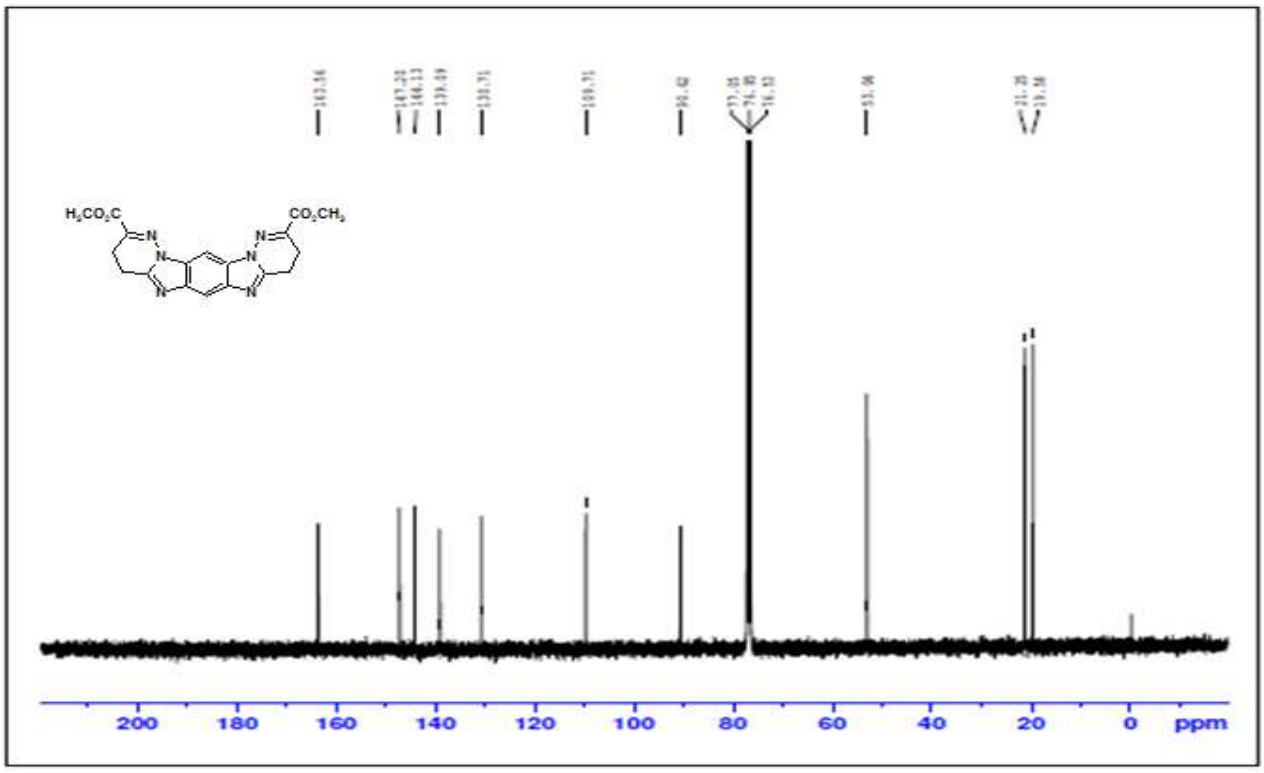


Figure.III.9 : Spectre ^{13}C-RMN du composé de réduction de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diméthyle avec le dithionite de sodium.

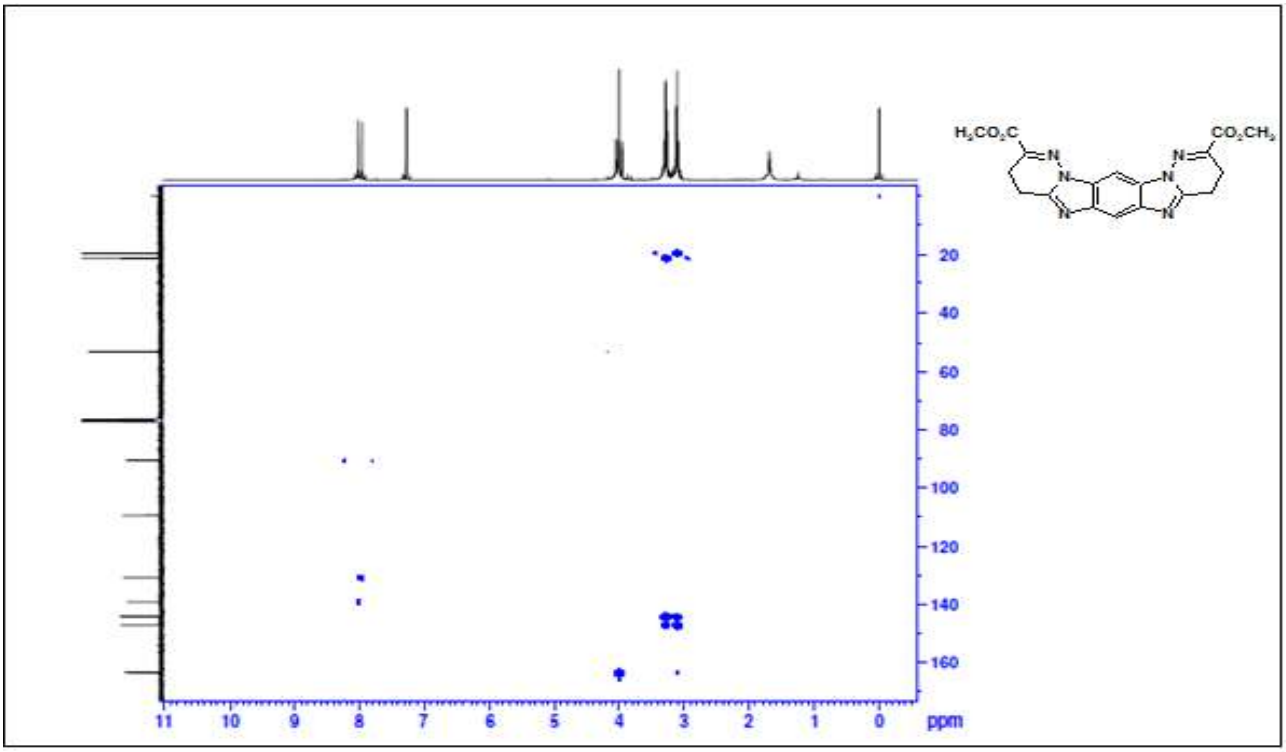


Figure.III.10 : Spectre HMBC-RMN du composé de réduction de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diméthyle avec le dithionite de sodium.

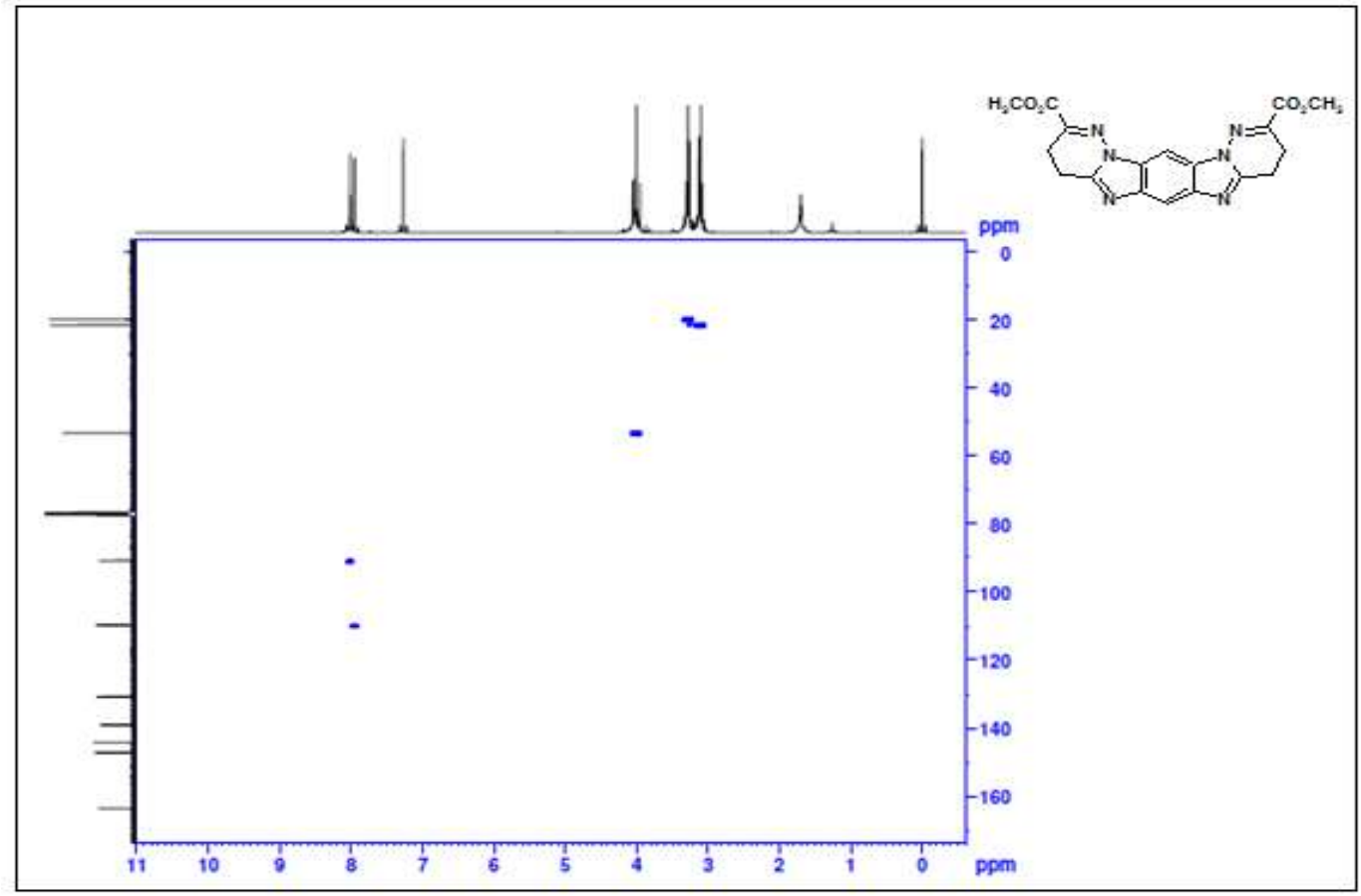
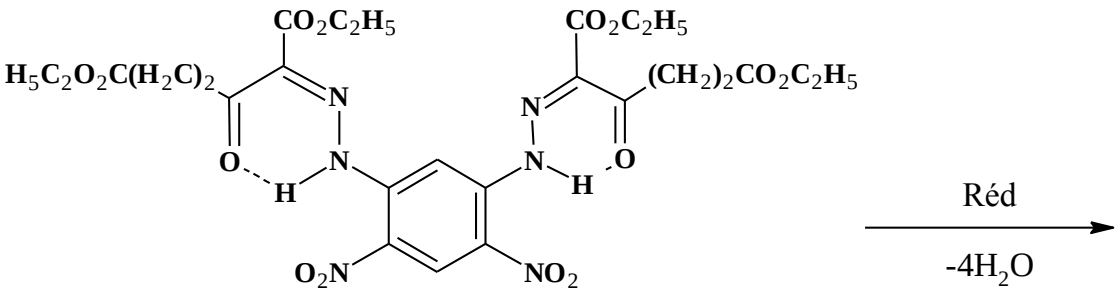


Figure.III.11 : Spectre HSQC-RMN du composé de réduction de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diméthyle avec le dithionite de sodium.

III.3.1.2. Réduction de (E) /(E) -4,6-dinitrophénylen-1,3dihydrazono glutarate de diéthyle :

De la même façon l'isomère (E) /(E) -4,6-dinitrophénylen-1,3dihydrazono glutarate de diéthyle peut avoir deux possibilités de cyclisation : La première est illustrée sur le (schéma III.10).



