République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Bejaia
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés

Mémoire de Fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

en Science et Technologie du Médicament

Présenté par

HAMED Djamila
YAHIAOUI Asma

Thème

Réaction de Biginelli catalysée par $Sr(NO_3)_2$: Synthèse et Evaluation biologique des produits 3,4-dihydropyrimidine-2-(1*H*)-ones

Soutenu le 28/06/2016 **Devant le jury composé de**

REZGUI Farouk	Professeur à l'Université de Bejaia	Président
SOUALAH Ahcène	Professeur à l'Université de Bejaia	Examinateur
LADJOUZI Rabia	MCB à l'Université de Bejaia	Examinateur
KOUACHI Kahina	MCA à l'Université de Bejaia	Encadreur

Promotion 2015/2016

Remerciements

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du Laboratoire de Chimie du département de tronc commun et en collaboration avec le Laboratoire de Mycologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (SNV) de l'Université de Bejaia.

Nos vifs remerciements son adressés à Madame K. KOUACHI, Maitre de Conférences à la Faculté SNV, pour la qualité de son encadrement, sa disponibilité et ses encouragements durant la réalisation de ce mémoire.

Nous exprimons nos profonds remerciements à Monsieur F. REZGUI, Professeur à la Faculté de Technologie, pour l'honneur qu'il nous fait en présidant ce travail.

Il nous est particulièrement agréable d'exprimer nos remerciements à :
Monsieur A. SOUALAH, Professeur à la Faculté de Technologie, pour avoir accepté de juger ce travail.
Monsieur R. LADJOUZI, Maitre de Conférences à la Faculté SNV, pour avoir accepté d'être parmi les membres de Jury.

Nos remerciements vont également à Mademoiselle Y. BOUAOUD, doctorante au Laboratoire de Mycologie (Faculté SNV), pour nous avoir aidé et guidé pour mener à bien la partie Microbiologie.

On tient aussi à exprimer nos sincères remerciements à Mademoiselle A. OUATAH ingénieur du Laboratoire de Zoologie (bloc 9, Faculté SNV) et le corps technique des Laboratoires 5 et 6 (bloc 11, Faculté de Technologie) pour leur sympathie et disponibilité.

Nos remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont encouragées et soutenues de prés ou de loin.

Dédicaces

A mes parents si chers et précieux

A mes frères Amine, Oussama, Nassim, Islam

A ma meilleure amie Timoucha

A toute ma famille, à toutes mes amies

A tous ceux qui me sont chers au monde.

Asma yahiaoui

DÉDICACES

Je remercie le bon dieu de m'avoir donné le courage pour réaliser ce travail, que je dédie :

A ma très ***CHÈRE MÈRE*** *dont je ne trouve pas les mots pour traduire tout ce que je ressens envers une mère exceptionnelle comme elle.*

A mon très ***CHER PÈRE****, qui est toujours là pour moi, et qui m'a donné un magnifique modèle de labeur.*

A mes chères ***SŒURS****: Karima, Tassadit, Fariza, et la petite et la plus adorable Souhila (sousou).*

A mes ***GRANDS MERES*** *: Ouardia et Laitmas, et mon grand-pèreAkli.*

A mes ***TANTES*** *: Ghania,Ounissa,Faroudja,Zahra,Ourida, Fatma, Malika, Ouardia, Houa et nana Ghenima.*

Ames ***ONCLES*** *: Salem, mehana, Mohand, Rabah, Youcef, Rabah,Yahia.*

A toutes mes ***AMIES*** *: Taklit, Farida, Hayet, Yamina (groupe de la pharmacie),Fazia,Naouel, Samia, Souhila, Asia, Djamila, Lila, Souad, Zahira, Asma, Nadia.*

Aux êtres chers qui nous ont quittés.

HAMED Djamila

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre II

Tableau II.1 : Caractéristiques des produits **27**

Chapitre III

Tableau III.1 : Effet de la quantité de catalyseur $Sr(NO_3)_2$ sur le rendement en DHPM synthétisée via la réaction de Biginelli [a]. **36**

Tableau III.2 : Effet de la quantité de catalyseur $Sr(NO_3)_2$ sur le rendement en DHPM synthétisée via la réaction de Biginelli [a] **37**

Tableau III.3 : Effet de la quantité de réactifs sur le rendement en DHPM synthétisée via la réaction de Biginelli [a] **38**

Tableau III.4 : Synthèse des DHPMs en utilisant $Sr(NO_3)_2$ via la réaction de Biginelli[a] **39**

Tableau III.5 : Activité antifongique des différentes solutions DHPMs par la méthode des puits (50 µL) **44**

Tableau III.6 : Activité antifongique de la solution DHPM-nitro à différentes concentrations ($mg.mL^{-1}$) par la méthode des puits (50 µL) **45**

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure I.1 : Réaction de Biginelli **3**
Figure I.2 : Synthèse de l'éthyle benzuramido-crotonate **4**
Figure I.3 : Aldéhydes aromatiques **5**
Figure I.4 : Dérivés cycliques ou acycliques de composés dicarbonylés **6**
Figure I.5 : Dérivés de l'urée **6**
Figure I.6 : Mécanisme réactionnel proposé par Sweet et Fissekis **13**
Figure I.7 : Mécanisme réactionnel proposé par Kappe **14**
Figure I.8 : Mécanisme réactionnel proposé par Harikrishnan **15**
Figure I.9 : Nifedipine **15**
Figure I.10 : Monastrol **16**
Figure I.11 : 6-méthyle-4-(5-nitrofuro-2-yl)-2-oxo-3,4-dihydropirimidine-5-carboxylate de méthyle **16**

Chapitre II

Figure II.1 : Dispositif utilisé pour déterminer la température de fusion **24**
Figure II.2 : Montage de la réaction multicomposant de Biginelli **25**
Figure II.3 : Symptômes causés par l'agent pathogène *Botrytis cinerea* **28**
FigureII.4 :*Botryis cinerea* cultivé sur PDA (aspect macroscopique (A) et microscopique (B) **28**
Figure II.5 : *Aspergillus flavus* cultivé sur PDA (aspect macroscopique (A) et microscopique (B) **29**
Figure II.6 : *Aspergillus niger* cultivé sur PDA (aspect macroscopique (A) et microscopique (B) **30**
Figure II.7 : Etapes de la préparation de l'inoculum de l'*Aspergillus* **31**
Figure II.8 : Ensemencement du milieu PDA par l'inoculum des différentes souches **32**

Figure II.9 : Disques stériles disposés sur milieu PDA préalablement ensemencé par l'inoculum étudié **32**

Chapitre III

Figure III.1 : Rendement en DHPM en fonction de la température de réaction en présence du catalyseur $Sr(NO_3)_2$ **37**

Figure III.2 : Mécanisme de la réaction de Biginelli catalysée par $Sr(NO_3)_2$Spectres **40**

Figure III.3 : Spectre IR de la 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one (DHPM) obtenu via la réaction de Biginelli catalysée par $Sr(NO_3)_2$ **41**

Figure III.4 : Solutions DHPMs (a) et exemple de l'activité antifongique de l'*Aspergillus flavus* (b) en présence du DMSO **42**

Figure III.5 : Activité antifongique des solutions DHPMs via-à-vis de *Botrytis cinerea* **43**

Figure III.6 : Activité antifongique de la solution DHPM-nitro (3 $mg.mL^{-1}$) via-à-vis de *l'Aspergillus flavus* (a) et *l'Aspergillus niger* (b) **44**

Figure III.7 : Activité antifongique de la solution DHPM-nitro (2 $mg.mL^{-1}$) via-à-vis de *l'Aspergillus niger* et *l'Aspergillus flavus* **45**

LISTE DES ABREVEATIONS

MCRs	Réaction multicomposants
DHPM	dihydropyrimidinone
DHPMs	dérivés de la dihydropyrimidinone
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
R_f	rapport frontal
T_f	Température de fusion
IR	Infra-Rouge
DMSO	diméthylesulfoxyde
SNV	science de la nature et la vie
DHPM-Ur	dihydroperimidinone
DHPM-Th	dihydroperimidinthione
PDA	potato-dextrose-agar
EtOH	Ethanol

Table des matières

Introduction générale 1

Chapitre I : Etude bibliographique

I-Introduction..... **3**
II-Historique de la réaction de Biginelli **4**
II-1 dérivés d'aldéhydes **4**
II-2 Composés β-dicarbonylés **5**
II-3 dérivés de l'urée **6**
III- Méthodes de préparation des DHPMs..... **7**
III.1 Utilisation de l'organocatalyse..... 7
III.2 Utilisation des acides de Lewis..... **7**
III.3 Utilisation des acides de Brϕnsted..... **8**
III.4 Utilisation de la biocatalyse..... **8**
III.5 Utilisation des supports solides..... **9**
III.6 Utilisation des micro-ondes..... **9**
III.7 Utilisation des ultrasons..... **10**
III.8 Utilisation des liquides ioniques..... **10**
III.9 Les polyoxométallates..... **11**
III.10 Les résines **11**
III.11 Les polymères..... **12**
III.12 Utilisation des catalyseurs supportés..... **12**
IV- Mécanisme réactionnel de la réaction de Biginelli..... **13**

V- Intérêts biologiques des 3,4-dihydropyrimidin-2-ones et ses dérivés……. **15**

Chapitre II : Techniques expérimentales

I-Techniques de caractérisation physico-chimique…….**23**

I.1 Chromatographie sur Couche Mince (CCM)……**23**

I-2 Température de fusion (T_f)……**23**

I-3 spectroscopie Infra-rouge (IR) ……..**24**

II- Test catalytique : Réaction de Biginelli……**25**

II-1 Description du montage ……**25**

II-2 Mode opératoire…… **26**

II-3 Exploitation des résultats……**26**

II-4 Produits chimiques……**27**

III-Test biologique : Activité antifongique ……**28**

III.1 Généralité sur les souches fongiques étudiées……..**28**

a) Botrytis cinerea……**28**

b) *Aspergillus*……**29**

b-1) *Aspergillus flavus* ……**29**

b-2) *Aspergillus niger* …….....**30**

III.2 Préparation du milieu de culture ……...**30**

III.3 Préparation de l'inoculum …….....**31**

III.4 Ensemencement par écouvillonnage ……**31**

III.5 Test de l'agent antifongique ……..**32**

a) La méthode des disques ……...**32**

b) La méthode des puits ……...**33**

c) La méthode de spots ……**33**

III.6 Identification de l'activité antifongique…… **33**

Chapitre III : Résultats et Discution

I. Etude de la réaction de Biginelli catalysée par $Sr(NO_3)_2$.....**35**

I.1 Optimisation des conditions opératoires……..**35**

I.2 Quantité des réactifs ……**38**

I.3 Préparation des dihydropyrimidinones ……**39**

II. Etude de l'activité antifongique des produits de Biginelli…… **42**

II.1 Test antifongique sur *Botrytis cinerea*.....**43**

II.2 Test antifongique sur l'*Aspergillus*…… 43

Conclusion génerale…… 47

Le développement de nouveaux procédés propres et efficaces pour la préparation de systèmes hétérocycliques présentant un maximum de diversité structurale est un challenge important pour la chimie académique et industrielle. C'est ainsi que s'est développée la recherche en synthèse combinatoire, qui permet d'accéder à une collection de molécules présentant un maximum de diversité structural en un minimum d'étapes. Les réactions multicomposants (MCR) définies comme étant des processus permettant d'assembler en one-pot au moins trois réactifs visant à synthétiser des produits hautement fonctionnalisés, s'inscrivent précisément dans ce contexte. Lorsque de telles réactions permettent de combiner des produits de départ majoritairement commerciaux ou aisément accessibles, elles deviennent de bons outils pour les industries pharmaceutiques, dans le but est de créer des chimiothèques destinées à la découverte moderne de médicaments **[1]**.

La réaction de Biginelli est parmi les premières réactions à composants multiples mise en évidence, après celle de Strecker (1850) **[2]** et celle de Hantzch (1882) **[3]**. Elle consiste en la condensation du benzaldéhyde, l'urée et l'acétoacétate d'éthyle, dans un milieu fortement acide en présence de solvant. Cette réaction a, d'emblée, montré son intérêt via les adduits résultants : 3,4-dihydropyrimidin-2-(1*H*)-ones (DHPMs) qui ont montré leur grande efficacité dans le domaine thérapeutique (antibactériens, traitement des infections urinaires, traitement de tumeurs et autres…). Ainsi, en raison de ces intérêts la découverte de nouvelles méthodes de synthèse, efficaces et rapides, de ce type de molécules est devenue un challenge très important en synthèse organique, ce qui attire davantage les chercheurs en vu de synthétiser de nouvelles molécules actives contre les maladies les plus redoutables comme le cancer et le SIDA…

Pour cela, cette réaction connaît un énorme développement, et l'utilisation des acides de Lewis, les acides conjugués des bases faibles, les hétéropolyacides **[4]**,… a permis d'améliorer considérablement les rendements, de diminuer les temps de réaction et de mieux respecter l'environnement, tout en gardant la simplicité de mise en œuvre.

L'intérêt suscité par la réaction de Biginelli et son efficacité dans le domaine biologique nous a poussé à mener une étude sur cette réaction en mettant en jeu un catalyseur dans un milieu exempt de solvant pour accéder à l'adduit de la réaction et leur évaluation dans un domaine biologique.

Pour situer le cadre de notre travail :

- Le premier chapitre sera consacré à l'étude de la réaction de Biginelli en décrivant son introduction dans les MCR, son mécanisme, l'intérêt de ses produits ainsi que les paramètres influençant son déroulement et son rendement.
- Le second chapitre portera sur les techniques expérimentales de caractérisations des produits de la réaction ainsi qu'aux modes opératoires adoptés pour la synthèse de Biginelli et le test biologique.
- L'ultime chapitre regroupera les résultats obtenus repartis en deux parties :
  - ✓ Synthèse de la DHPM via la réaction de Biginelli en présence d'une quantité catalytique d'acide de Lewis en l'occurrence le nitrate de strontium, regroupant l'optimisation des conditions opératoires, l'effet de la quantité des réactifs et la synthèse de quelques dérivés de la dihydropyrimidinone.
  - ✓ Application dans le domaine biologique via l'étude de l'activité antifongique des produits de Biginelli sur trois champignons : *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*.

Références bibliographiques

[1] G. Balme, D. Bouyssi, N. Monteiro, Pure Appl. Chem., *78* **(2006)** 231.

[2] A. Strecker, A. Justus Liebigs Ann. Chem., 91 **(1854)** 349.

[3] A. Hantzsch, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 23 **(1890)** 1474.

[4] A. Debache, M. Amimour, A. Belfaitah, S. Rhouati, B. Carboni, *Tetrahedron* Lett. 49 **(2008)** 6119.

I. Introduction

Les réactions multicomposant notées MCRs sont parmi les protocoles les plus importants dans la synthèse organique et la chimie médicinale et pharmaceutique **[1]**. Cela résulte du fait que de nombreuses liaisons sont crées pour former avec de bons rendements des composés polyfonctionnalisés à partir de divers réactifs, en incorporant en une seule étape (one pot) la majeure partie des squelettes carbonés des molécules mises en jeu. Dès lors, on comprend que les MCRs aient attiré l'attention de nombreux groupes de recherche, que ce soit dans l'académique ou dans l'industrie pour la création de manière rapide et efficace de chimiothèques variées **[2]**.

L'importance des réactions multicomposant a renouvelé l'intérêt à de nombreuses réactions parmi elle la réaction de Biginelli. En 1893, le chimiste Italien Pietro Biginelli a apporté pour la première fois, la réaction de cyclocondensation du benzaldéhyde (1), l'acétoacétate d'éthyle (2) et l'urée (3). La réaction a été simplement achevée en chauffant le mélange des trois composants en présence d'un acide de Bronsted et de l'éthanol à la température de reflux. Le produit résultant à été identifié comme la 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one (4) et connu sous le nom de la réaction ou la condensation de Biginelli désigné sous l'acronyme DHPM (Figure I.1).

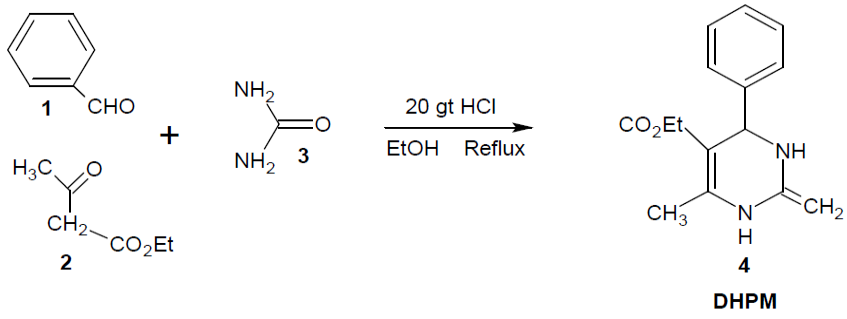


Figure I.1 : Réaction de Biginelli

Cette méthode rapportée par Biginelli a connu un grand essor, néanmoins elle souffre d'un temps de réaction assez long, d'une forte acidité du milieu réactionnel et de faibles rendements. Aujourd'hui, de nombreuses procédures nouvelles et améliorées continues d'être établies dans le but d'optimiser l'économie de l'énergie, du temps et de la matière qui conduisent à ces produits chimiques (DHPMs) respectueux de l'environnement. Parmi ces procédures on peut citer l'utilisation de catalyseurs sélectifs, disponibles et à moindre

coût, ou en appliquant d'autre méthodes de synthèse telles les micro-ondes, les ultrasons ou l'irradiation UV dans un milieu exempt de solvant.

II. Historique de la réaction de Biginelli

Depuis un siècle, la réaction de Biginelli a intuitivement plus ou moins anticipé le potentiel synthétique des réactions à composants multiples. Dans un premier temps Biginelli présenta le produit original comme étant une structure acyclique de l'éthyle benzuramido-crotonate (Figure I.2) et que des investigations plus poussées lui ont permis d'aboutir au produit DHPM. Depuis, trois librairies de réactifs de départ ont contribué dans l'élargissement de la production des DHPMs : il s'agit des aldéhydes, des composés β-dicarbonylés et des dérivés de l'urée.

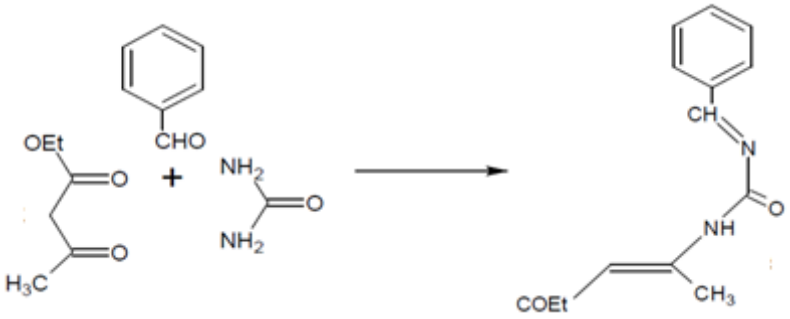


Figure I.2 : Synthèse de l'éthyle benzuramido-crotonate

II.1 Aldéhydes

Parmi les trois réactifs de la réaction de Biginelli, c'est l'aldéhyde qui est le plus varié sur une grande échelle. On peut trouver des aldéhydes hétérocycliques complexes, les aldéhydes chiraux, les aldéhydes aromatiques (Figure I.3) qui sont les plus utilisés et les aldéhydes aliphatiques, qui eux sont moins utilisés à cause de leurs faibles réactivité.

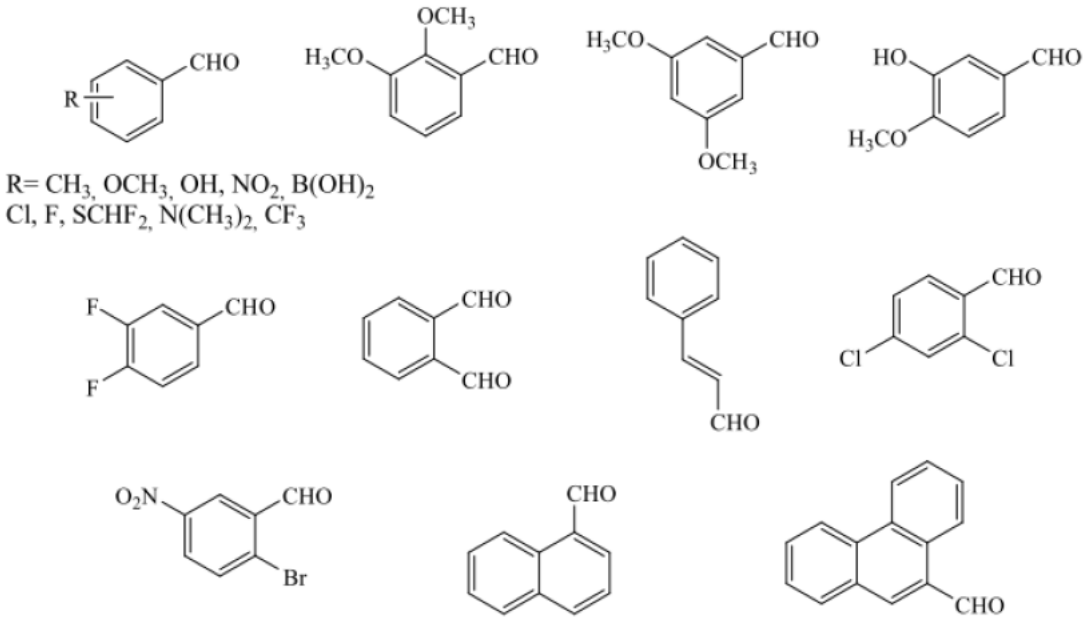


Figure I.3 : Aldéhydes aromatiques

II.2 Composés β-dicarbonylés

Les produits de Biginelli (DHPMs) peuvent être synthétisés à partir des β-dicarbonylés acycliques ou cycliques (Figure I.4), les β-diamides, les benzocycliques, les β-cétoacides ou autres types de méthylènes activés.

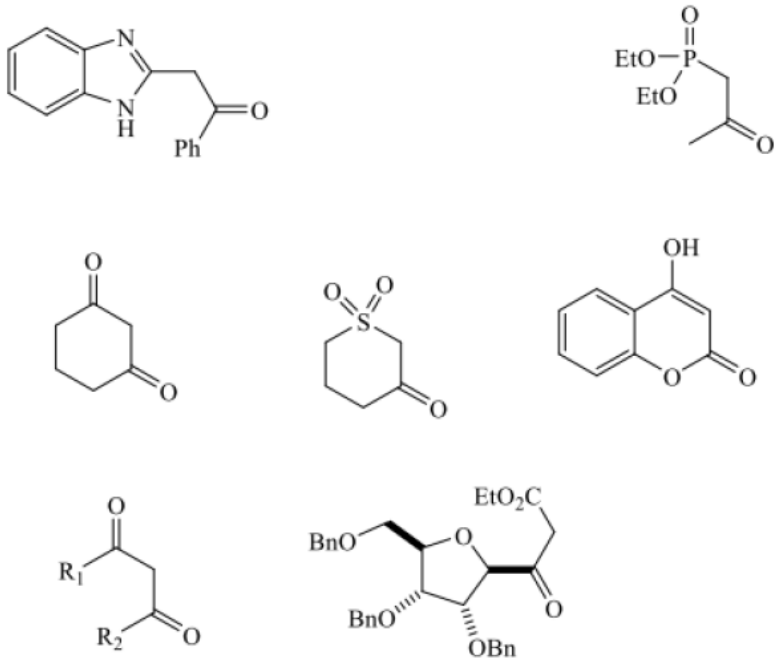


Figure I.4 : Dérivés cycliques ou acycliques de composés dicarbonylés

II.3 L'urée et ses dérivées

Dans la condensation de Biginelli, l'urée et ses dérivés (Figure I.5) sont utilisés comme source d'azote nécessaire pour obtenir le cycle tétrahydropyrimidine. Cependant, la thiourée et ses dérivés sont moins intégrés en raison des faibles rendements obtenus en DHPMs et aussi de la longue durée de la réaction.

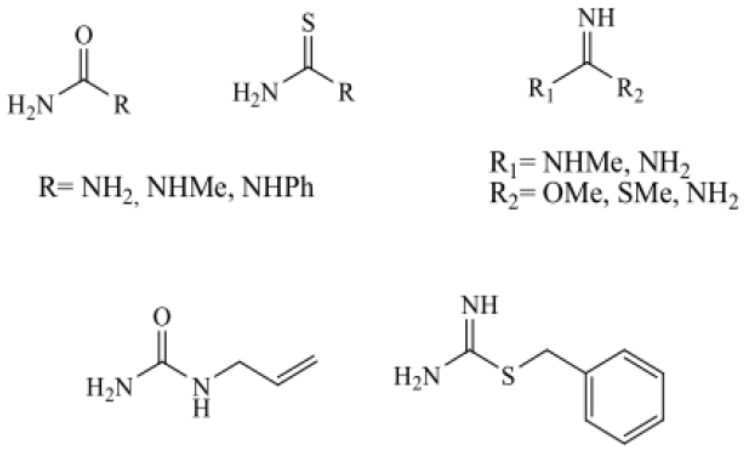


Figure I.5 : Dérivés de l'urée

III. Méthodes de préparation des DHPMs

Dés que les premiers produits de Biginelli ont montré leurs efficacités thérapeutiques, l'attrait par cette nouveauté n'a pas laissé les chercheurs insensibles les exhortant ainsi à développer de nouvelles études pour améliorer les performances de cette réaction. Cette dynamique a donné, à titre d'exemple, pour la seule condensation de l'acétoacétate d'éthyle, le benzaldéhyde et l'urée plus de 100 modes opératoires différents qui ont porté sur tous les facteurs de la réaction : catalyseur, solvant, réactifs, mode de chauffage,…

III.1 Utilisation de l'organocatalyse

De nombreuses méthodes catalytiques ont été étudiées et développées dans le but d'améliorer les rendements des produits obtenus via la réaction de Biginelli, néanmoins, peu d'exemple des organocatalyseurs ont été décrits. Liberta et coll. **[3]** on étudié la β-cyclodextrine, une molécule naturelle de la famille d'oligosaccharides non toxique et recyclable pour catalyser la condensation de Biginelli. Après avoir testé l'effet du solvant sur les trois familles de ce catalyseur qui sont (α, β et γ cyclodextrine), c'est la β-cyclodextrine (0,5 mol%) qui a donné dans un milieu exempt de solvant un bon rendement en DHPM, après 3 heures de réaction à 100°C. Une série de produits a été par la suite synthétisée avec de bons rendements.