(E)/(E)

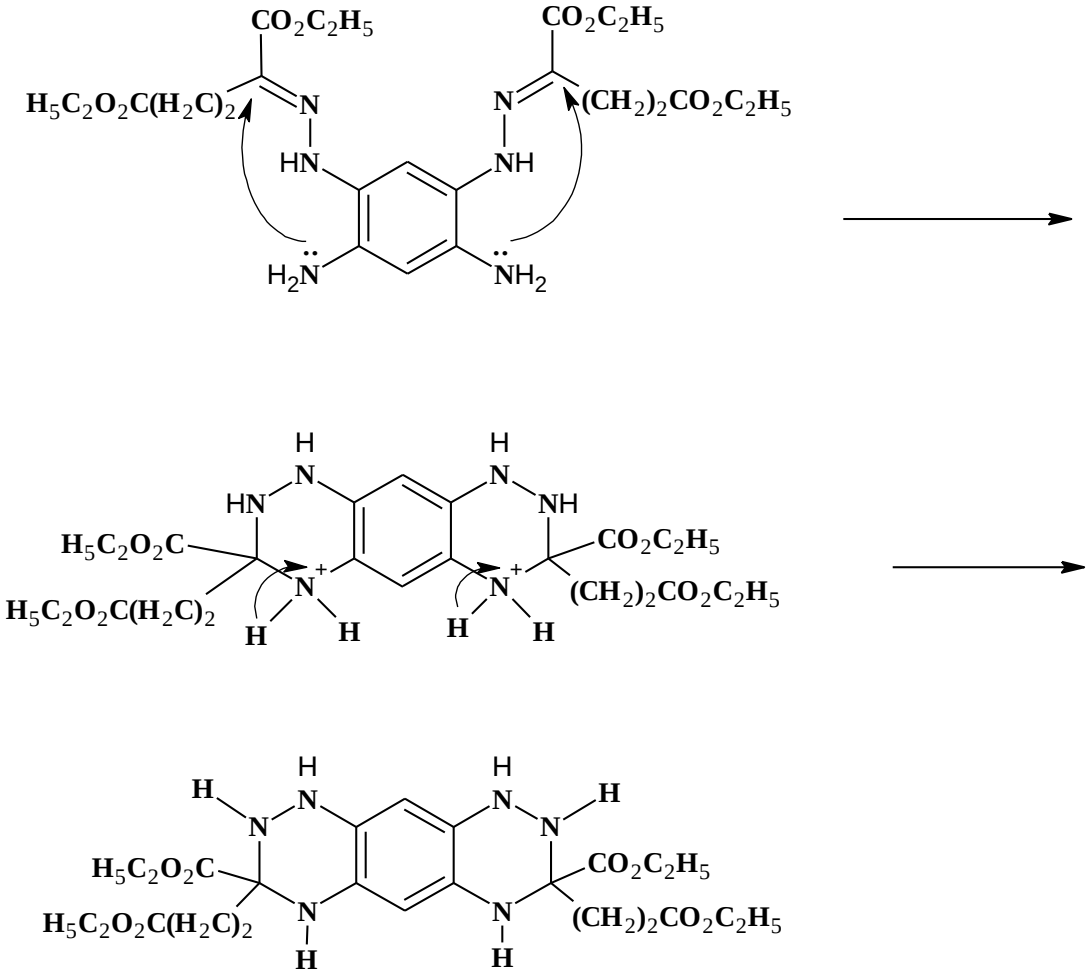


Schéma.III.10 : 1[ér] Mécanisme réactionnel de la cyclisation réductive éventuelle de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle.

De même la réduction des groupements nitro, attracteurs d'électrons, aux groupements amino, donneurs d'électrons, le noyau benzénique s'enrichit en densité électronique. De ce fait les doublets libres sur les atomes d'azotes NH seront plus disponibles et il s'ensuivrait une attaque nucléophile sur les atomes de carbone 5 avec élimination de l'éthanol mènerait a une première cyclisation aux dérivés pyridazines. Ensuit une attaque nucléophile des groupements amino sur les carbonyles se trouvant en position favorable des hétérocycles formés, mènerait, avec élimination d'eau, au dérivé estompé (schéma .III.11).

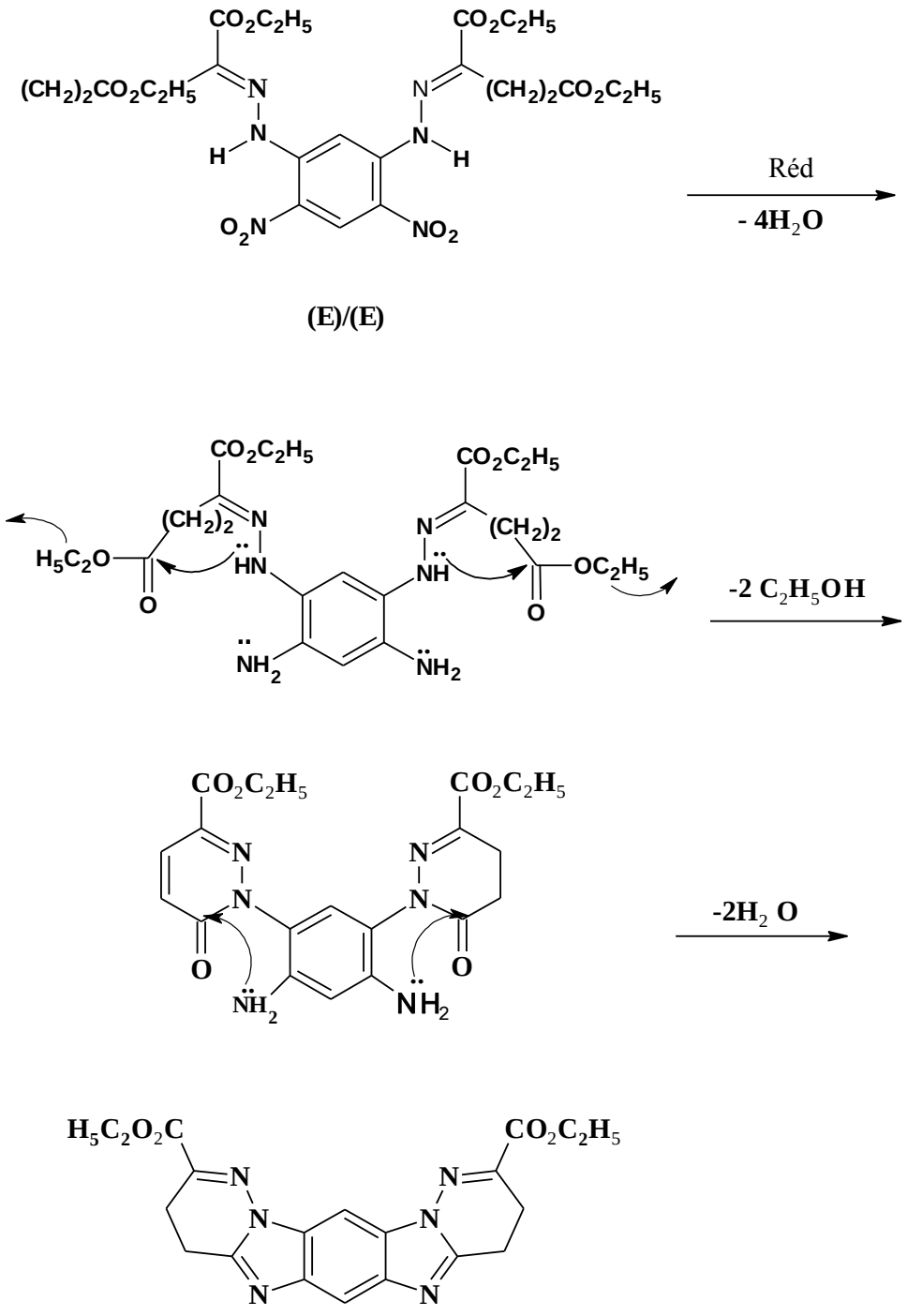


Schéma.III.11 : 2éme Mécanisme réactionnel de la cyclisation réductive éventuelle de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle.

.

Donc le (E)/(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle est dissous, dans l'éthanol et porté sous reflux et auquel une solution aqueuse de dithionite est égouttée. Après le chauffage pendant deux heures suivies d'un refroidissement à température ambiante et finalement dilution avec de l'eau nous avons isolé un produit solide.

Le spectre IR montre les absorptions caractéristiques du groupement carbonyle pour les groupements esters à 1708,91cm^{-1} ainsi qu'une disparition des bandes caractéristiques des groupements NO_2 et montre aussi des bandes d'élongations caractéristique de l'absorption (CN) à 1104,93 cm^{-1} (figure III.12).

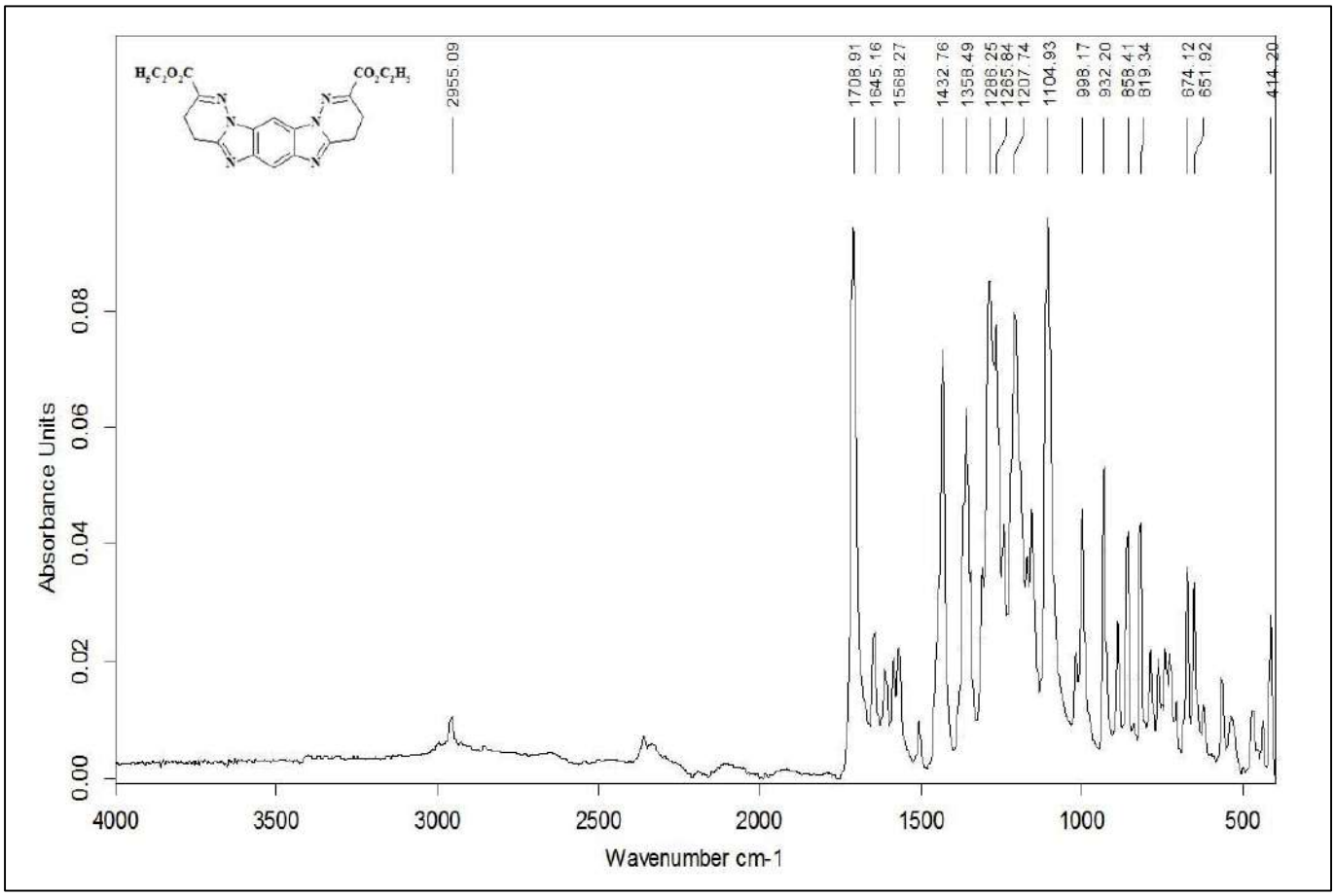


Figure.III.12 : Spectre IR de du composé de réduction de (E) /(E)-4,6-dinitrophénylen-1,3-dihydrazono glutarate de diéthyle.

III.4.Synthése de (E) - 2,4-nitrophénylehydrazono glutarate de diméthyle :

La réaction de 2,4 dinitrophénylehydrazono glutarate de diméthyle se déroule d'après la réaction bien connue de condensation du groupement carbonyle d'après un mécanisme en deux étapes (addition / élimination).