III.2 Utilisation des acides de Lewis

Les acides de Lewis restent parmi les variantes de Biginelli les plus utilisés. Ces catalyseurs permettent d'appliquer cette réaction avec une augmentation considérable de rendements et la vitesse de la réaction sur un grand nombre d'aldéhyde et ses dérivés non seulement aromatique mais aussi aliphatiques.

Plus de cinquante pour cent des acides de Lewis utilisés au cours de la condensation de Biginelli sont à base de métaux de transition. Les chlorures, les nitrates, les triflates et d'autres sels de ses métaux ont été utilisés avec succès **[4]**

Le tosylate de fer ($Fe(OTs)_3.6H_2O$) est rapporté par J.T. Starcevich et coll. **[5]** comme catalyseur non toxique et recyclable dans la synthèse de Biginelli. Les meilleurs rendements en DHPMs (82% ; 3,5 heures ; 125°C) ont été obtenus en présence du solvant octane.

H. R. Mermarian et Ranjbar **[6]** ont rapporté une nouvelle méthode dans le but d'améliorer le rendement des 3,4-dihydropyrimidin-2-ones en employant le $Co(HSO_4)_2$ dans le mélange réactionnel, les rendements obtenus se révèlent excellents (90%).

De même, le chlorure d'étain ($SnCl_2$) supporté sur des nanoparticules de silice a permis la synthèse des $DHPM_s$ avec 94% au bout de 40 minutes de réaction **[7]**. Y. Cai et coll. **[8]** ont utilisé le chlorure de niobium en combinaison avec un catalyseur organique : le QN-NH_2. Des rendements quantitatifs ont été obtenus (84-99%) à température ambiante en présence du 1,4-dioxane.

III.3 Utilisation des acides de Brϕnsted

A.D. Sagar et coll. **[9]** ont mis en évidence la réaction de Biginelli en utilisant le phenylphosphonique (PPA, 10mol%) comme acide de Brϕnsted, dans le solvant acétonitrile à reflux pendant 8 heures pour accéder à une gamme de DHPMs avec des rendements très élevés.

M.A. Bigdeli et coll. **[10]** ont utilisé l'acide p-dodecylbenzensulfonique (DBSA), ils ont testé l'effet catalytique sur le rendement des produits en changeant les conditions de la réaction. Pour cela ils ont utilisé deux milieux réactionnels : 20mol% du catalyseur dans l'eau à 54°C et 20mol% du catalyseur dans un milieu exempt de solvant à 100°C. Les deux milieux ont été favorables pour un bon déroulement de la réaction, les rendements trouvés ont été excellents, sauf que le temps nécessaire fait la différence. Ils ont remarqué que la réaction en présence d'eau dure plus longtemps.

Plusieurs autres acides de Brϕnsted ont été exploités parmi lesquels on peut citer : l'acide chloroacétique, l'acide p-toluenesulfonique, l'acide phosphotungstique pour donner un rendement de 88-92% en produit DHPMs dans un milieu réactionnel exempt de solvant **[11]**.

III.4 Utilisation de la biocatalyse

Pour une synthèse propre, les chimistes cherchent toujours à introduire des méthodes vertes qui respectent l'environnement et qui sont efficaces en même temps.

B.N. Borse et coll. **[12]** ont utilisé la lipase de Rhizopus Oryzae comme catalyseur bio-organique. Cette lipase (5 mol%) a montré une grande efficacité en présence du solvant eutectique profond (DES (3mL)) à 55°C/4heures, qui est un mélange de chlorure de

choline et de l'urée, ce qui va entraîner une très forte dépression du point de congélation, les propriétés physiques de ce solvant sont semblables aux liquides ioniques.

K. Konkala et coll. **[13]** ont rapporté un protocole nouveau dans la synthèse de Biginelli, en employant comme catalyseur le carbone fonctionnalisé en acide sulfonique à base de bio-glycérol (10mol%), ce catalyseur a permis d'obtenir de très bons rendements après 4 heures de réaction à une température 75-80°C.

III.5 Utilisation des supports solides

H. Lin et coll. **[14]** ont montré que la réaction de Biginelli effectuée dans le méthanol en présence de KSF montmorillonite donne des résultats plus performants que ce soit au niveau du rendement (80-93%) ou du temps réactionnel (8-10h au lieu de 48h).

De même, la condensation effectuée en utilisant la zéolite ($CaAl_2Si_7O_{18}.6H_2O$) comme catalyseur conduit à la formation des $DHPM_s$ avec des rendements de 60 à 87% ,alors pour les aldéhydes aliphatiques réagissent plus lentement et donnent des rendements plus faibles (44-46 %).

De leurs coté, K. Lee et Y. Ko **[15]**, ont préparé une série des $DHPM_s$ en employant l'envirocat comme catalyseur, la comparaison entre les envirocats EPZ10, EPZG et EPIC montre que l'envirocat EPZ10 est le plus efficace. Les réactions menées dans le toluène à reflux donnent de bons rendements avec les aldéhydes aromatiques ainsi que les aldéhydes aliphatiques.

III.6 Utilisation des micro-ondes

De nos jours, l'utilisation des micro-ondes dans les réactions à composants multiples est largement pratiquée en raison de leurs performances à minimiser le temps de réaction, la consommation d'énergie et la production de déchets. De plus, elle offre la simplicité de manipulation et des rendements en produits plus élevés comparés à ceux obtenus par l'utilisation de chauffage conventionnel.

B.K. Banik et coll. **[16]** ont étudié la réaction de Biginelli sous micro-ondes dans un milieu exempt de solvant en présence du nitrate de bismuth pour donner une synthèse verte des DHPMs avec d'excellents rendements après 4 minutes de réaction.

En 2011, Z. Fang et coll. **[17]** ont utilisé la méthode des micro-ondes en présence de l'acide trifluoroacétique pour synthétiser les 5-substitué-3,4-dihydropyrimidin-2-ones/thiones avec de très bons rendements.

De même, Vijayakumar et coll. **[18]** ont montré que $ZrOCl_2$ supporté sur la montmorillomte K10 (ZrOCh /mont K10) est très efficace pour catalyser la réaction de Biginelli sous irradiation micro-ondes sans aucun solvant pour une durée de 30 minutes. Le meilleur rendement (87%) a été obtenu en utilisant le 3-Nitrobenzaldehyde et la thiourée. De la même manière, une synthèse des 3,4-DHPMs et thiones avec un bon rendement en utilisant le 3-(triéthoxysilyl)chlorurepropane-1-ammonium supporté sur silice a été obtenu sous irradiation micro-ondes dans des conditions sans solvant .

III.7 Utilisation des ultrasons

Un simple protocole de synthèse a été mené par Stefani et coll. **[19]** sur la réaction de Biginelli, en utilisant les ultrasons (fréquence : 40KHZ, puissance : 130W, température : 60°C) en présence du chlorure d'ammonium comme acide de Lewis. Après une purification sur colonne (Hexane/Acétate d'éthyle), l'adduit de la réaction est obtenu avec de très bons rendements.

Ji-Taili et coll. **[20]** ont utilisé les ultrasons (fréquence : 40,59KHZ, puissance minimale : 250W) pour la synthèse des 3,4-dihydropyrimidin-2-ones, en présence de l'acide amidosulfonique (NH_2SO_3). Des conditions optimales ont été fixées : éthanol comme solvant à 25-30°C pendant 40 minutes.

III.8 Utilisation des liquides ioniques

Les liquides ioniques constituent une nouvelle classe de solvants qui ont l'avantage de ne pas contribuer à l'émission provoquée par les composés organiques volatils en raison de leurs pressions de vapeur très basse. Ils ont été testés dans la réaction de Biginelli en tant que solvant et catalyseur.

H. Khabazzadeh et coll. **[21]** ont préparé les 3,4-dihydropyrimidin-2-ones, via un sel d'ammonium de l'acide sulfurique $[Et_3NH]$ $[HSO_4]$, qui est un liquide ionique avec un caractère d'un acide doux. La réaction menée à 100°C, dans un milieu sans solvant avec une quantité catalytique (3mmol) de triéthyle ammonium hydrosufate a révélé des rendements qui varient de 75-87% avec des temps de réaction allant de 55-120 minutes.

F. Dong et coll. **[22]** ont proposé une méthode de synthèse en utilisant un liquide ionique dans la réaction de Biginelli à température de 90°C; ce catalyseur recyclable porte un groupe acide sulfonique d'alcane dans un cation trialkyle ammonium acyclique : N^{+}(RcRaRb)$(CH_2)_3SO_3HA^{-}$ [Ra : Me ; Rb : Et ; Rc : n-But ; A : HSO_4]. Les rendements obtenus varient entre 72-94% pour un court temps de réaction (10-15 minutes).

III.9 Les polyoxométallates

Les polyoxométallates ou hétéropolyanions (POMs) sont formées par l'assemblage de métaux de transition de haut degré d'oxydation (Mo^{VI}, W^{VI}, $V^{V,}$ Nb^{V}, …) et de ligands oxo O^{-2}, ces édifices peuvent être classés suivant deux catégories :

- les isopolyanions de formule générale $[MxOy]^{n-}$
- les hétéropolyanions qui en plus des métaux précédents et les ligands oxo, contiennent des hétéroatomes. Ces hétéroatomes peuvent être des métaux de transition (Co^{I}, Fe^{II}, Zn^{II}, CrI^{II}, Cu^{II}, Mn^{IV}, Ni^{II}) ou des éléments des groupes principaux (Al^{III}, P^{V}, As^{III}, As^{V}, Si^{IV}, B^{III}, Ga^{III}, Be^{II},Ge^{IV}, Te^{VI}, I^{VII}, ….). Les travaux sur l'activité catalytique des POM_S sont très nombreux et des procédés industriels importants les utilisent **[23]**.

Ces applications résultent naturellement des propriétés acido-basique et redox des POM_S de sorte qu'ils sont considérés comme des catalyseurs acides au sens de Bronsted et des catalyseurs d'oxydation.

En 2010, Z. Pourghobadi et coll. **[24]** ont utilisé 2 %mol de $H_3PMo_{12}O_{40}$ en présence du chlorure de tryméthylesylile (TMSCl) dans un milieu exempt de solvant à 70°C. Ils ont montré qu'après 15 minutes de réaction, le rendement du produit recherché a atteint 95%.

III.10 Les résines

La catalyse de la condensation de Biginelli par les résines échangeuses d'ions et rapportée dans la littérature, en utilisant :

- La Dowex- 50 **[25]**, qui permet la préparation des $DHPM_s$ N,N-disubstituées.
- Le nafion-H **[26]** et le nafion NR-50 utilisés par Joseph et coll. **[27]** qui ont réalisé la réaction au reflux d'acétonitrile et sous atmosphère d'azote. La réaction donne de bons rendements même avec les aldéhydes aliphatiques (82-85%).

III.11 Les polymères

En 1998 kappe et coll. **[28]** ont effectué la condensation de Biginelli en présence de polyphosphate ester (PPE), une augmentation de 20-40 % de rendement a été obtenue, sauf que le PPE ne peut pas être éliminé et doit être fraichement préparé avant son utilisation. L. Zumpe et coll. **[29]** ont pensé que d'autres réactifs de phosphore ayant des propriétés déshydratantes peuvent être utilisés. En effet .la présence de l'anhydride propanophosphorique (T_3P) dans la condensation de Biginelli peut être un bon substituant.

En 2015, Dhawanpalli et coll. **[30]** ont rapporté une méthode d'obtention des DHPMs (82% à 92%) en présence d'une quantité catalytique de nanocomposite de polymère polyindole-Fe dans des conditions exempts de solvant sous irradiation ultrasonore. En comparaison avec les conditions de réactions classiques de Biginelli, cette nouvelle méthode présente l'avantage d'atteindre d'excellents rendements en DHPMs.

III.12 Utilisation de catalyseurs supports

A coté des réactions classiques en milieu homogène, les chimistes organiciens ont maintenant à leur disposition d'autres méthodes qui reposent sur l'utilisation de milieux polyphasiques. Les réactions réalisées en présence de catalyseurs supportés sont un exemple typique.

Récemment, l'utilisation de SiO_2-$BaCl_2$ autant que catalyseur pour la synthèse des dihydropyrimidinones (thiones) c'est révélée très efficace dans la synthèse de Biginelli. Les avantages de cette méthode : son temps de réaction est court, rendements élevés, dans des conditions sans solvant avec un catalyseur réutilisé **[31].**

Kouachi et coll. **[32]** ont étudié la réaction de Biginelli catalysée par Mo/Al_2O_3 en variant la teneur du molybdène entre 2 et 12 % en poids. Ils ont obtenu de bons rendements en DHPM après une heure de réaction à 100°C dans un milieu exempt de solvant. Un rendement optimal (82%) a été obtenu pour une teneur de 7% Mo avec réutilisation du catalyseur.

J. Roozbeh et coll. **[33]** ont rapporté une méthode d'obtention des 3,4-dihydropyrimidones/thiones en présence d'une quantité catalytique de Bentonite/PS-HSO_3 dans des conditions exemptes de solvant à 120° C pendant 30 minutes.

IV. Mécanisme de la réaction de Biginelli

Le mécanisme de la réaction de condensation de Biginelli a largement été étudié et reste toujours en discussion pour de nombreux chercheurs.

En 1933, Folker et coll. **[34]** ont réalisé la première étude mécanistique de cette réaction qui sera approuvée pendant plus de 40 ans. Ils ont prouvé la formation d'un intermédiaire via la condensation entre un aldéhyde et deux molécules de l'urée (N,N-benzylidenebisurée), ce bis-uréide va ensuite réagir par addition nucléophile avec l'acétoacétate d'éthyle.

En 1973, Sweet et Fissekis **[35]** ont rapporté le mécanisme de la réaction de Biginelli par l'intermédiaire d'un catalyseur acide, où l'aldéhyde et l'acétoacétate d'éthyle réagissent par une condensation aldolique, pour obtenir un carbocation (étape cinétiquement limitante) et par une addition nucléophile de l'urée suivie d'une cyclisation intramoléculaire et déshydratation pour conduire au produit final (Figure I.6).

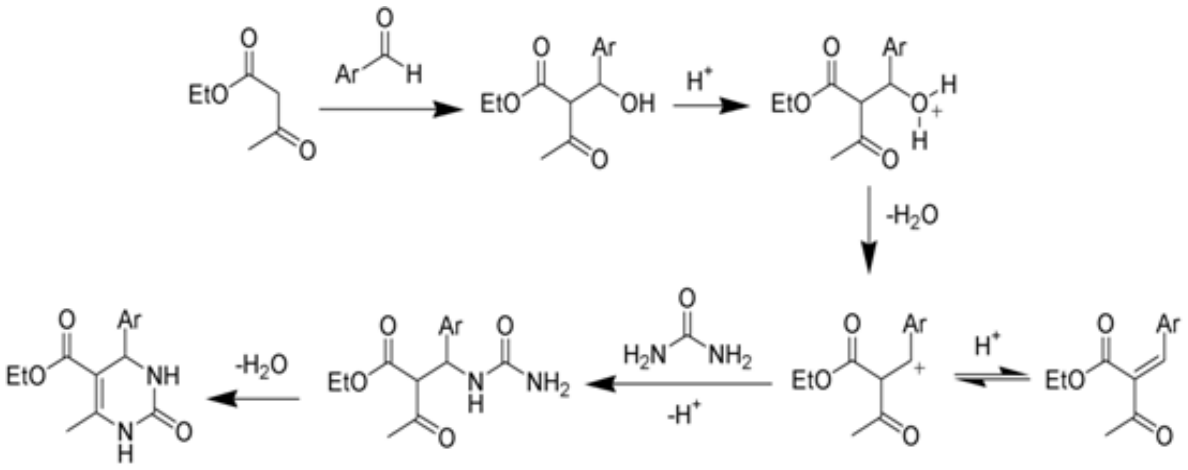


Figure I.6 : Mécanisme réactionnel proposé par Sweet et Fissekis

En 1997, Kappe **[36]** réexamine le mécanisme en s'appuyant sur la RMN du proton et du carbone. Il démontre que la première étape correspond à la formation d'un N-acylimmonium à partir d'une attaque nucléophile de l'urée sur l'aldéhyde, suivie d'une addition nucléophile de l'acétoacétate d'éthyle (Figure I.7).

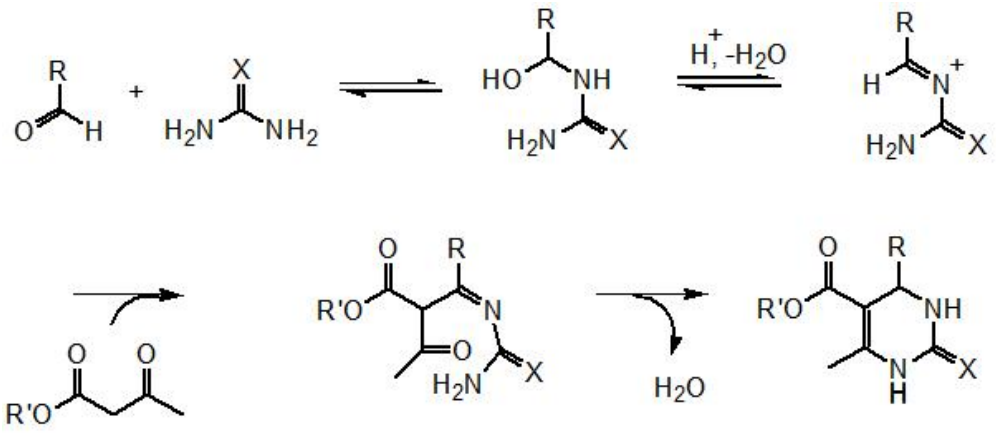


Figure I.7 : Mécanisme réactionnel proposé par Kappe

En 2011, Raj et coll. **[37]** ont rapporté le mécanisme de la réaction de Biginelli en utilisant une base (K_2CO_3) comme catalyseur, et en suivant le déroulement de la réaction par spéctrométrie de masse. Les résultats observés sont les suivants :

- Aucune formation de bis-uréide n'a été observée ce qui exclut la possibilité de la voie bis-uréide.
- Une condensation de Knoevenagel entre l'aldéhyde et l'acétoacétate d'éthyle ne donne pas le produit final désiré.
- Apparition d'un pic détecté par spectrométrie de masse, décrit l'intermédiaire qui confirme une condensation initiale entre l'urée et l'acétoacétate d'éthyle (via 3-ureido-crotonate), suivie d'une attaque du centre nucléophile résultant de la condensation sur l'aldéhyde.

En 2013, P.S. Harikrishnan et coll. **[38]** ont prouvé que la réaction de Biginelli peut être réalisée dans des conditions : sans solvant, par irradiation des micro-ondes et sans catalyseur. L'absence de ce dernier prouve que la première étape n'est pas l'ionisation du β-cétoester, mais plutôt l'intermédiaire résultant de la condensation de Knoevenagel entre l'aldéhyde et l'urée/thiourée qui provoque l'éolisation du β-cétoester (Figure I.8).

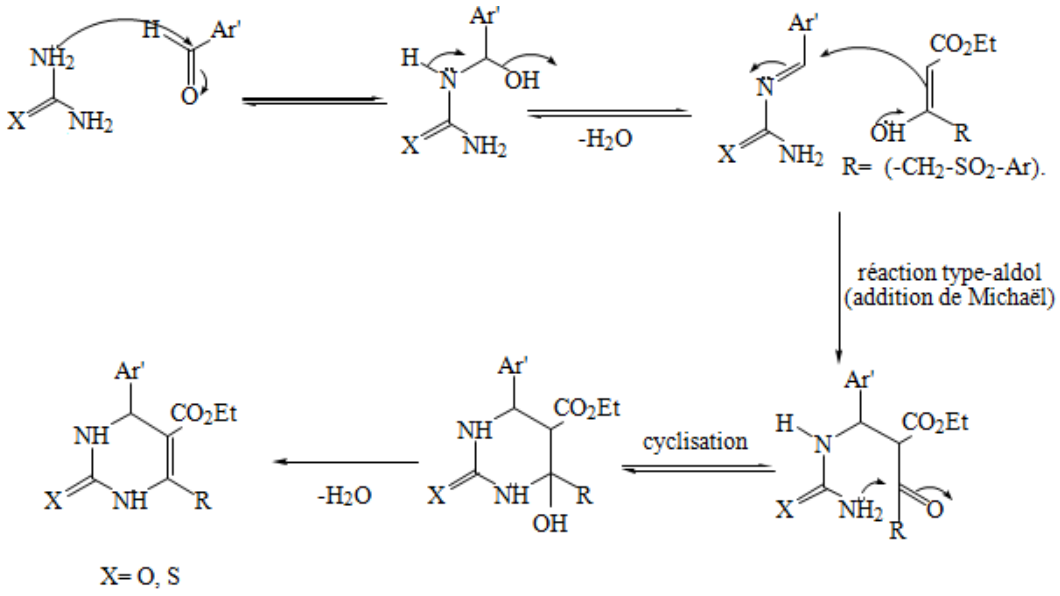


Figure I.8 : Mécanisme réactionnel proposé par Harikrishnan

V. Intérêts biologiques des 3,4-dihydropyrimidin-2-ones et ses dérivés

Le potentiel thérapeutique de cette classe de produit de Biginelli est considérable, il a donné naissance à une variété de produits (DHPMs) utilisés dans le domaine médicinal et pharmacologique. Les DHPMs ont une similarité structurale aux modulateurs de canaux calcique de la catégorie des 1,4-dihydropyridines telle la fameuse Nifedipine (Figure I.9). De même, ces composés manifestent une activité biologique intéressante, vue leurs activités antibactérien **[39]**, anti-inflammatoire **[40]**, anti-tumoral **[41]**, agent anti-hypertensif **[42]**, ainsi que des activités cardiovasculaires **[43]**… qui ont fait l'objet de plusieurs études que nous développons à travers les quelques exemples suivants :

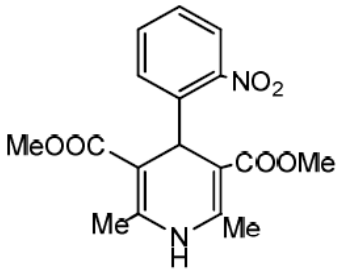


Figure I.9 : Nifedipine

- La 5-(Ethoxycarbonyl)-6-méthyl-4(3-hydroxyphényl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-thione nommé le Monastrol **[44]** (Figure I.10) est une molécule perméable qui a conduit au développement de nouveaux médicaments anticancéreux. L'activité du Monastrol consiste en l'inhibition spécifique et réversible de la moitié de Kinésie mototique Eg5. Il a été identifié comme un composé qui affecte précisément la division cellulaire (mitose) par un nouveau mécanisme qui n'implique pas le ciblage de la tubuline.

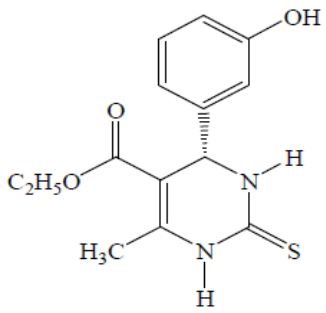


Figure I.10 : Monastrol

Les molécules comportant le groupement nitro comme substituant, possèdent un large spectre d'activité antibactérienne, et ont tendance à supprimer les radicaux libres (Figure I.11).

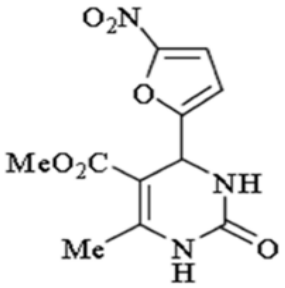
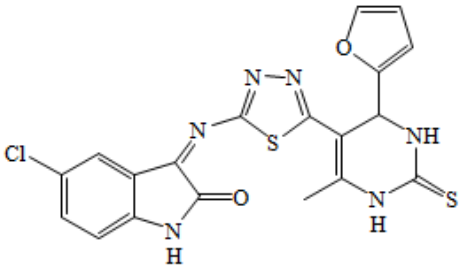
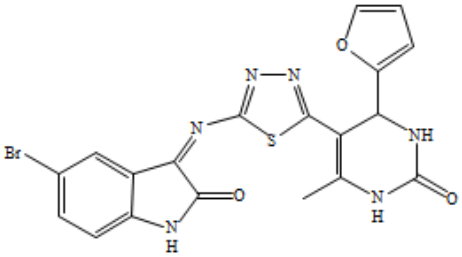
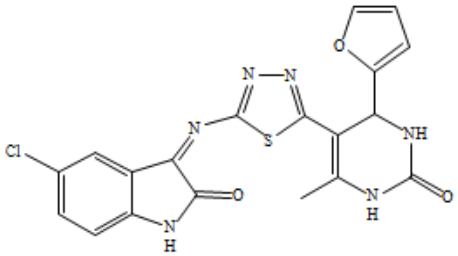
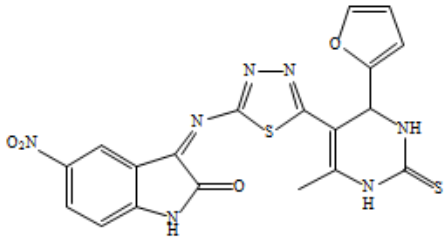
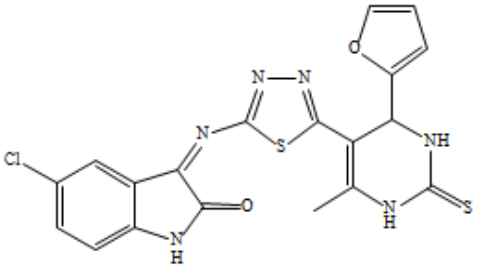
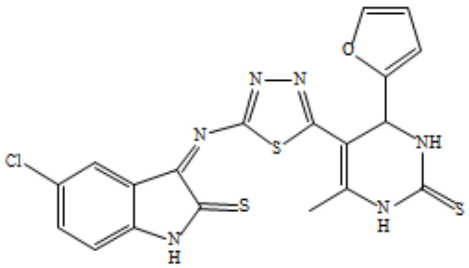


Figure I.11 : 6-méthyle-4-(5-nitrofuro-2-yl)-2-oxo-3,4-dihydropirimidine-5-carboxylate de méthyle

- Arkhaja et coll. **[45]** ont étudié l'activité antifongique et antimicrobienne sur une série de produits issue de la réaction de Biginelli. Quatre produits ont montré une excellente activité contre tous les microbes et les souches fongiques utilisées, il s'agit des molécules suivantes :

- En 2012, Arkhaja et coll. **[45]** ont continué et développé leurs recherches sur l'activité antituberculeuse des 1,3-dihydro-2H-indol-2-ones. Parmi une série de composés, deux produits qui sont le 5-chloro-3-(-5-(4-(furan-2-yl)-6-méthyl-2-oxo/thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-ylimino)indolin-2-one ont prouvé une excellente activité contre le M. tuberculose $H_{37}Rv$, avec un pourcentage d'inhibition de 99% pour les deux produits ci-dessous :

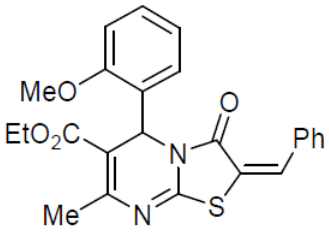



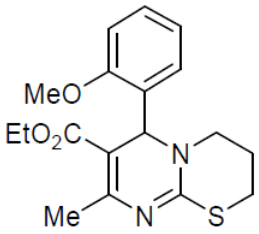
- Chavda et coll. **[46]** ont réalisé une étude sur l'activité antioxydante de trois produits de Biginelli. Ils ont montré que cette activité est toujours en rapport avec l'électronégativité des substituants du cycle dihydropyrimidine. Le composé avec le groupe NH est le plus antioxydant que celui avec l'élément 'S', et ce dernier et plus actif que celui avec l'élément 'O'.