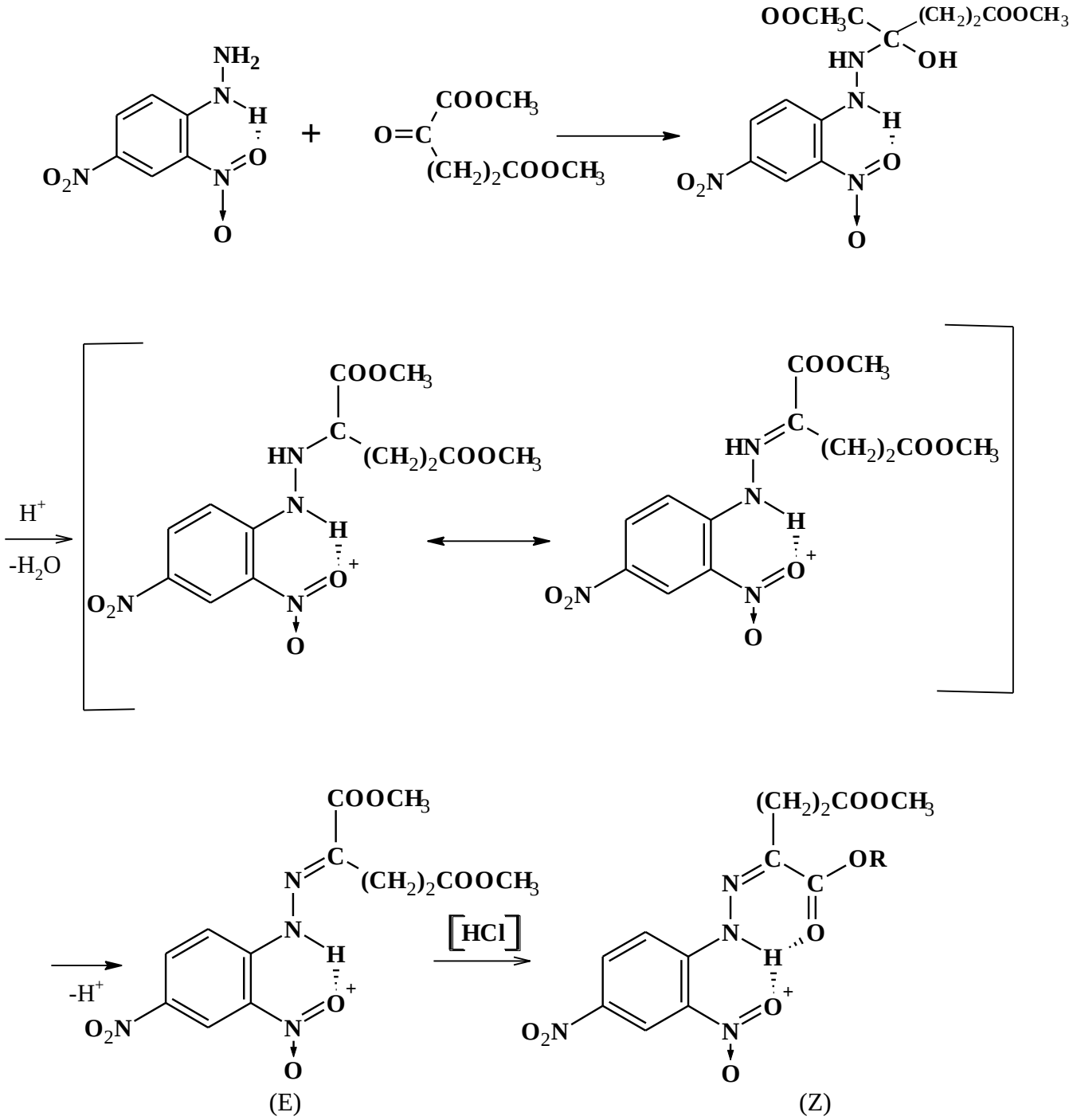


Schéma.III.12 : 1[ér] Mécanisme réactionnel de la cyclisation réductive éventuelle de (E) - 2,4-nitrophénylehydrazono glutarate de diméthyle.

Dans un premier temps il se forme un produit d'addition mais celui-ci instable évolue vers l'hydrazone indiqué. Cette réactoin se déroule à température ambiante.

A une solution alcoolique des dérivés de 2-nitrophénylhydrazine nous avons égoutté, sous agitation et à température ambiante, une solutoin de2-oxoglutarate de dialkyle dans l'alcool correspondant. Après ajout totale de la solution et agitation pendant quelques minutes des précipités se sont formés que nous avons filtrés et recristallisés dans le méthanol respectivement dans l'éthanol.

A cause de la double liaison C=N ces hydrazines peuvent se former en deux diastéréoisoméres (E) et (Z).La formation exclusive de l'un ou de l'autre diastéréoisoméres dépondent des conditions de la réactoin.

A température ambiante sans ajout d'une quantité catalytique d'acide acétique ou chlorhydrique il se forme exclusivement l'isomère (E). En présence d'une quantité catalytique d'acide il se forme soit l'isomère (E) soit un mélange d'isomères (E) /(Z).

Tout dépend de la quantité d'acide ajoutée afin d'éviter toute équivoque nous avons synthétisé des isomères (E) pures. Ceux-ci s'isomèrisent facilement et totalement en isomères (Z) par traitement dans l'éther diethylique en présence d'acide chlorhydrique concentré.

Ces diastéréoisoméres (E) et (Z) se différencient par leur point de fusion et leur facteur de rétention (Figure III.13), et par la position de leurs signaux (NH) dans les spectres ^{1}H -RMN.

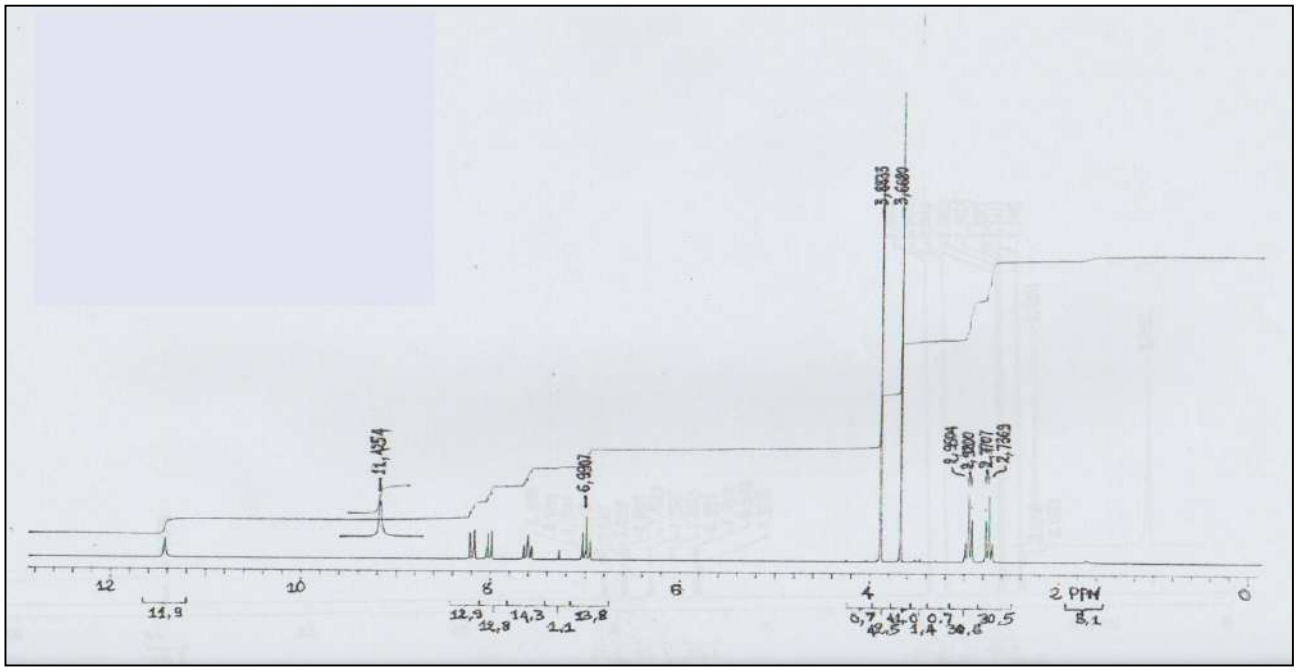


Figure.III.13. Spectre ^{1}H-RMN de (E)-2,4- dinitrophénylehydrazono glutarate de diméthyle.

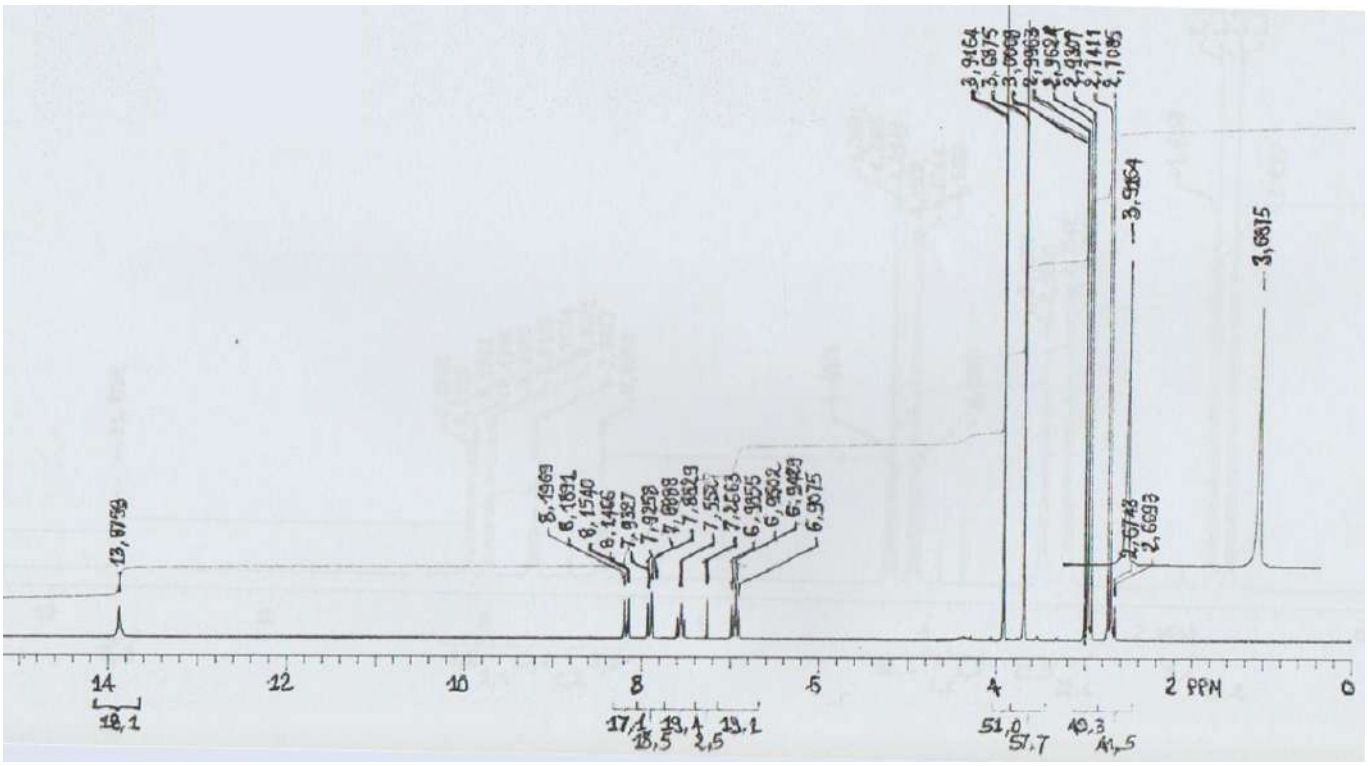


Figure III.14 : Spectre ^{1}H-RMN de (Z)-2,4- dinitrophénylehdrazonoglutarate de diméthyle.

Le spectre IR montre des bandes d'absorption caractéristiques de groupement carbonyle à 1725 cm^{-1} ; celle des groupements nitro à 1504 et 1581 cm^{-1} et celui de groupement NH à 3302 cm^{-1}.