- Des composés DHPMs simples ont été examinés, pour leurs efficacités entant qu'agents anti-tumoraux et également pour une activité contre la maladie de Walker observée chez les rats et les souris **[47, 48]**. L'activité anti-carcinogénique des 6-méthyl-4-phényl-2-thoixo-1,2,3,4-terahydropyrimidine-5-carboxamides à été également étudiée **[47]** alors que d'autres sont rapportés comme agent d'une activité inhibitrice d'agrégation de plaquettes de sang **[48]** et de la prise de l'adénosine par les thrombocytes **[49]**.

- Le nombre de publications et brevets traitant l'activité cardiovasculaire des dihydropyrimidines s'est développé rapidement. Les esters β,α–aminoéthyle ont une activité cardiovasculaire modérée **[50]**.

- On a rapporté également que les DHPMs, tel les molécules données ci-dessous : 2-benzylidène-5-(2méthoxyphényl)-7-méthyl-3-oxo-3,5-dihydro-2H-thiazolo[3,2-a]-pyrimidine-6-carboxylated'éthyle(FigureI.13) et le 6-(2-méthoxyphényl)-8-méthyl-2,3,4,6-tetrahydropyrimido[2,1-b]-[1,3]thiazine-7-carboxylate d'éthyle, ont prouvé une activité anti-inflammatoire **[51-52]**.





Récemment, le 2-(diméthylamino)éthyl-2-(2,6-dihchlorophényl)-5-(2méthoxyphényl) 7-méthyl-5*H*-thiazolo[3,2-a]pyrimidine-6-carboxylate a montré une très bonne activité antagoniste des récepteurs de glutamate du groupe 2-amicromolar **[53]**. L'activité fongicide envers l'*Ochraceus d'Aspergille noir* a été confirmée pour des 2-thioxo-3,4-dihydropyrimidinones simples **[54]**. Un brevet récent a révélé la relation entre les structures des DHPMs avec l'activité antagoniste du neuropeptide Y(NPY) **[55]**.

Références bibliographiques

[1] A. Hantzsh, J. Liebigs, Annal. Chem. 215 (**1882**) 1.

[2] P. Biginelli, Gazz. Chim. Ital. 23 (**1893)** 360.

[3] D.A. Liberto, S.P. Silva, A. Fatima, S.A. Fernandes, Tetrahedron 69 **(2013)** 8245.

[4] B.Vijayacumar, G.R. Rao, J. Porou, Mater.,19 **(2012)** 491.

[5] J.T. Starcevich, T.J. Langhlin, R.S. Mohan, Tetrahedron Lett., 54 **(2013)** 983.

[6] H.R. Memarian, M.J. Ranjbar, Chin. Chem. Soc., 58 **(2011)** 522.

[7] Y. Cai, H. Yang, L. Li, K. Jiang ,G. Lai, Jiang, L. Xu, J. Eur. Org. Chem., **(2010)** 498.

[8] Z,N, Siddiqui, C.R. Chimie,16 **(2013)** 183.

[9] A.D. Sagar, S.M. Reddy, J.S. Pulle, M.V.J. Yadav, Chem. Pharm. Res., 3 **(2011)** 649.

[10] M.A. Bigdeli, G. Gholami, E. Sheikhhosseini, Chin. Chem. Lett**.,** 22 **(2011)** 903.

[11] Y.Yu, D. Liu, Ch. Liu, G.Luo, G. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17 **, (2007**), 3508.

[12] B.N.Borse, V.S. Borude, S.R. Shukla, Current. Chem. Lett., 1 **(2012)** 59 .

[13] K. Konkala, N.M. Sabbavarapu, R. Natla, N.Y.V. Durga, V.K.T. Reddy, B.L.A.P. Devi, R.B.N. Prasad, Tetrahedron Lett., 53 **(2012)** 1968.

[14] H.Lin, J. Ding, X .Chen, Z .Zhang, Molecules, 5 **(2000)** 1240.

[15] K .Y.Lee, K .Y .Ko.Bull, Korean. Chem.Soc**.,** 25 **(2004)** 12.

[16] B.K. Banik, A.T. Reddy, A. Datta, C. Mukhopadhyay, Tetrahedron Lett., 48 **(2007)** 7392.

[17] Z.Fang, Y.Lam, Tetrahedron Lett**.,** 67 **(2011)** 1294.

[18] B. Vijayakumar, G.R .Rao, J.Porous. Mater., 19 **(2012)** 491.

[19] H.A. Stefani, C.B.Oliviera, R.B. Almeida, C.M.P. Pareira, R.C.Braga, R. Cella, V.C. Borges, L. Savegnago, C.W. Nogueira, J. Eur. Med. Chem., 41 **(2006)** 513.

[20] J.T. Li, J.F. Han, J.H.Yang, T.S. Li. Ultrason Sonochem,10 **(2003)** 119.

[21] H.Khabazzadeh, E.T. Kermani, T. Jazinizadeh, J. Arab. Chem., 5 **(2012)** 485.

[22] F. Dong, L. Jun, Z. Xinli , Y. Zhiwen, L.J.Mol. Zuliang, A.Catal. Chem., 274 **(2007)** 208.

[23] S. Lacombe, C. Geantet, J. Mirodatos, Catal., 151 **(1994)** 439.

[24] Z. Pourghobadi ,F. Derikvand, Chin.Chem. Lett., 21 **(2010)** 269.

[25] K. Singh, D. Arora, S. Singh, Tetrahedron Lett., 47 **(2006)** 4205.

[26] J.S. Yadav, B.V.S. Reddy, E.J. Reddy, T. Ramalingam, J. Chem. Res., 7 **(2000)** 354.

[27] J.S. Joseph, S.L. Jain, B. Sain, J. Mol. A. Catal. Chem., 247 **(2006)** 99.

[28] C.O. Kappe, S.F. Falsone, Syn. Lett., 7 **(1998)** 781.

[29] F.L. Zumpe, M, Flub.K , A. Schimtz, Lander. Tetrahedron Lett., 48 **(2007)** 1421.

[30] V. Poleshittiwar, R.S. Varma, Tetrahedron Lett., 48 **(2007)** 7343.

[31] F. Hatamjafari, J. Appl. Chem. Researc., 9 **(2015)** 95.

[32] K. Kouachi, G. Lafaye, S. Pronier, L. Bennini, S. Menad, J. Mol. Catal. A: Chem., 395 **(2014)** 210.

[33] J. Roozbeh, R. Ahmad, D. Behnam , Applied Clay Science., 55 **(2012)** 1.

[34] K. Folkers, T.J. J. Johnson. Am. Chem. Soc. 55 (**1933)** 3784.

[35] F. S . Sweet, J. D. J . Fissekis, Am. Chem. Soc. 95 **(1973)** 8741**.**

[36] C.O.J . Kappe, Org. Chem. 62 **(1997)** 7201.

[37] M.K. Raj, H.S.P. Rao, S.G. Manjunatha, R. Sridharan, S. Nambiar, J. Keshwan, J. Rappai**,** S. Bhagat, B.S. Shwetha, D. Hegde, U. Santthosh, Tetrahedron Lett**.** 28 **(2011)** 3605.

[38] P.S. Harikrishnan, S.M. Rajeh, S. Perumal, A.I. Al-Mansour, Tetrahedron Lett. 54 **(2013)** 1076.

[39] C.O. Kappe. Eur. J. Med. Chem., 35 **(2000)** 1043.

[40] A. Dondoni, S. Massi,V. Sabbatini, J. Bertolasi, Org. Chem**.,** 67 **(2002)** 6979.

[41] C.O. Kappe, O.V. Shishkin, G. Aray, P. Verdino, Tetrahedro 56 **(2000)** 1859.

[42] G. Bicker, J. Wyvratt, J. Chromatogr., 958 **(2002)** 69.

[43] K. Flokers, J. Am. Chem. Soc., 37 **(1933)** 3784.

[44] D. Gong, L. Zhang, C. Yuan, Heteroatom. Chem., 14 **(2003)**13.

[45] T.N . Akhaja, J.P. Raval, Chin. Chem. Lett., 23 (**2012)** 446.

[46] D.R. Chavda, P.R. Modiya, H.M. Marvaniya, D.J. Sen, J. Int. Drug. Dev. Res., 2 **(2010)** 348.

[47] D.S. Bose, R.K. Kumar, L. Fatima, Synlett., 279 **(2004)** 456.

[48] D. Gohain, J. Prajapati, S. Sandhu, Synlett., **(2004)** 235.

[49] I. Mc, L. Donald, L. E. Overmane, J. Org. Chem., 64 **(1999)** 1520.

[50] M.C. Elliott, M.S. Long, Tetrahedron Lett., 43 **(2002)** 9191.

[51] F. Cohen, S.K. Collins, L.E. Overman, Org. Lett**.,** 5 **(2003)** 4485.

[52] D.S. Coffey, L.E. Overman, F. Stappenbeck, J. Am. Chem. Soc., 122 **(2000)** 4904.

[53] A. Dondoni, S. Massi, Sabbatini, Tetrahedron Lett., 42 **(2001)** 4495.

[54] A. Dondoni, E. Massi, S. Minghini, V. Sabbatini, J. Bertolasi, Org. Chem., 68 **(2003)** 6172.

[55] A. Dondoni, S. Massi, V. Sabbatini, J. Bertolasi, Org. Chem., 67 **(2002)** 6979.

I. TECHNIQUES DE CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE

I.1 Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince se base sur le phénomène d'adsorption par dépôt d'un mélange liquide sur un support solide finement divisé (phase stationnaire). De sorte que les constituants du mélange sont entraînés via un solvant (phase mobile) par capillarité le long du support. Cette technique analytique rapide et peu couteuse reste à elle seule insuffisante pour l'identification du produit mais elle apporte des renseignements permettant de s'orienter sur la structure moléculaire.

Dans notre étude, la CCM a été utilisée pour déterminer le temps nécessaire pour atteindre la fin d'une réaction. Elle a été réalisée sur des plaques en verre recouvertes de gel de silice 60F254 (épaisseur : 0,2 mm) avec un éluant constitué d'un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole : 80/20 (v/v). La révélation des tâches se fait à l'aide d'une lampe UV à 254 nm.

Chaque composé est défini par son R_f, qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant. Il permet donc de s'assurer de la nature d'un composé en le comparant avec un produit de référence :

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

Une même espèce migre à des hauteurs identiques dans des conditions identiques. Pour le benzaldéhyde : $R_f = 0,8$ et pour l'urée : $R_f = 0,8$

I.2 Température de fusion (T_f)

La température de fusion est une grandeur caractéristique d'un corps pur. En effet, la comparaison de la température de fusion d'un produit synthétisé avec les données de la littérature permet d'avancer l'hypothèse de la pureté d'un produit.

Dans notre étude, la technique du tube capillaire a été adoptée, elle consiste à introduire le solide sous forme de poudre, dans un tube de 1 mm de diamètre intérieur de façon à former une colonne de 2 à 3 mm de hauteur. Le tube capillaire contenant le solide est par la suite

fixé sur la partie inférieure du thermomètre, puis introduit dans un bain d'huile (Figure II.1). On fait chauffer le bain à l'aide d'un bec benzène de la température ambiante jusqu'à la température à laquelle le solide disparait complètement. Cette température représente ainsi la température ou le point de fusion du produit.

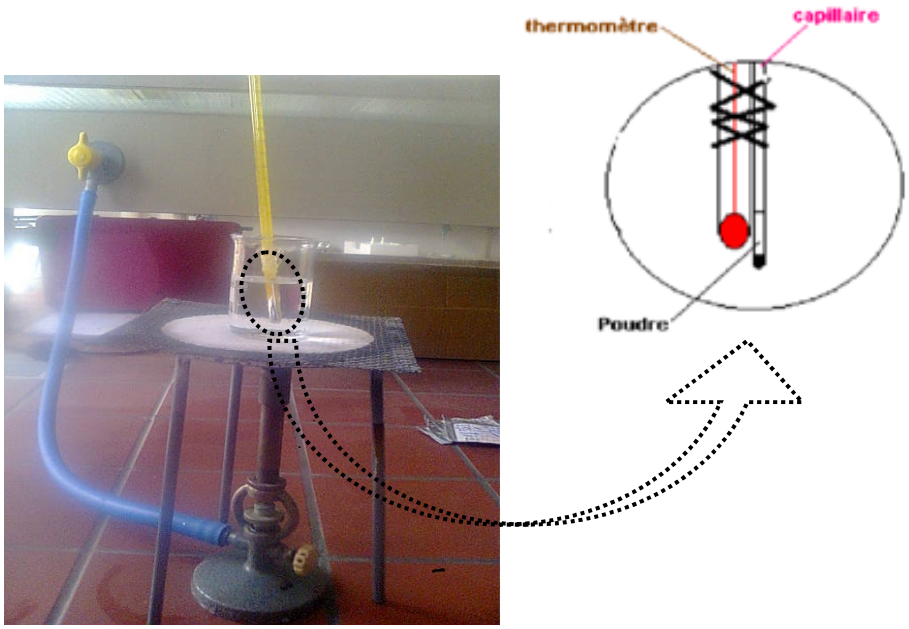


Figure II.1 : Dispositif utilisé pour déterminer la température de fusion

I.3 Spectroscopie Infra-Rouge (IR)

La spectroscopie infrarouge est l'une des méthodes utilisées pour l'identification des molécules organiques et inorganiques à partir de leurs propriétés vibrationnelles en complément d'autres méthodes (résonnance magnétique nucléaire (RMN) et spectroscopie de masse (SM)). En effet, le rayonnement infrarouge excite des modes de vibration : déformation, élongation spécifiques des liaisons chimiques. La comparaison entre le rayonnement incident et transmis à travers l'échantillon suffit par conséquent à déterminer les principales fonctions chimiques présentes dans l'échantillon. L'interprétation d'un spectre IR permet de détecter la présence ou l'absence de groupes fonctionnels et identifier ainsi un composé.

Les spectres infrarouges sont enregistrés sur un spectromètre à transformé de Fourier type Shimadzu au sein du laboratoire d'analyse N°12 (SAA-IR-UV-CPG) du

département de Génie des Procèdes de la Faculté de Technologie de l'Université de Bejaia. Avant chaque analyse spectroscopique, le produit solide est préparé sous forme de pastille. Pour cela, le solide à l'état poudreux (0,02 g) est mélangé avec du KBr (0,8 g), le tout est broyé dans un mortier, puis comprimé sous pression (95 KN/m^2) pour former de fines pastilles. Cette dernière est positionnée dans un porte échantillon qui est introduit dans la cellule infrarouge. Après stabilisation de la pression, le spectre IR enregistré correspondant au domaine de vibration des molécules (compris entre 4500 cm^{-1} et 500 cm^{-1}) est enregistré.

II. TEST CATALYTIQUE : REACTION DE BIGINELLI

II.1 Description du montage

Le montage mis en place pour la réaction de Biginelli illustré sur la Figure II.2 se compose d'un ballon en verre (50 mL) fixé à l'aide d'une pince à la potence. D'un bain d'huile, posé sur une plaque chauffante, dont lequel on introduit le ballon. D'un réfrigérant à air connecté au ballon et d'un thermomètre fixé à son tour par une pince à la potence et placé au voisinage proche du ballon, ceci permettra le contrôle de la température au degré prés.

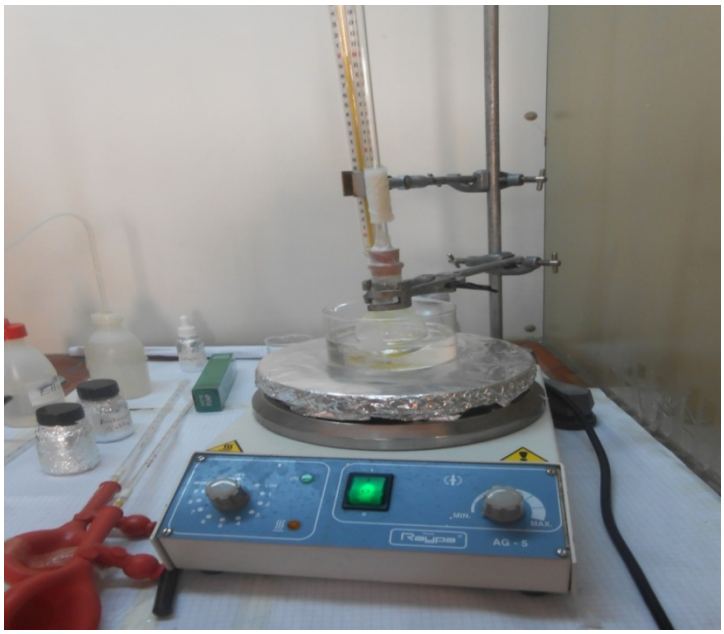


Figure II.2 : Montage de la réaction multicomposant de Biginelli

II.2 Mode opératoire

On introduit dans un ballon, muni d'un barreau magnétique, une quantité définit de réactifs benzaldéhyde/acétoacétate d'éthyle/urée : 1/1/1,5 mmol en présence d'une masse catalytique de $Sr(NO_3)_2$. Le mélange est bien homogénéisé avant de relier le ballon au système à reflux puis plongé dans le bain d'huile est porté à la température de réaction sous agitation continue. L'instant correspondant au temps zéro de la réaction est le moment même où le ballon est introduit dans le bain. Après une heure de réaction, le mélange réactionnel est ramené à la température ambiante avant d'être lavé à l'éthanol chaud et placé dans un bain de glace pour faire précipiter le produit. Le solide formé est filtré et purifié par recristallisation dans l'éthanol pour donner un produit supposé analytiquement pur. Ce dernier est par la suite séché à l'étuve à 100°C pendant 24 heures avant d'être pesé pour le calcul du rendement.

II.3 Exploitation des résultats

Le produit obtenu est analysé par la prise de sa température de fusion et par spectroscopie IR. Les résultats obtenus sont comparés à ceux donnés dans la littérature.

A signaler que le rendement en produit est calculé sur la base du réactif limitant. Dans notre cas le réactif limitant est le benzaldéhyde.

II.4 Produits chimiques

Les produits utilisés au cours de la réaction sont regroupés dans le Tableau II.1

Tableau II.1 : Caractéristiques des produits

Produits	Formule/ Fournisseur	Pureté (%)/M(g/mol)	Température fusion (ébullition) (°C)
Benzaldéhyde*	C_7H_6O/ Riedel-de Haen	99/106,12	-26 (178)
Acétoacétate d'éthyle*	$C_5H_8O_3$/Fluka	98/130,14	-45 (181)
Urée	$CO(NH_2)_2$/Panreac	98/60,06	132 (-)
Thiourée	$CS(NH_2)_2$/ChemSpider	97,9/76,12	177
Ethanol*	C_2H_5OH/Biochem	99/46,07	-114 (78)
Chlorobenzaldehyde	ClC_7H_5O/Aldrich	97/140,57	9-11 (213)
Hydroxybenzaldehyde	HOC_7H_5O/Aldrich	98/122,12	117 (310)
Nitrobenzaldehyde	$NO_2C_7H_5O$/Aldrich	98/151,12	103-106 (300)
Nitrate de strontium	$Sr(NO_3)_2$/Aldrich	99/211,63	570 (645)

(*) : Les produits sont à l'état liquide ; M : masse molaire

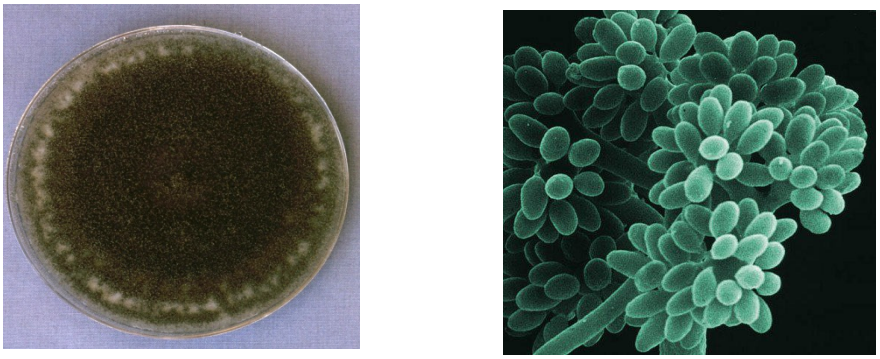
III. TEST BIOLOGIQUE : ACTIVITE ANTIFONGIQUE

III.1 Généralité sur les souches fongiques étudiées

a) *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea est un champignon phytopathogène, ubiquiste, responsable de la pourriture grise. C'est un microorganisme polyphage qui cause d'énormes dégâts en agriculture. La maladie causée par cet agent pathogène est économiquement redoutable et importante car ce champignon attaque plus de 230 espèces de plantes (Figure II.3). Sur des cultures maraîchères, viticoles et horticoles, en pré- ou en post-récolte, cette maladie conduit à des pertes importantes de rendements **[1]**. Ce champignon produit des conidies (Figure II.4) qui se manifestent par la production de conidiophores dressés en touffes souvent étendues, constituant un feutrage intense gris **[2]**.

Figure II.3 : Symptômes causés par l'agent pathogène *Botrytis cinerea*



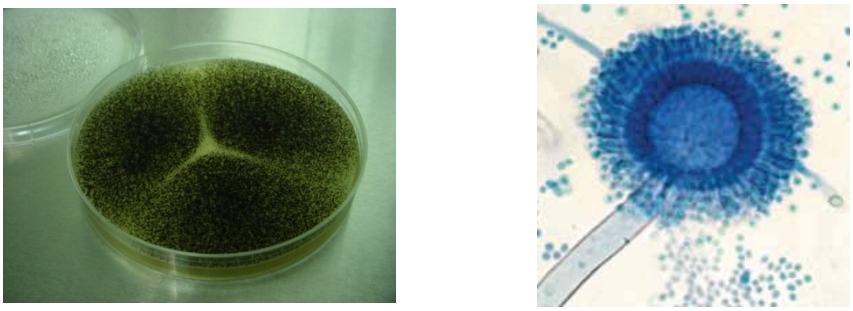
(A) (B)

Figure II.4 : *Botryis cinerea* cultivé sur PDA (aspect macroscopique (A) et microscopique (B) [4]).

b) *Aspergillus*

Aspergillus est un champignon filamenteux (ou moisissure) de la classe des ascomycètes qui se développe par un système de filaments (hyphes), puis forme des spores qui seront disséminées par l'air ou par l'eau. Il est présent sur les détritus organiques en décomposition, le sol, les denrées alimentaires et les céréales. Le mode de reproduction est asexué: la multiplication est strictement végétative. On le retrouve dans les liquides (en particulier les climatiseurs, les humidificateurs d'air, …) et dans les établissements hospitaliers. Les maladies aspergillaires sont provoquées à 80-90% par *Aspergillus famigatus* responsable de la mycose pulmonaires **[3]**. Par ordre décroissant, on trouve *Aspergillus flavus* (responsable d'aspergilloses bronchiques allergiques), *Aspergillus niger* (responsable de l'aspergillose du conduit auditif), *Aspergillus nidulans* et plus rarement *l'Aspergillus terreux*.

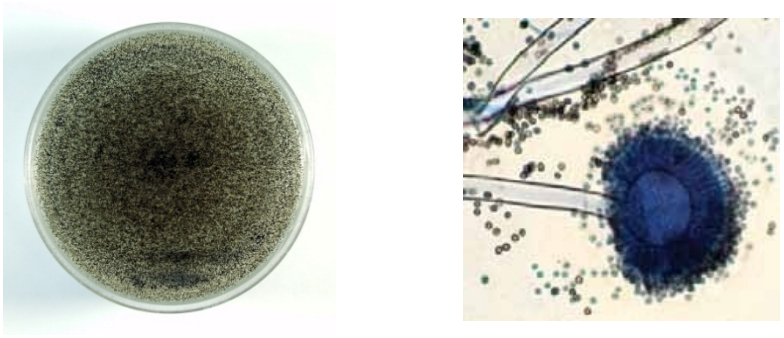
b-1) *Aspergillus flavus* : Ce champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (Malt agar, Sabouraud et PDA) à 22-25°C avec une croissance optimale à 30°C. Il forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, jaunes, puis vert-jaune à maturité (Figure II.5).



(A) **(B)**

Figure II.5 : *Aspergillus flavus* cultivé sur PDA (aspect macroscopique (A) et microscopique (B) [5])

b-2) ***Aspergillus niger*** : Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux classiques. La température de croissance varie entre 25 et 30°C, mais peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies formées sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et à maturité elles deviennent noires (Figure II.6).