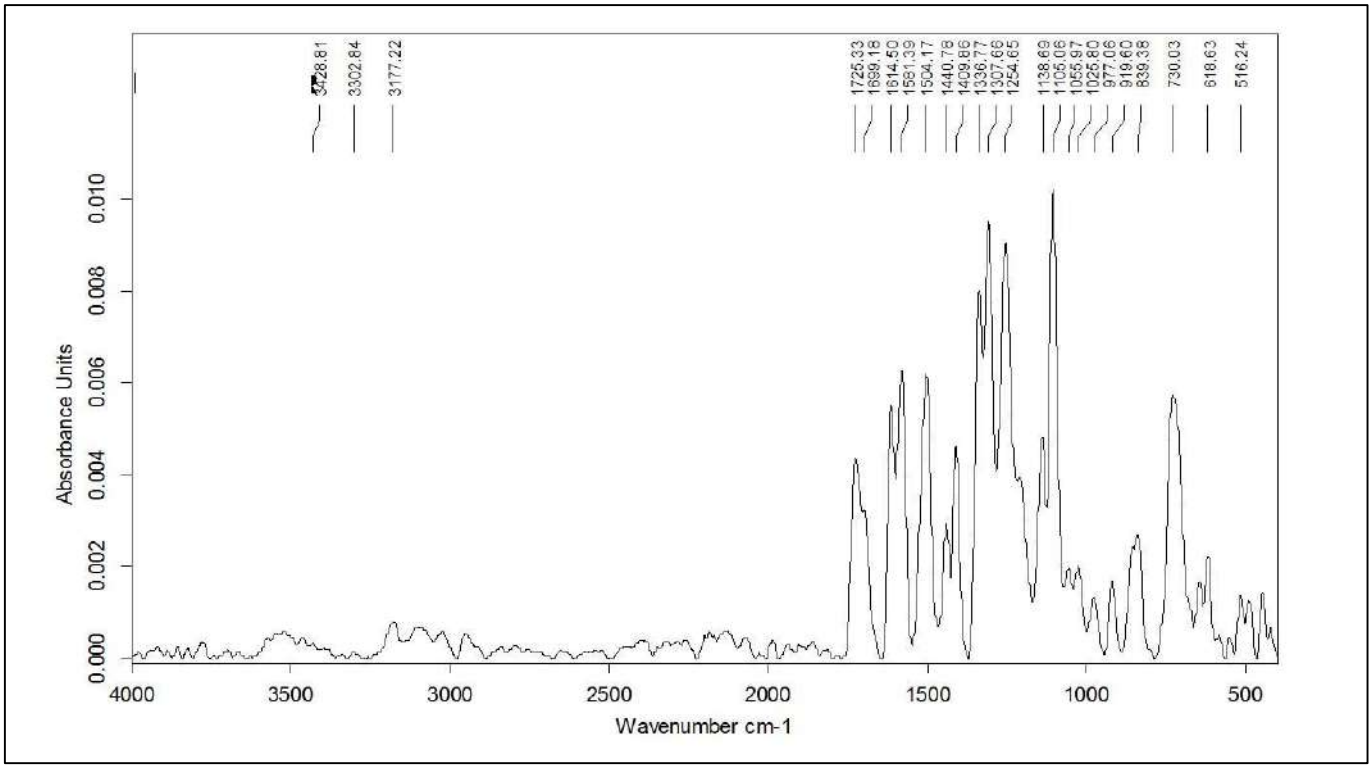


Figure III.15 : Spectre IR de (Z)-2,4- dinitrophénylehdrazonoglutarate de diméthyle.

III.5.Synthése de dérivé 1,2- diazépine :

Le (Z)-2-dinitrophénylhydrazono glutarate de diméthyle est mélangés avec un excès d'hydrazine monohydrate dans le méthanol absolu et portés à l'ébullition sous reflux et sous agitation jusqu'à formation de précipités, environ 2 heures .Après filtration à chaud nous avons obtenu des produits purs avec des points de fusion différents.

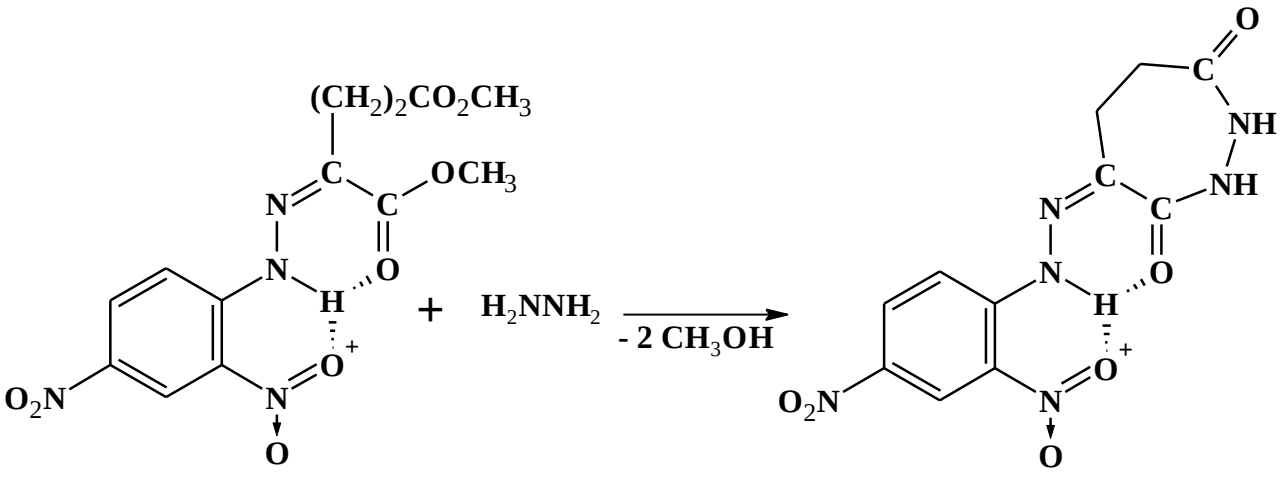


Schéma .III.13 : Mécanisme réactionnel de dérivé 1,2- diazépine.

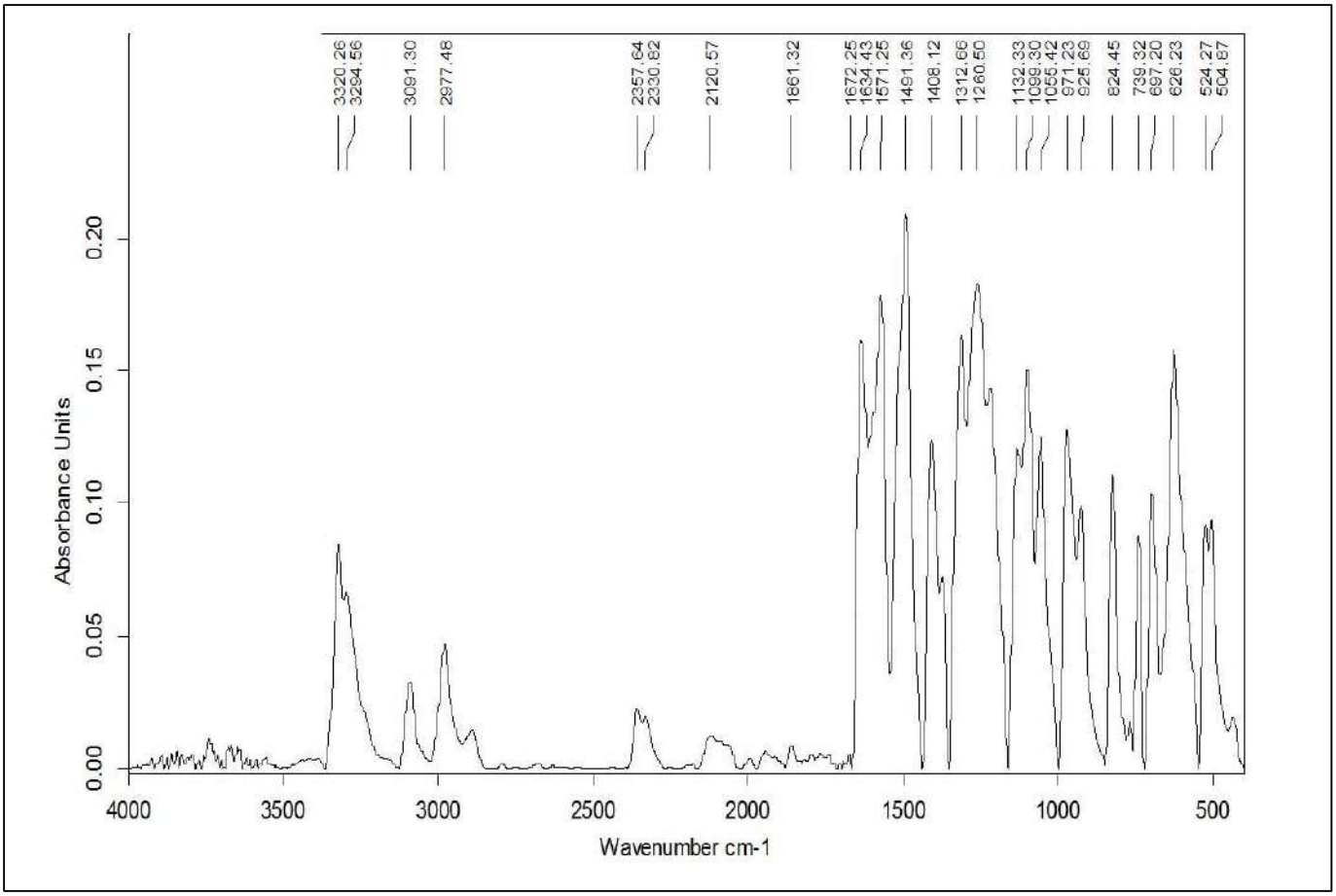


Figure III.16 : Spectre IR de dérivé 1,2- diazépine.

Le spectre IR montre à 3294 et 3320cm^{-1} les bandes d'absorption caractéristiques de (NH).

Ainsi qu'au 1672 cm^{-1} apparaisse la bande d'absorption caractéristique de (NCO lactame). La bande caractéristique du groupement (NO_2) apparaisse à 1491,36cm^{-1}.

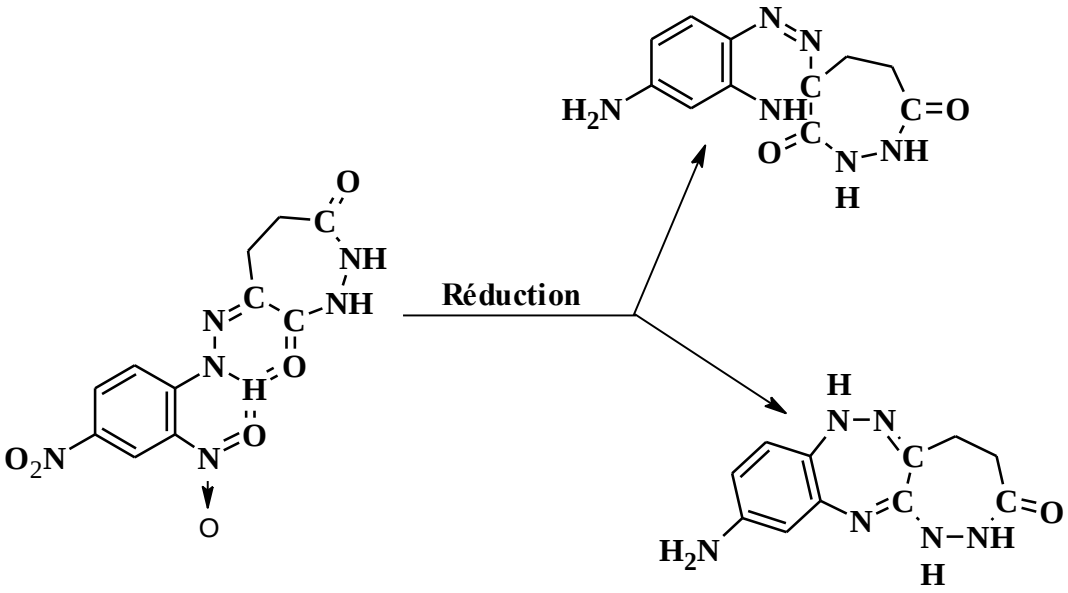
Les bandes d'absorptions caractéristiques de l'ester méthylique ($RCOOCH_3$) ont disparu.

Donc d'après le spectre IR il y a bien eu une cyclisation menant aux dérivés 1,2-diazépine.

III.6. réduction de dérivé 1,2- diazépine :

III.6.1. Réduction de 4-[(2,4-dinitrophényl)-hydrazono]-[1,2] diazépane-3,7-dione :

En principe par réduction des composés deux possibilités de cyclisation réductive sont envisageables (Schéma.III.14).



Shéma.III.14 : possibilité de cyclisation réductive.

Après la réduction groupement nitro au ou groupement amino, une addition nucléophile de ce dernier sur l'atome de carbone de la double liaison C=N devrait mener au dérivés spiro [1, 2,4-benzotriazine-3,4' [1,2] diazépine] (Schéma.III.15).

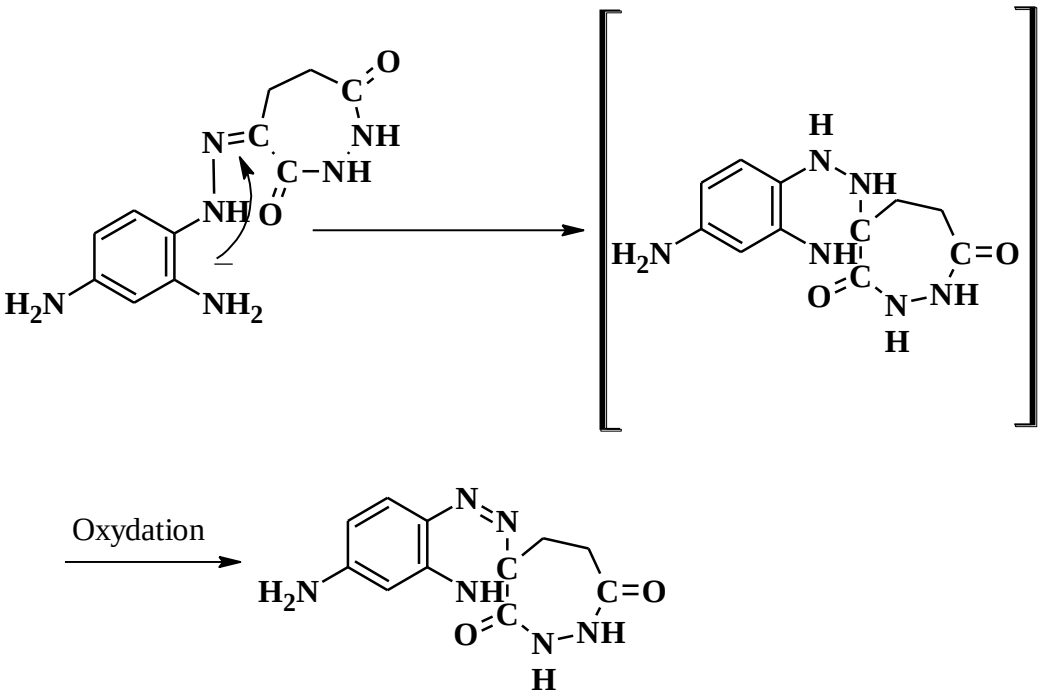


Schéma.III.15 : Première possibilité de cyclisation.

Le groupement amino pourrait aussi se condenser avec le groupement (C=O) se trouvent en position stérique favorable et mener au dérivé 1,2-diazépino [4,3-c] [1, 2,5] benzotriazépine **B (**Schéma.III.16).

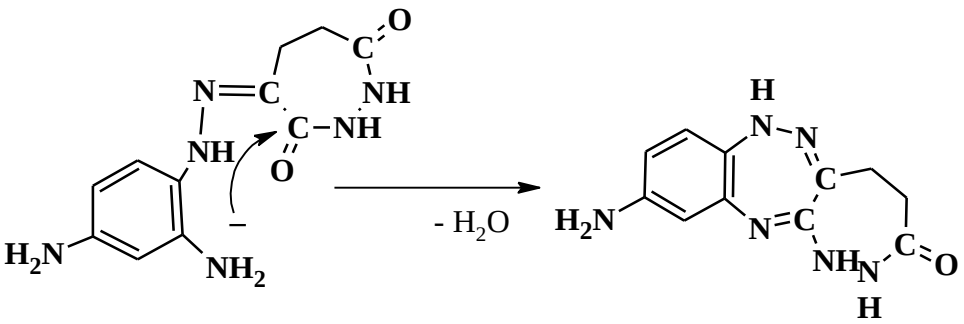


Schéma.III.16 : deuxième possibilité de cyclisation.

Ces hétérocycles qui devraient avoir une activité biologique ne sont pas encore décrits dans la littérature.

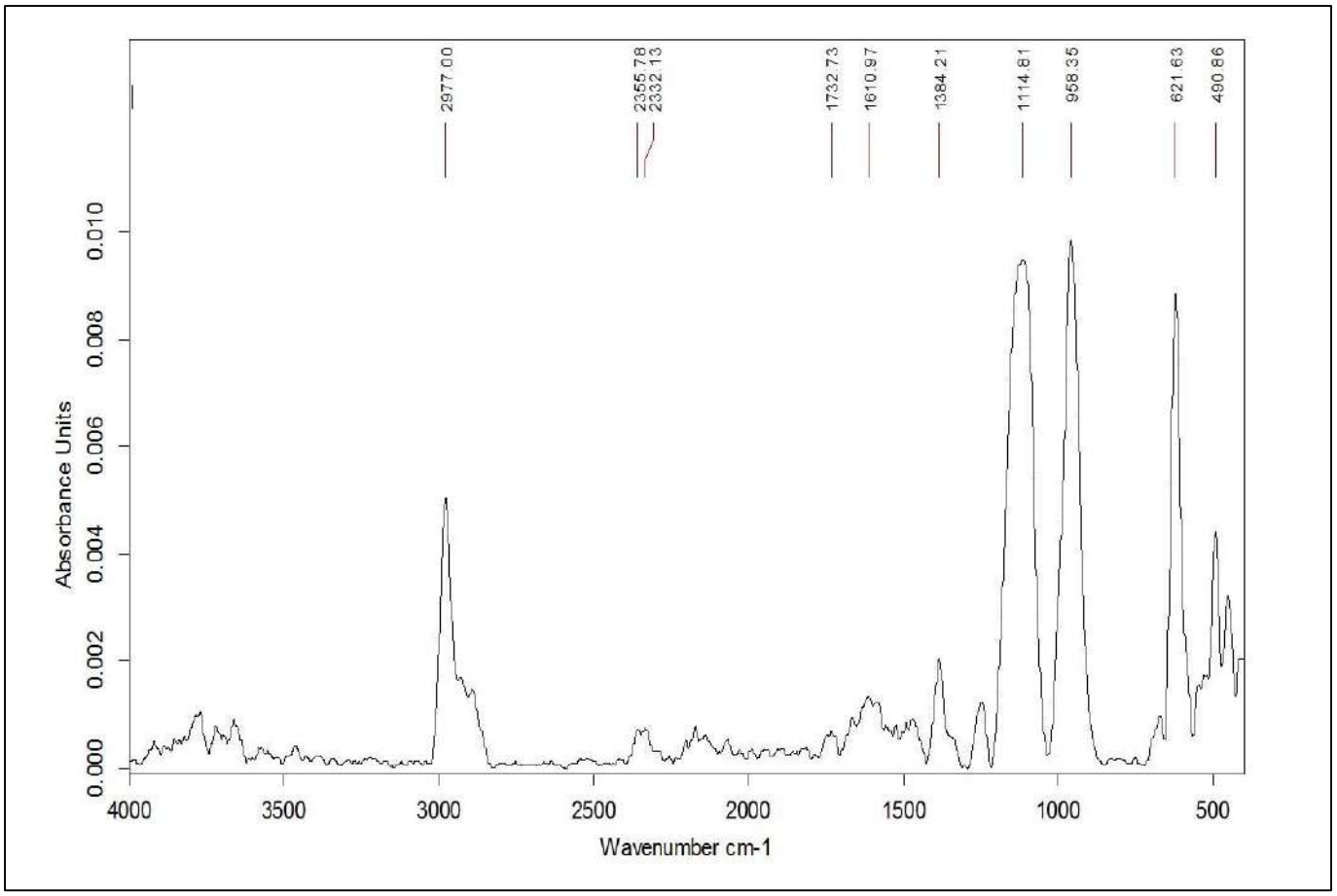


Figure III.17 : Spectre IR de réduction dérivé 1,2- diazépine.

III.7. L'activité biologique

III.7.1 Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque) :

La diffusion de l'argent antimicrobien dans le milieu de culture ensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée.

Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque de l'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/ antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai.

Généralement, plus la zone d'inhibition est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible. La mesure des zones d'inhibition peut être manuelle.

III.7.2 Technique en milieu liquide (méthode de dilution) :

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI habituellement exprimée en (mg/ml ou mg/l).

- La dilution en bouillon :

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macro dilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de micro titration (micro dilution). L'utilisation de ces plaques avec un protocole documenté. Y compris les précisions sur les micro-organismes de référence appropriée, peut faciliter la comparaison des résultats entre analyses.

- La dilution en gélose :

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boite.

III.7. 3 Méthode utilisées :

La méthode utilisée est méthode de VINCENT (JACOBETALE. 1979) ainsi des disques, de papier filtre de 9 mm de diamètre, sont imprégnés d'une faible quantité de nos échantillons, puis déposés à la surface d'un milieu de MUELLER-HINTON, coulé en boites de pétri préalablement ensemencée en surface en nappe l'aide d'une suspension de la bactérie étudiée.

Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre, en mm, de la zone d'inhibition.

Pour la préparation des inoculums, on a utilisé la méthode dite d'antibiogramme (méthode de la SFM Société Française Microbiologie).

La technique d'antibiogramme utilisée est celle de la diffusion de disque en gélose conçus par CHABBET en 1973.

- ✓ **Préparation de l'inoculums :**

La méthode préparation des inoculums est celle préconisée par la SFM (communiqué de 2005) qui consiste à préparer, à partir d'une culture de 18-24h de la bactérie étudiée sur le milieu gélose, une suspension en solution saline (0,9%NaCl) équivalente au standard Mc FARLAND 0,5(~10^8 UFC/ ml). Cette suspension peut être obtenue par la mesure de la densité optique (D.O) allant de 0,08 à 0,1 lue à 625nm (standardisation de l'antibiogramme selon L'OMS, 1999).

Par la suite, on prend 1ml de la suspension de l'inoculum, on l'étale par inondation à la surface d'une boite de pétré contenant de la gélose de MUELLER –HINTON, on déverse l'excès, ce que correspond à une densité de 10^6 à10^8 UFC/Ml et on laisse sécher la boite de pétri dans la zone septique du bec bunsen.

- ✓ **Distribution des disques :**

Des disques de papier filtre (diamètre de 9 mm) sont individuellement imprégnés avec 10 pi des hétérocycles et placés sur les plaque inoculées et, après un séjour à 4 ^{0}C pondant 2 h ,ils incubée à 37C° pendant 18-24 h pour les bactéries, à 35 C° pendant 48 h pour les levures et à 25C° pendant 72h pour les champignons.

Les disques standards (diamètre 9mm) de la gentamycine (Gen) (10µg) ont servis de contrôle antibactérien positif.

L'activité antimicrobienne est évaluée en mesurant la zone d'inhibition contre les organismes d'essai.

Chaque expérience est réalisée en triple exemplaire et le diamètre moyen de la zone d'inhibition est enregistré.

- ✓ **Méthode de préparation :**

Les diamètres d'inhibitions (DI) sont déterminés pour les souches bactériennes sensibles à des hétérocycles dans les tests de diffusion sur disque.

L'amphotéricine B (Am B) est utilisée comme médicament antifongique de référence. Les plaques inoculées sont incube à 25 C° pendant 72 h. A la fin de la période d'incubation, les plaques sont évaluées par la présence ou l'absence de croissance. Les valeurs des DI sont déterminées. Chaque test a été répété au moins deux fois.

Les observations effectuées sur l'effet de nos produits (produit (2) et (3) et (4) et (5) et (6) sur la croissance des souches bactériennes testées, sont regroupé dans le tableau suivant (on a pris comme référence médicament (Amoxicilline®) :

Micro-organisme	**Produit (2)**	**Antibiotique (Amoxicilline®)**
Gram (+)	**DI (mm)**	**DI (mm)**
Staphylococcus aureus	22	30
Staphylococcus epidermides	(-)	34
Gram (-)	**DI (mm)**	**DI (mm)**
Escherichia coli	(-)	35
Pseudomonas aérogènes	(-)	18

Tableau III.1 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre souche bactériennes testées pour le produit(2).