(A) **(B)**

Figure II.6 : ***Aspergillus niger*** **cultivé sur PDA (aspect macroscopique (A) et microscopique (B) [5])**

Dans le présent travail, les souches utilisées sont fournies par le Laboratoire de Mycologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Béjaia. Elles sont isolées, purifiées et identifiées en se référant sur une base de données GenBank.

- *Botrytis cinerea* : AF478349
- *Aspergillus flavus* : NRRL3357
- *Aspergillus niger* : MTCC1344

Ces souches sont conservées à 4°C dans des boites pétris et repiquées dans des boites Pétri contenant 15-20mL du milieu PDA.

III.2 Préparation du milieu de culture

Le PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) est l'un des milieux usuels de culture pour l'entretien des souches fongiques. Les étapes suivies pour sa préparation sont :

- Dissoudre 39 g de poudre PDA (Difco ; pH = 5,6) dans un volume d'un litre d'eau distillée.

- Porter la solution sous une agitation jusqu'à dissolution totale du PDA.

- Distribuer le milieu dans des flacons puis les mettre dans l'autoclave pour la stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

III.3 Préparation de l'inoculum

Les souches de *Botrytis cenerea*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* sont ensemencées stérilement dans des boites Pétri contenant du milieu PDA. Au bout de trois à 10 jours d'incubation à 30°C pour les *Aspergillus* et à 21°C pour *Botrytis*, les spores apparaissent à la surface du tapis mycélien. Celles-ci sont récupérées, à l'aide d'un râteau étaleur en versant de l'eau distillée stérile à l'intérieure des boites puis elles sont dénombrées grâce à la cellule de Malassez (Figure III.7). La suspension sporale est ensuite diluée de façon à obtenir une concentration de l'ordre de 10^6 spores.mL^{-1} en appliquant la formule : $C= n/N*10^5$ (C : concentration de la solution sporale ; n : nombre de spores calculé ; N : nombre de rectangle de la cellule Malassez).

Figure III.7 : Etapes de la préparation de l'inoculum de l'*Aspergillus niger*

III.4 Ensemencement par écouvillonnage

L'étape d'ensemencement vise à favoriser la multiplication des spores sur un milieu nutritif. Pour ce faire nous avons respecté les étapes suivantes :

- Plonger l'écouvillon stérile dans la suspension (inoculum ajustée 10^6 spores.mL^{-1})
- Ensemencer la totalité de la surface de la boîte Pétri en frottant par stries (Figure III.8).

Figure III.8 : Ensemencement du milieu PDA par l'inoculum des différentes souches

III.5 Test de l'agent antifongique

Un certain nombre de méthodes sont disponibles pour tester la sensibilité des organismes (naturels ou synthétiques) à des agents antimicrobiens ou antifongiques. Parmi elles on trouve :

a- La méthode des disques : cette méthode est basée sur le principe que des disques stériles, imprégnés de solution d'agents antifongiques, sont déposées sur la boite de Pétri préalablement ensemencée de la souche testée (Figure II.9). L'efficacité de la solution se traduit par la formation d'une zone d'inhibition autour du disque.

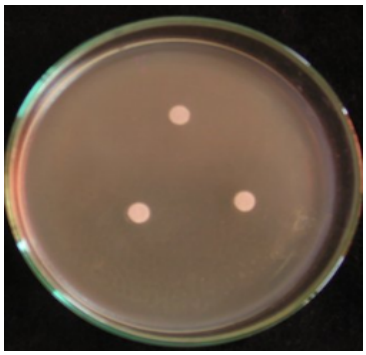


Figure III.9 : Disques stériles disposés sur milieu PDA préalablement ensemencé par l'inoculum étudié

b- La méthode des puits : cette méthode repose sur le principe que des puits sont réalisés à l'aide d'un emporte pièce stérile sur le milieu de culture ensemencé de la souche à tester. Des extraits de produits antifongiques à des concentrations connues, qui sont par la suite introduites à l'intérieur des puits au fond desquels une goutte de gélose blanche est déposée à fin d'éviter la diffusion des extraits au fond des boites (Figure II.10).

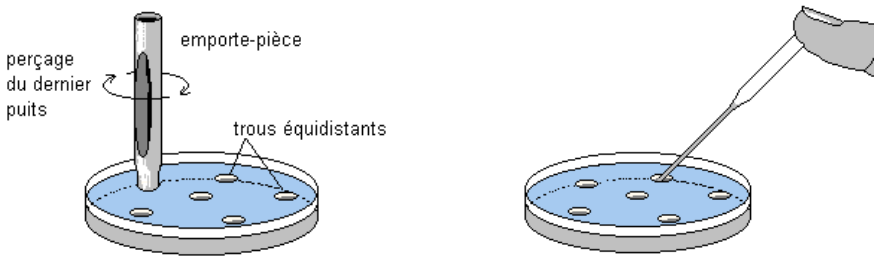


Figure III.10 : Puits réalisés sur le milieu PDA ensemencé par l'inoculum étudié.

c- La méthode de spots : dite aussi méthode de microgouttes, elle consiste à déposer des petits volumes (5 à 20 µL) de la solution d'agents antifongique à testé sur le milieu de culture ensemencé.

III.6 Mesure de l'activité antifongique

L'identification de l'activité antifongique est effectuée via une lecture directe en observant et mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques ou des puits après 48 heures (Figure III.11).

Figure III.11 : Détermination de l'activité antifongique

Références Bibliographiques

[1] M.L. Gullino,. Chemical control of *Botrytis* spp, **1992** (p. 217-222), in: Recent advances in *Botrytis* research. K. Verhoeff, N. E. Malathrakis and B. Williamson, eds. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands.

[2] G.Holz, S. Coertze, and B. Williamson,. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces, **2004** (p.9-27), in: *Botrytis*: biology, pathology and control. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, the Netherlands.

[3] M. T. Hedayati, Denning, Microbiology. A. C. Pasqualotto, P.A. Warn, P. Bowyer, 153 (**2007)** 1677.

[4] S. Ajouz , Thèse de Doctorat « Estimation du potentiel de résistance de Botrytis cinerea à des biofongicides ». Université d'Avignon et des pays de Vaucluse **(2009).**

[5] T**.** Cristina, Thèse de Doctorat « Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des Mycotoxines».université de Bucarest **(2007).**

Dans ce chapitre, nous allons décrire l'ensemble des résultats obtenus dans les deux parties suivantes :

- Etude de la réaction de Biginelli catalysée par $Sr(NO_3)$, regroupant l'optimisation des conditions opératoires, l'effet de la quantité des réactifs et la synthèse de quelques dérivés de la DHPM.
- Etude de l'activité antifongique des produits de Biginelli.

I. ETUDE DE LA REACTION DE BIGINELLI CATALYSEE PAR $Sr(NO_3)_2$

L'objectif de cette première partie de notre étude repose sur la variation des conditions opératoires pour la réaction de Biginelli catalysée par le nitrate de strontium, catalyseur type acide de Lewis.

Il est à noter d'après notre étude bibliographique qu'il y a seulement deux articles qui ont étudié le strontium comme catalyseurs de la réaction de Biginelli. Le premier groupe a rapporté la préparation des DHPMs par l'emploi de SrM_2 (M : (NO_3), (SO_4) et Cl). Ils ont montré que la réaction catalysée par $Sr(NO_3)_2$ (0,1 mmol) en présence du solvant AcOH (acide acétique glacial) après 6 heures de réaction donne les meilleurs rendements en produits de Biginelli (~ 80%) **[1]**. Le second groupe a préparé une large variété de dihydropyrimidinones avec d'excellents rendements (97%) via l'usage de $Sr(OTf)_2$ **[2]**. Notre contribution dans la cyclocondensation à trois composants de Biginelli se base sur l'utilisation de $Sr(NO_3)_2$ comme catalyseur utile et à moindre coût suivant un procédé expérimental exempt de solvant. Dans le but d'effectuer cette condensation par une méthode la plus proche de la chimie verte, des séries de réactions ont été réalisées sous des conditions réactionnelles différentes.

I.1 Optimisation des conditions opératoires

Au début de notre étude, nous avons fait réagir 1 équivalent de benzaldéhyde avec 1 équivalent d'acétoacétate d'éthyle et 1,5 équivalent d'urée en présence de 0,1 mmol de nitrate de strontium, pendant 1 heure à 100°C. Les résultats obtenus, illustrés dans le Tableau III.1, montre dans un premier temps l'effet promoteur du catalyseur dans la cyclocondensation des trois réactifs de Biginelli. En effet la présence de l'acide de Lewis Sr^{2+} permet d'obtenir le produit DHPM avec un rendement modéré de 44% (Entrée 2, Tableau III.1) comparé au faible rendement de 30% obtenu dans les mêmes conditions

après 5 heures de test en l'absence de catalyseur (Entrée 1, Tableau III.1). La réaction a été suivie par chromatographie sur couche mince (CCM). D'autre part, on peut constater qu'une quantité de 0,1 mmol de $Sr(NO_3)_2$ se révèle suffisante pour compléter cette réaction dans ces conditions opératoires, de sorte que l'utilisation d'une quantité plus basse ou plus élevée (Entrées 2 et 4 respectivement) à 0,1 équivalent n'est pas avantageuse sur le rendement en DHPM.

Tableau III.1 : Effet de la quantité de catalyseur $Sr(NO_3)_2$ sur le rendement en DHPM synthétisée via la réaction de Biginelli [a].

Entrée	Catalyseur (mmol)	Rendement[b] (%)
1	-	30,61[*]
2	0,05	42,38
3	0,10	57,76
4	0,20	57,64

[a] Conditions de la réaction : benzaldéhyde/acétoacétate d'éthyle/urée : 1/1/1,5 mmol ; 1 h ; 100°C ; sans solvant.

[b] Rendement isolé des produits après recristallisation

[*] 5 heures de réaction

Au vu d'améliorer le rendement en produit de Biginelli, nous avons étudié l'effet de la température de réaction en présence du benzaldéhyde/acétoacéte d'éthyle/urée/strontium dans les proportions 1/1/1,5/0,1 molaire respectivement. Il ressort des résultats représentés sur la Figures III.1, que le rendement en DHPM augmente avec la température de réaction de l'ambiante jusqu'à 120°C puis diminue légèrement pour se stabiliser à partir de 130°C. Ainsi, cette variation de paramètre de température nous a permis d'améliorer la cyclocondensation de Biginelli est d'atteindre un meilleur rendement en DHPM (66%) à une température de 120°C. A l'issu de ces résultats nous avons voulu vérifier l'effet de la quantité catalytique au cours de la réaction à 120°C. Les résultats obtenus ont montré que 0,1 mmol en strontium reste une quantité suffisante pour compléter la cyclocondensation de Biginelli après 1 heure de réaction (Entrées 1-3, Tableau III.2). D'autre part, il apparait inutile de laisser la réaction tourner au delà d'une heure. En effet, selon le suivi de cette réaction, dans les mêmes conditions, montre que la conversion des réactifs ne change plus passé ce temps (Entrées 4-6, Tableau III.2). De plus, la conséquence évidente d'un temps

de réaction plus long pourrait probablement entrainer une dégradation du produit et/ou la formation de produits secondaires **[3]**.

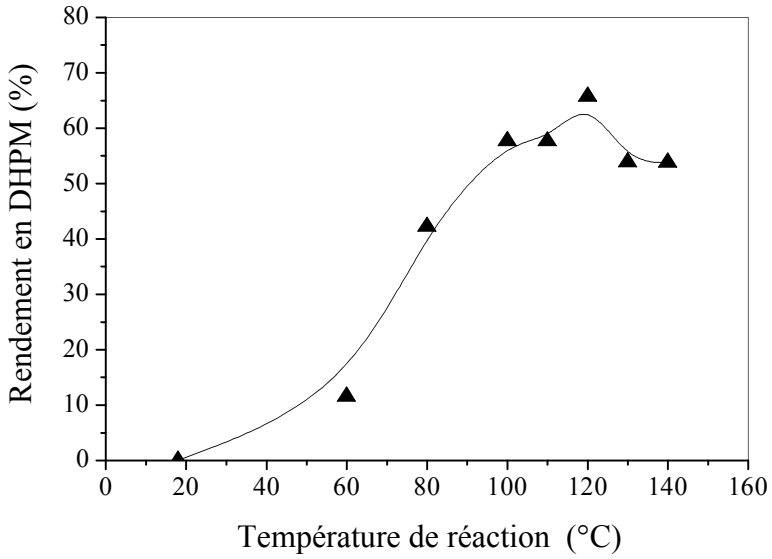


Figure III.1 : Rendement en DHPM en fonction de la température de réaction en présence du catalyseur $Sr(NO_3)_2$.

Tableau III.2 : Effet du temps de réaction sur le rendement en DHPM synthétisée via la réaction de Biginelli [a].

Entrée	Catalyseur (mmol)	Temps (minutes)	Rendement[b] (%)
1	0,05	60	36
2	0,10	60	65,80
3	0,15	60	53,78
4	0,10	30	50
5	0,10	90	65,32
6	0,10	120	63,50

[a] Conditions de la réaction : benzaldéhyde/acétoacétate d'éthyle/urée : 1/1/1,5 mmol ; 120°C ; sans solvant.