Micro-organisme	**Produit (3)**	**Antibiotique (Amoxicilline®)**
Gram (+)	**DI (mm)**	**DI (mm)**
Staphylococcus aureus	(-)	30
Staphylococcus epidermides	(-)	34
Gram (-)	**DI (mm)**	**DI (mm)**
Escherichia coli	(-)	35
Pseudomonas aérogènes	(-)	18

Tableau III.2 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre souche bactériennes testées pour le produit(3).

Micro-organisme	**Produit (4)**	**Antibiotique (Amoxicilline®)**
Gram (+)	**DI (mm)**	**DI (mm)**
Staphylococcus aureus	35	24
Staphylococcus epidermides	(-)	35
Gram (-)	**DI (mm)**	**DI (mm)**
Escherichia coli	(-)	34
Pseudomonas aérogènes	(-)	15

Tableau III.3 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre souche bactériennes testées pour le produit(4).

Micro-organisme	**Produit (5)**	**Antibiotique (Amoxicilline®)**
Gram (+)	**DI (mm)**	**DI (mm)**
Staphylococcus aureus	(-)	30
Staphylococcus epidermides	(-)	34
Gram (-)	**DI (mm)**	**DI (mm)**
Escherichia coli	(-)	35
Pseudomonas aérogènes	(-)	18

Tableau III.4 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre souche bactériennes testées pour le produit(5).

Micro-organisme	**Produit (6)**	**Antibiotique (Amoxicilline®)**
Gram (+)	**DI (mm)**	**DI (mm)**
Staphylococcus aureus	(-)	24
Staphylococcus epidermides	(-)	35
Gram (-)	**DI (mm)**	**DI (mm)**
Escherichia coli	(-)	34
Pseudomonas aérogènes	(-)	15

Tableau III.5 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre souche bactériennes testées pour le produit(6).

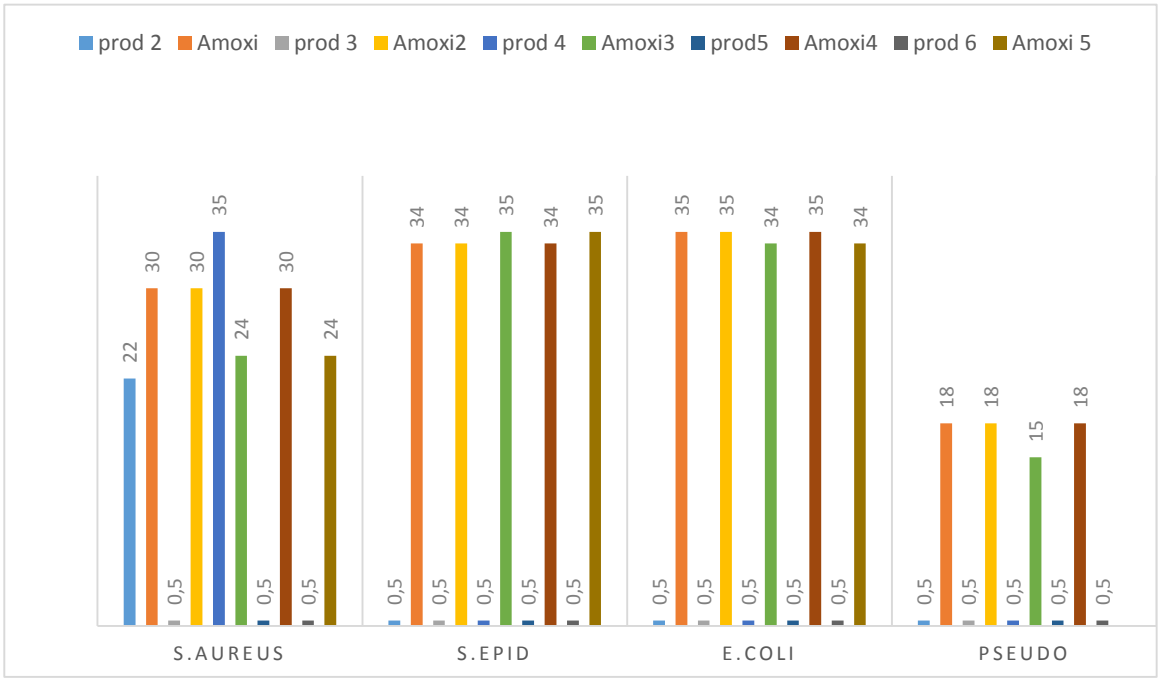


Figure.III.18 : Comparaison des zones d'inhibition des cinq produits pour l'activité anti-bactérienne.

On observe qu'il existe une activité remarquable 2 et 4 sur *Staphylococcus aureus ;* mais pratiquement une activité nulle sur les autres bactéries, donc nos produits synthétisés ont une activité microbienne faible à modéré.

Les observations effectuées sur l'effet de nos produits (produit (2) et (3) et (4) et (5) et (6).

Sur la croissance des souches fongique testées *Candida albicanes* (Levure) et *saccharomyces cervisie* (moisissure) (on a pris comme référence un médicament (Nystatine®) :

Levure et Fongique	**Produit (2)**	**Antibiotique (Nystatine®)**
	DI (mm)	**DI (mm)**
Saccharomyces cervicie	(-)	39
Candida Albicanes ATCC10231	13	25

Tableau III.6 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre les levures et les Fongique pour le produit (2).

Levure et Fongique	**Produit (3)**	**Antibiotique (Nystatine®)**
	DI (mm)	**DI (mm)**
Saccharomyces cervicie	(-)	39
Candida Albicanes ATCC10231	15	25

Tableau III.7 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre les levures et les Fongique pour le produit (3).

Levure et Fongique	**Produit (4)**	**Antibiotique (Nystatine®)**
	DI (mm)	**DI (mm)**
Saccharomyces cervicie (cylindre)	(-)	(-)
Candida Albicanes ATCC10231	22	33

Tableau III.8 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre les levures et les Fongique pour le produit (4).

Levure et Fongique	**Produit (5)**	**Antibiotique (Nystatine®)**
	DI (mm)	**DI (mm)**
Saccharomyces cervicie	(-)	39
Candida Albicanes ATCC10231	20	25

Tableau III.9 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre les levures et les Fongique pour le produit (5).

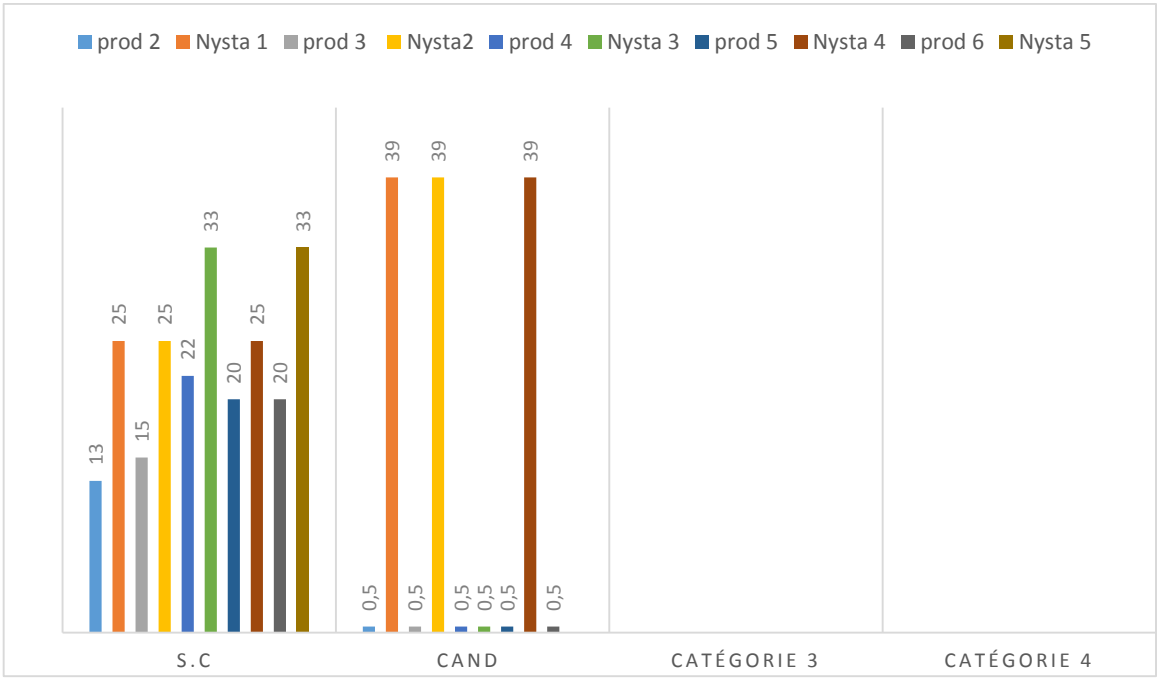
Levure et Fongique	**Produit (6)**	**Antibiotique (Nystatine®)**
	DI (mm)	**DI (mm)**
Saccharomyces cervicie	(-)	(-)
Candida Albicanes ATCC10231	20	33

Tableau III.10 : L'activité antimicrobienne des hétérocycles contre les levures et les Fongique pour le produit (6).

DI : diamètre de diffusion sur disque (mm).

Inactif : d ≤ (6mm) ; **activité moyenne :** 6 (mm) < d ≤ 12 (mm).

Activité modérée : 12 mm < d ≤ 20(mm) ; **bonne activité :** d > 20 (mm).



Figur.III.19 : Comparaison des zones d'inhibition des cinq produits d'activité anti fongique.

Discussions :

On observe que les produits synthétisé possèdent une activité antimicrobienne sur certaines souches bactériennes et fongiques comme *Candida Albicanes* et *Staphylococcus aureus*.

Pour les souches anti bactérien *Escherichia coli* et *Pseudomonas aérogènes* et *Staphylococcus epidermides* : aucune zone d'inhibition observé donc n'est pas sensible contre nos produits.

Pour les souches anti fongique *Saccharomyces cervicie* : aucune zone d'inhibition observée donc n'est pas sensible contre nos produits.

Staphylococcus aureus : on remarque une zone d'inhibition de 35 par rapport au médicament Amoxicilline® 24 de diamètre, donc elle est extrêmement sensible de nos produits.

Candida Albicanes : On remarque des zones d'inhibition pour toute les produits de valeurs de 20, 20, 22, 15, 13.

Les bactéries Gram (+) étaient généralement plus résistantes par rapport au produits synthétisé que les bactéries Gram (-).

Les produits synthétisés ont une activité anti fongiques plus qu'une activité anti bactérienne.

III.8. Etude de l'activité anti-inflammatoire :

L'activité anti-inflammatoire est obtenue en administrant des hétérocycles sur des souris.

Les résultats de l'étude sont consignés dans le tableau III.11.

Lot témoin		Lot Référence (Dichlofénac)		Lot Dose 1		Lot Dose 2	
Pattes gauches (g)	Pattes droite (g)	Pattes gauches (g)	Pattes droite (g)	Pattes gauches (g)	Pattes droite (g)	Pattes gauches (g)	Pattes droite (g)
0,1859	0,1267	0,1163	0,0976	0,1754	0,1055	0,1527	0,1019
0,1826	0,1053	0,1248	0,1131	0,1839	0,1170	0,1610	0,1151
/	/	0,1347	0,1204	0,1768	0,1044	0,2206	0,1084
/	/	0,1002	0,1349	0,1508	0,1048	0,1838	0,1117
La moyenne = 0,1843	La moyenne =0,1160	La moyenne = 0,1190	La moyenne = 0,1165	La moyenne = 0,1717	La moyenne = 0,1079	La moyenne = 0,1795	La moyenne = 0,1092
% d'augmentation d'œdème = 58,87%		% d'augmentation d'œdèmes = 2,15 %		% d'augmentation d'œdème = 59,12 %		% d'augmentation d'œdème = 64,37 %	
/		% de réduction d'œdèmes = 96,34		% de réduction d'œdème = 0,42		% de réduction d'œdème = 9,34	

Tableau.III.11 : Récapitulation des résultats de l'administration des hétérocycles sur les souris.

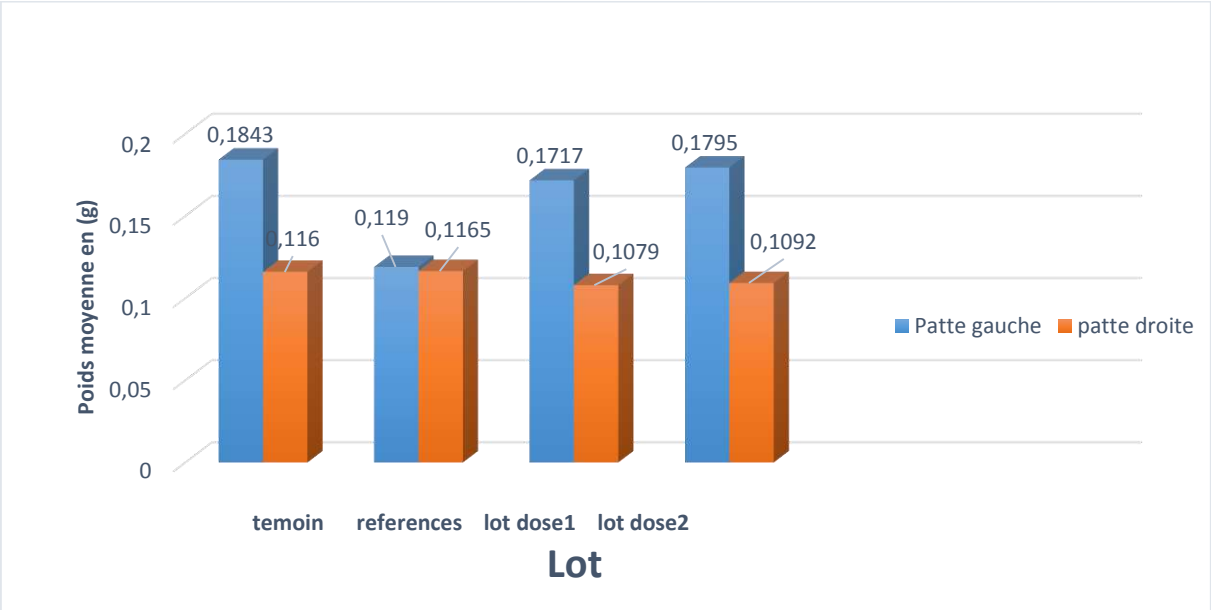


Figure.III.20 : Evolution de poids moyen des pattes droites et pattes gauches des souris pour les quatre lots.

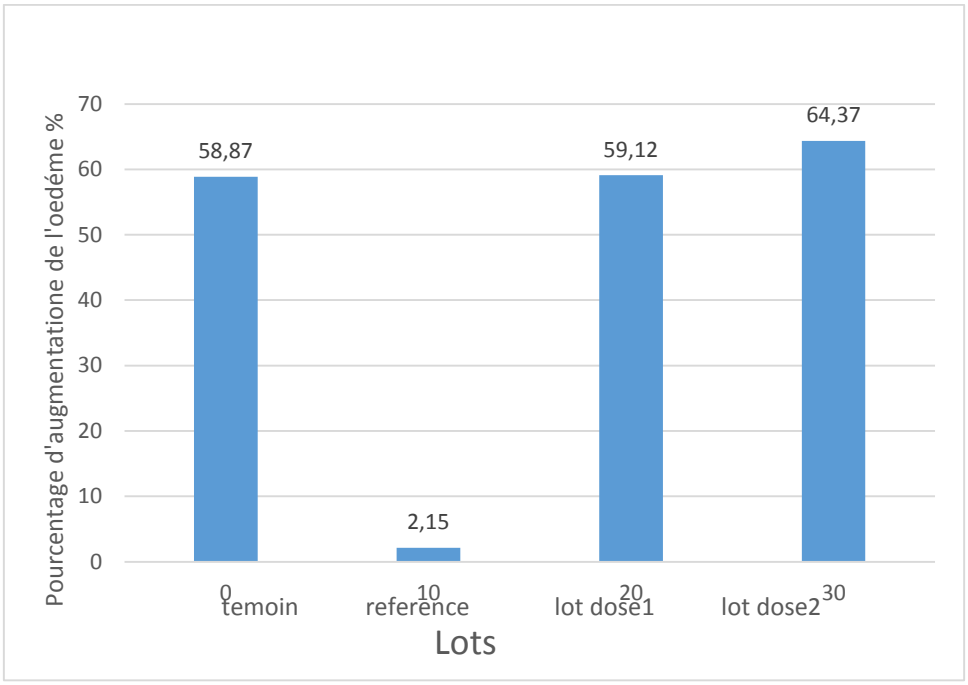
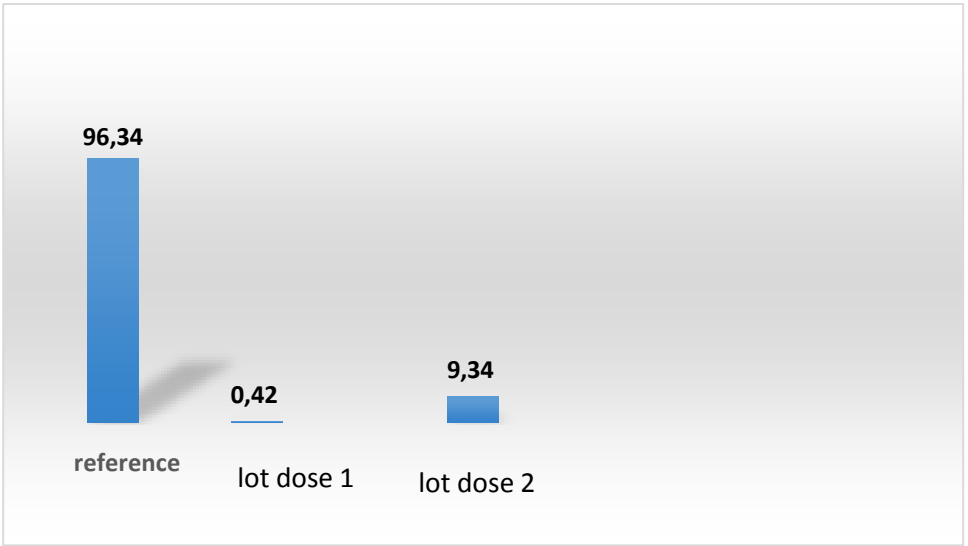


Figure.III.21 : Le pourcentage d'augmentation de l'œdème des pattes gauche par rapport aux pattes droites des quatre lots.

Le pourcentage d'augmentation de l'œdème des pattes gauche par rapport aux pattes droites du témoin est de 58,87 %, concernant le lot de l'œdème référence nous avons remarqué que le pourcentage d'augmentation de l'œdème est de (2,15 %) et enfin nous signalons un pourcentage d'augmentation de l'œdème pour les deux lots d'essai d'environ (lot1 = 59,12 %) et (lot 2 = 64,37 %).



Figur.III.22 : Le pourcentage de réduction de l'œdème de lot de référence et les deux lots d'essai par rapporte ou témoin.

Nous avons constaté un pourcentage de réduction de l'œdème des souris traitées par rapport au produit de référence (Dichlofénac de sodium) et par rapport au témoin qui est de (97,34 %) et (lot1= (0,42 %) et (lot 2 = 9,34 %).

On remarque que les produits synthétisé ont une faible résistance par rapport au pouvoir anti-inflammatoire.

Conclusion Générale

Le 4,6-dinitrophényle -1,3-dihydrazono oxoglutarate d'alkyle forme deux configurations diastéréoisoméres (E)/(E) et (Z)/(Z) qui se différencient nettement par leurs points de fusion et par la position caractéristique de leurs signaux du proton

^{1}H-RMN.

Ainsi la condensation des dérivés (E) -2,4-dinitrophénylhydrazine avec l'ester méthylique donne exclusivement l'isomères (E)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyl et son dérivé nitré, qui, par traitement se transforment complètement en isoméres(Z). Ces diastéréoisomères se différencient aussi par leur point de fusion et par la position de leurs signaux du proton du groupement NH dans le spectre ^{1}H-RMN.

La réduction des bis hydrazones méthylé et éthylé par le dithionite de sodium a donné un produit qui, après son caractérisation, correspond au produit estompé.

Ces produits sont caractérisé par IR ; ^{1}H-RMN et le ^{13}C-RMN.

La condensation des dérivés de (Z)-2,4-dinitrophénylhydrazonoglutarate de diméthyl avec l'hydrazine monohydrate à donner des nouveaux dérivés benzodiazépine qui reste à déterminer sa structure exacte

La réduction des dérivés 1,2-diazépines par le dithionite de sodium a donné un produit solide qui nécessite une caractérisation plus profonde pour déterminer sa structure finale.

Quelques composés synthétisés ont été soumis à des tests biologiques auxquels ils ont

Montré une activité biologique remarquable.

Les bactéries Gram (+) étaient généralement plus résistants par rapport à nos produits synthétisé que les bactéries Gram (-).

Les produits synthétisés ont une activité anti fongiques plus qu'une activité anti bactérienne.

On remarque que les produits synthétisé ont une faible résistance par rapport au pouvoir anti-inflammatoire.

Référence Bibliographie

Liste de référence

[1] Habchi, F; Synthèse des hétérocycles azotés a cinq chainons dérivés de l'acide sorbique et détermination de leurs activités biologique.

[2] Thierry JUSPIN THESE de doctorat ; synthèse et fonctionnalisation d'hétérocycles d'interetbiologique par méthodologie TDAE.

[3] Issaad,F.Z ;Etude électrochimique des dérives ortho-nitro phényle acétique ; P. 44 ; **(2009).**

[4] Marcaccini, S ;Pepino,R ;Marcos,C.F.Polo, C ;Torrba, T.J.Heterocyclic Chem.**(2000)**, Vol. 37, P. 1501-1503.

[5] Bouchikhi, F ; Synthèse de composés hétérocycliques aromatique azotés, inhibiteurs potentielles de kinases ; HAL ; P119 ; **(2008)**.

[6] K. C. Nicolaou, Anthony A. Estrada, Graeme C. Freestone, Sang Hyup Leea and Xavier Alvarez-Micoa; *New synthetic technology for the construction of N-hydrpoxyindoles and synthesis of nocathiacin I model systems;* Vol. 63; **(2007)**; P. 6092.

[7] A. W. Freeman, M. Urvoy and M.E. Criswell; *Triphenylphosphine-Mediated Reductive Cyclization of 2-Nitrobiphenyls: A Practical and Convenient Synthesis of Carbazoles;* Vol. 70,N°13, **(2005)**; P. 5015.

[8] Sacchi, A.; Laneri, S.; Arena, F.; Abignente, E.; Gallitelli, M.; Damico, M.; Filippelli, W.; and Rossi, F., *Eur. J. Med. Chem*, Vol. 34, **(1999)**, P. 1003.

[9] Matyus, P.; Barlin, G.B.; Harrison, P.W.; Wong, M.G.; and Davies, L.P. *Aus. J. Chem*. Vol. 49, **(1996)**,P. 435.

[10] Dumas, J.; and Sherer, B., PCT Int. Appl., WO 2009027733 A1 20090305, 2009. *Chem. Abstr*. 150, **(2009)**, 283062

[11] Hamdouchi, C.; Sanchez-Martinez, C.; Gruber, J.; del Prado, M.; Lopez, J.; Rubio, A.; and Heinz, B. A., *J. Med. Chem.* **(2003)**, Vol. *46*,P. 4333.

[12] Barbosa, H. J.; Collins, E. A.; Hamdouchi, C.; Hembre, E. J.; Hipskind, P. A.; Johnston, R. D.; Lu, J.; Rupp, M. J.; Takakuwa, T.; and Thompson, R. C . PCT Int. Appl. WO 2006102194, 2006. *Chem. Abstr*, Vol. 145, **(2006)**, 419159

[13] Burnier, P.; Chiang, Y.; Cote-des-Combes, S.; Li, A. T.; and Puech, F. PCT Int. Appl. WO 2009037394, 2009. *Chem. Abstr*, Vol. 150, **(2009)**, 374547

[14] G.Dou, D.Wang, DShib**;** *Facile And Efficient Synthesis Of 2-Aminoquinoline Derivatives Reduced* By Zn/Acoh **;** Vol. 92 **;** No. 3**; (2016)** ; P. 522.

[15] S.Blanchard, I. Grig Alexa,O. Patriciu, A.Finaru,G.Guillaumet ;*dihydrodipyridopyrazines: synthese et fonctionnalisation*; (**2010)** ; p55.

[16] Nyerges, M.; Fejes, I.; Toke, L. Tetrahedron Lett. **(2000)**, Vol. 41, P. 7951.

[17] Parvatkara, P. T., Parameswarana, P.S., and Tilveb S. G., *Tetrahedron letters*, Vol. 48, P.7870-7872.

[18] M. Khoja, D. Sicker and H. Wilde, *Heterocycles*, Vol. 37, **(1994)**, P. 401.

[19] Khoumri, O. ; Terme, T. ; Vanelle, P. Synthesis **(2009)**, 3677.

[20] Denny, W.A., Wilson, W.R., Ware, D.C., Atwell, G.J., Milbank, J.B., Stevenson, R.J., *U.S Patent* 7064117 **(2006)**.

[21] Hazra, A., Mondal, S., Maity, A., Naskar, S., Saha, P., Paira, R., Sahu, K.B., Paira, P., Ghosh, S., Sinha, C., Samanta, A., Banerjee, S., and Mondal, N.B., *European Journal of Medicinal Chemistry*,Vol. 46, **(2011)**, P. 2132-2140.

[22] Eswaran, S., Adhikari, A., Chowdhury, I., Pal, N., and Thomas, K.D., *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 45, **(2010)**, P. 3374-3383.

[23] Shiraki, H.; Kozar, M. P.; Mlelndez, V.; Hudson, T. H.; Ohrt, C.; Magill, A. J.; and Lin, A. J., *J. Med. Chem*, Vol. 54, **(2011)**, P. 131.

[24] Muruganantham, N., Sivakumar, R., Anbalagan, N., Gunasekaran, V., and Leonard, J.T., *Biol. Pharm. Bull*,Vol. 27, **(2004)**, P. 1683–1687.

[25] Mathew, V., Keshavayya, J., Vaidya, V.P., and Giles, D., *Eur. J. Med. Chem*,Vol. 42, **(2007)**; P. 823–840.

[26] Narsinh, D.; and Anamik, S. *Ind. J. Pharm. Sci*, Vol. 63, **(2001)**, P. 211.

[27] Harmenberg, J.; Akesson-Johansson, A.; Greaslund, A.; Malmfors, T.; Bergman, J.; Wahren, B.; Akerfeldt, S.; Lundblad, L.; and Cox, S., *Antiviral Res*, Vol. 15, **(1991)**, P. 193.

[28] Tandon, V.K., Yadav, D.B., Maurya, H.K., Chaturvedib, A.K. and Shuklab, P.K., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 14, **(2006)**, P. 6120–6126.

[29] Antonow, D., Jenkins, T.C., Howarda, P.W. and Thurstona, D.E., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*,Vol. 15, **(2007)**, P. 3041–3053.

[30] Younes, E.A., Hussein, A.Q., May, M.A. and Fronczek, F.R., *ARKIVOC*, (**2011)**, P. 322.

[31] Nefzi A, Ong NA, Houghten RA **(2001)** Tert Lett 42(31): P. 5141-5143.

[32] Schultz, C.; Link, A.; Leost, M.; Zaharevitz, D. W.; Gussio, R.; Sausville, E. A.; Meijer, L.; Kunick, C., *J. Med. Chem*., Vol. 42, **(1999)**, P. 2909.

[33] Qiao, Z., Wang, W., Wang, L., Wenb, D., Zhao., Wanga, Q., Meng, Q., Chen G., Wub, Y., Zhou, H., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 21, **(2011)**, P. 6389–6392.

[34] Ben-Cherif, W., Gharbi, R., Sebai, H., Dridi, D., Boughattas, N.A., Ben-Attia, M., C. R. *Biologies*,Vol. 333, **(2010)**, P. 214–219.

[35] Drabczy_nska, A.., Yuzlenko, O., Köse, M., Paskaleva, M., Schiedel, A.C., Karolak-Wojciechowska, J., Handzlik, J., Karcz, T., Kuder, K., Müller, C.E., Kie_c-Kononowicz, K., *European Journal of Medicinal Chemistry,* VOL. 46, **(2011)**; P. 3590-3607.

[36] Davidson, J. R., *J. Clin. Psychiatry,* **(2001)**,Vol. 62 (Suppl.),P. 46.

[37] McCall, W. V., *J. Clin. Psychiatry,* **(2001)**,Vol. 62 (Suppl.),P. 27.

[38] L'arpent, J. P. Listeria., *Technique et documentation, Lavoisier*, Paris, France **(2004)**

[39] Image 8. http://www.Universityofcalifornia.Edu/Everyday/Agriculture/Images/ e_Coli. Jpg **(2008)**.

[40] Kaper, J.B., P.Nataro, J., Mobley, H.L.T., *Nature Reviews Microbiology,Vol.* 2, **(2004)**, P. 123-140.

[41] Whitt, DD, Salyers, AA. *Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach*, **(2002)**.

[42] http://pharmtox.free.fr/pharmacie/antibacteriens/Presentation-long/page_01.htm

[43] Cahagnier, B, *Collection Sciences et Technique, Technique et documentation, Lavoisier*, Paris, France **(1998)**.

[44] Balchin, M.lis. .Hart, S.L et coll, *Phytothérap. Research*, Vol 14, (**2000),** P. 623.

[45] TOUITOU YVAN, **(2003)** : Pharmacologie, édition : Masson, pp 229.

[46] ROBERT C., vencent P., **(1995) :** Biologie et physiologie humaine, 2ème Ed. Vuibert, France, 700p.

[47] GIRAUDET P., FAURE A. et FROT J. C, **(1984)** : La réaction inflammatoire (Physiopathologie et exploitation clinique), Ed. Rinçot, Paris, 260p.

[48] TORTORA G. et REYNOLDS S., **(2001)** : Principe d'anatomie et physiologie, 3ème Ed. de Boeck université, Québec, 1121p.

[49] CHARPENTIER B. et *al.* **(2004) :** Guide du préparateur en pharmacie, 2ème édition Masson, Paris, p1300.

[50] PIERI François, **(1992) :** Pharmacologie et thérapeutique, édition : Elipses, Paris, pp 298.

Les Annexes



Figure.III.1: Halo d'inhibition de produit (2) sur *E-Coli.*



Figure.III.2: Halo d'inhibition de produit (3) sur *E-Coli.*

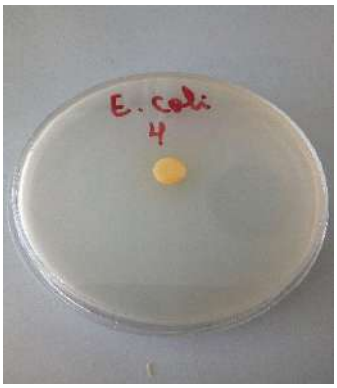


Figure.III.3: Halo d'inhibition de produit (4) sur *E-Coli.*



Figure.III.4 : Halo d'inhibition de produit (5) sur *E-Coli*.



Figure.III.5 : Halo d'inhibition de produit (6) sur *E-Coli*.



Figure.III.6 **:** Halo d'inhibition de (Amox) sur *E-Coli*.



Figure.III.7 : Halo d'inhibition de produit (2) sur *saccaromyces Cervisie.*



Figure.III.8 : Halo d'inhibition de produit (3) sur *saccharomyces cervisie.*

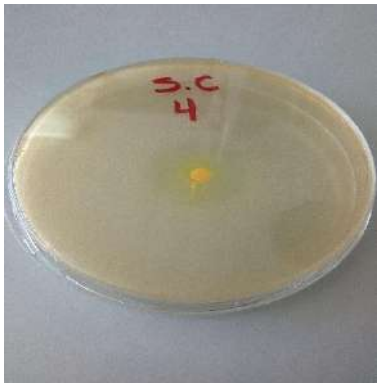


Figure.III.9 : Halo d'inhibition de produit (4) sur *saccharomyces cervisie.*

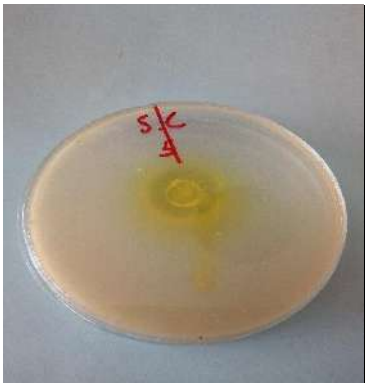


Figure.III.10 : Halo d'inhibition produit de produit (5) sur *saccaromyces cervisie.*



Figure.III.11 : Halo d'inhibition de produit (6) sur *saccaromyces Cervisie.*



Figure.III.12 : Halo de (Nystatine) sur *saccaromyces Cervisie.*



Figure.III.10: Halo d'inhibition de produit (2) sur *Pseudomonas aerogenose.*



Figure.III.10: Halo d'inhibition de produit (3) sur *Pseudomonas Aerogenose*.



Figure.III.10: Halo d'inhibition de produit (4) sur *Pseudomonas aerogenose.*



Figure.III.11: Halo d'inhibition de produit (5) sur *Pseudomona aerogenose.*



Figure.III.12: Halo d'inhibition de produit (6) sur *Pseudomona aerogenose.*



Figure.III.13: Halo d'inhibitio de (Amoxi) sur *Pseudomona aerogenose.*



Figure.III.14: Halo d'inhibition de produit (2) sur *Staphyl-Epide.*



Figure.III.15: Halo d'inhibition de produit (3) sur *Staph-Epide.*

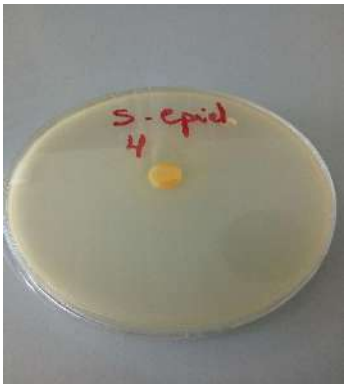


Figure.III.16: Halo d'inhibition de produit (4) sur *Staph –Epide.*

.



Figure.III.16: Halo d'inhibition de produit (5) sur *Staph-Epide.*



Figure.III.17: Halo d'inhibition de produit (6) sur *Staph-Epide.*



Figure.III.18: Halo d'inhibition de (Amox) sur *Staph –Epide.*



Figure.III.19: Halo d'inhibition de produit (2) sur *Staph-aureus*.



Figure.III.20: Halo d'inhibition de produit (3) sur *Staph-aureus.*



Figure.III.21: Halo d'inhibition de produit (4) sur *Staph-aureu.*



Figure.III.22: Halo d'inhibition de produit (5) sur *Staph-aureus*



Figure.III.23: Halo d'inhibition de produit (6) sur *Staph-aureus*

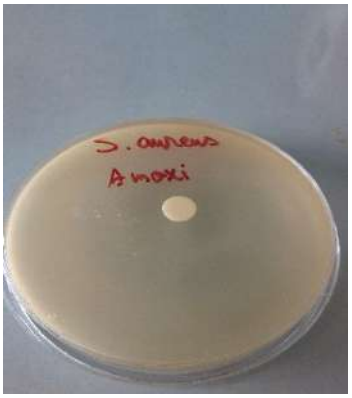


Figure.III.24: Halo d'inhibition de (Amox) sur *Staph-aureus*

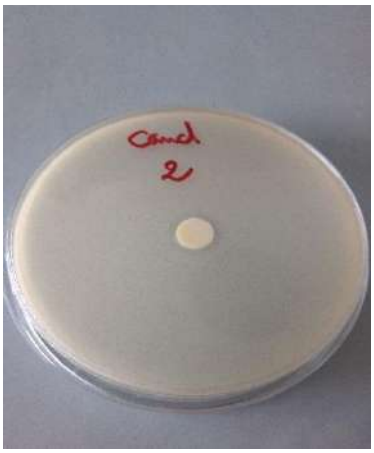


Figure.III.25: Halo d'inhibition de produit (2) sur *Condida-(Alb)*



Figure.III.26: Halo d'inhibition de produit (3) sur *Condida-(Alb)*



Figure.III.27: Halo d'inhibition de produit (4) sur *Condida-(Alb)*

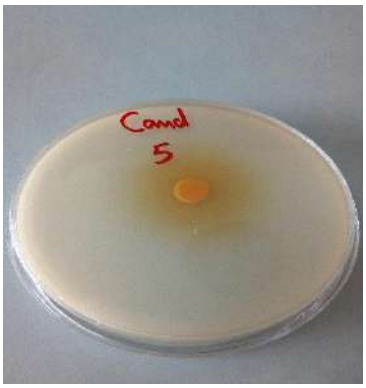


Figure.III.28: Halo d'inhibition de produit (5) sur *Condida-(Alb).*



Figure.III.30: Halo d'inhibition de produit (6) sur *Condida-(Alb).*



Figure.III.31: Halo d'inhibition de (Nystatine) sur *Condida-(Alb).*