[b] Rendement isolé des produits après recristallisation

I.2 Quantité des réactifs

Il ressort de l'étude bibliographique que la mise en place des conditions opératoires nécessite la connaissance des quantités des réactifs utilisées. Il a été retenu plusieurs variantes des rapports stœchiométriques entre les réactifs :

- Quantité équivalente des trois réactifs (benzaldéhyde, urée et β-dicétone) **[4]**.
- Excès de l'urée dans des proportions allant de 20 à 50% par rapport à l'aldéhyde **[4, 5]**.
- Excès de l'urée et de la β-dicétone (20%, 50%) par rapport à l'aldéhyde **[6]**.

Dans cette optique, nous avons réalisé la condensation précédente dans les conditions optimisées en faisant varier la quantité des réactifs. Les résultats obtenus regroupés dans le Tableau III.3 se révèlent en parfaite accord avec les données de la bibliographie **[7, 8]**, et qui montre que le rendement en DHPM est plus grand lorsque la quantité en urée est 1,5 équivalent plus élevée à celles de l'aldéhyde et de l'acétoacétate d'éthyle. Ce comportement pourrait s'expliquer par le fait que l'étape lente de la réaction, suivant le mécanisme de Kappe, impliquerait la présence d'une quantité plus élevée en urée comparé à celle de l'aldéhyde assurant ainsi la formation de l'intermédiaire N-acyliminium à partir de l'aldéhyde et de l'urée (voir paragraphe : Mécanisme réactionnel, Chapitre I-page 5).

Tableau III.3 : Effet de la quantité de réactifs sur le rendement en DHPM synthétisée via la réaction de Biginelli [a].

B/AAE/U (mmol)	1/1/1	1/1/1,5	1/1,5/1,5	1,5/1,5/1
Rendement[b] (%)	61,47	65,8	61,47	61,47

[a] Conditions de la réaction : Benzaldéhyde/AcétoAcétate d'Ethyle/Urée : B/AAE/U ; $Sr(NO_3)_2$: 0,1 mmol ; 1 h ; 120°C ; sans solvant.

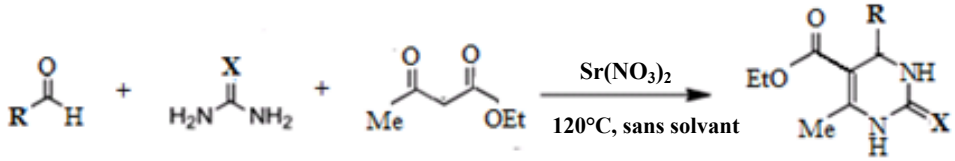
[b] Rendement isolé des produits après recristallisation

I.3 Préparation des dihydropyrimidinones

Pour enrichir notre étude de cyclocondensation de Biginelli catalysée par le nitrate de strontium, la même réaction en utilisant des aldéhydes hétéroatomiques différemment substitués a été réalisée en présence de 0,1 mmol en $Sr(NO_3)_2$ dans les conditions optimisées. Il ressort des résultats, regroupés dans le Tableau III.4, que les dérivés de la DHPM ont été obtenus avec des rendements faibles à moyens :

- Le 4-NO_2-benzaldéhyde est plus réactif (63,2%, Entrée 2) que ces homologues le 4-Cl-benzaldéhyde et le 4-OH-benzaldéhyde (50,93% et 32,6%, Entrées 3 et 4 respectivement). Il est à noter par ailleurs, que l'introduction du 4-NO_2-benzaldéhyde ne permet pas d'atteindre un meilleur rendement de l'adduit de Biginelli comparé à celui obtenu avec le benzaldéhyde (65,8%, Entrée 1). Il en résulte, que sous ces conditions opératoires exempts de solvant la synthèse du produit de Biginelli en utilisant le benzaldéhyde substitué par des groupements éléctron-attracteurs n'a pas été bénéfique sur le rendement de la réaction.
- La substitution de l'urée par la thiourée se révèle moins réactive et le rendement en DHPM chute de moitié (31,61%, Entrée 5) avec un temps de réaction plus long. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature **[1, 2]**.

Tableau III.4 : Synthèse des DHPMs en utilisant $Sr(NO_3)_2$ via la réaction de Biginelli [a]



Entrée	R	X	Temps (min)	Rendement[b] (%)	Température de fusion	
					Mesurée	Reportée
1	C_6H_5	O	60	65,80	199-201	201-203 **[9]**
2	4- NO_2-C_6O_5	O	180	63,20	210-214	209-212 **[10]**
3	4-Cl-C_6O_5	O	120	50,93	212-217	216-217 **[11]**
4	4-OH-C_6H_5	O	210	32,60	215-219	228-230 **[12]**
5	C_6H_5	S	180	31,61	193-196	192-194 **[13]**

[a] Conditions de la réaction : aldéhyde/acétoacétate d'éthyle/urée(thiourée)/$Sr(NO_3)_2$: 1/1/1,5/0,1 mmol ; 120°C.

[b] Rendement isolé des produits après recristallisation

Sur la base d'une synthèse bibliographique, on propose que la réaction de Biginelli dans nos conditions opératoires en présence de $Sr(NO_3)_2$ se déroule selon le mécanisme réactionnel présenté par Liu et coll. **[1]** (Figure III.2). Ce mécanisme s'explique par la stabilité de l'ion intermédiaire généré in situ à partir du benzaldéhyde et l'urée (1), ainsi que la forme tautomère de l'acétoacétate chélatée par l'ion métallique Sr^{2+} (2). Au final, la cyclisation de l'intermédiaire résultant donne lieu aux DHPMs (3) correspondants en passant par une déshydratation.

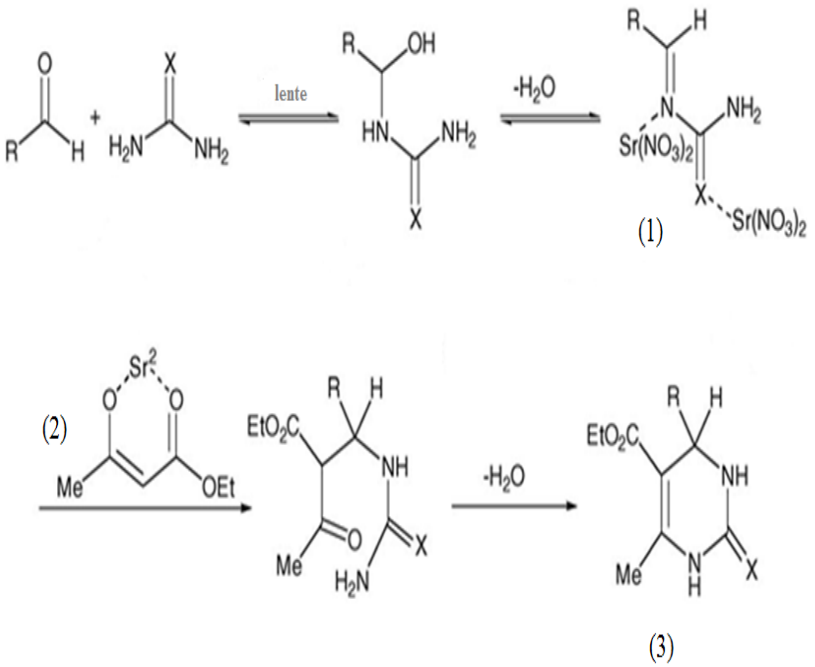


Figure III.2 : Mécanisme de la réaction de Biginelli catalysée par $Sr(NO_3)_2$

La structure des DHPMs synthétisées à été identifiée sur la base de la température de fusion et de l'analyse spectroscopique IR, et comparée aux données de la littérature. Un exemple de spectre infrarouge correspondant à la 3,4-dihydropyrimidin-2-(1*H*)-one, représenté dans la Figure III.3, est caractérisé par la présence de deux bandes successives correspondantes à l'élongation de deux liaisons N-H du noyau DHPM qui apparaissent respectivement vers 2928-3248 cm^{-1}. La bande qui sort vers 1708 cm^{-1} est caractéristique du groupement carbonyl (C=O) de la fonction ester, celle-ci est précédée par la bande à 1650 cm-1 caractéristique au groupement C=O de la fonction. D'autres bandes sont enregistrées parmi elles celle à 1468 cm^{-1} attribuée aux doubles liaisons C=C du cycle aromatique et du noyau DHPM.

Pour l'ensemble des autres produits synthétisés, les spectres IR correspondant sont donnés en annexe.

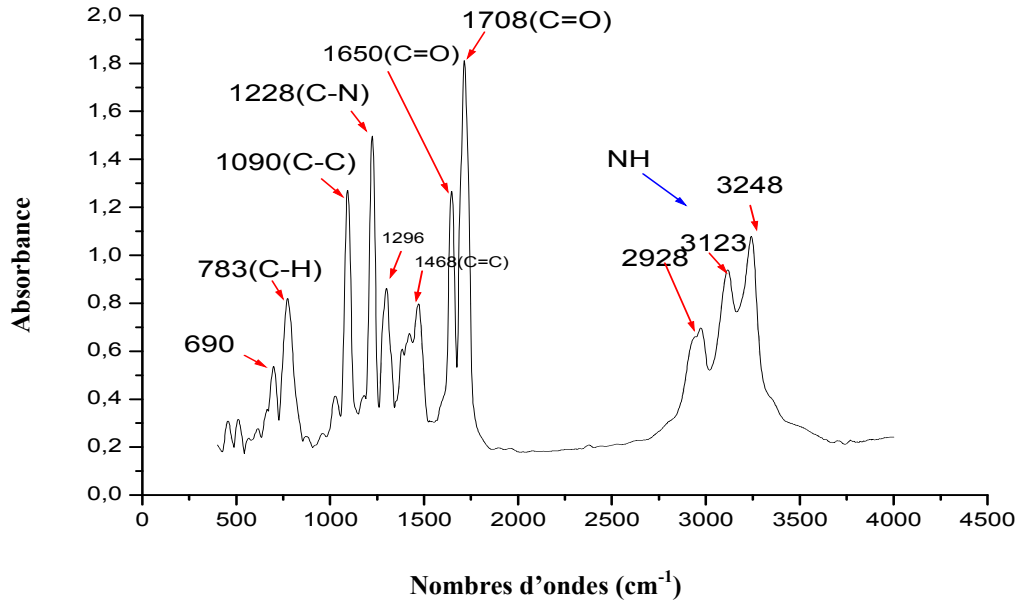


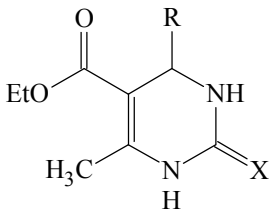
Figure III.3 : Spectre IR de la 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one (DHPM) obtenu via la réaction de Biginelli catalysée par $Sr(NO_3)_2$.

II. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES PRODUITS DE BIGINELLI

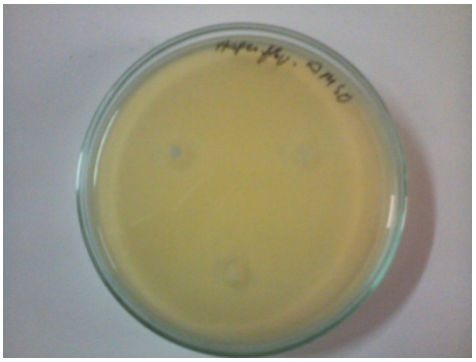
Dans ce volet de notre travail, nous avons évalué l'activité antifongique de quelques DHPMs, synthétisés dans la première partie, sur trois souches de champignons : *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*. Pour ce faire, il a été judicieux dans un premier temps de définir le solvant qui pourrait servir d'une part à solubiliser les DHPMs et d'autre part comme témoins (test contrôle) vis-à-vis des souches étudiées. Ainsi, notre choix s'est porté sur le solvant DMSO (diméthyl sulfoxyde). En effet, d'après les résultats observés via la prise de photos, nous constatons que la DMSO est un bon solvant pour préparer des différentes solutions de DHPMs (Figure III.4a) et un bon témoin en raison qu'il n'altère nullement la croissance des souches fongiques (Figure III.4b).

A retenir que les solutions de DHPMs testées sont identifiées par le code suivant :

- DHPM-Ur : R = benzaldéhyde ; X = O
- DHPM-thio : R = benzaldéhyde ; X = S
- DHPM-nitro : R = nitrobenzaldéhyde ; X = O



(a)



(b)

Figure III.4 : Solutions DHPMs (a) et exemple de l'activité antifongique de l'*Aspergillus flavus* (b) en présence du DMSO.

II.1 Test antifongique sur *Botrytis cinerea*

Les premiers tests antifongiques ont été réalisés sur *Botrytis cinerea*, une espèce de champignon phytopathogène responsable de la pourriture grise qui sévit sur plusieurs cultures d'intérêt agronomique (voir paragraphe test biologique, Chapitre II-page 28). A signaler, que trois méthodes ont été adoptées au cours de ce test, celles : des puits, des disques et des spots. Il ressort des résultats obtenus illustrés dans la Figure III.5, qu'aucune activité n'a été observée pendant les 3 jours de test à 30°C et cela quelque soit la concentration des solutions de DHPMs utilisées (1 $mg.mL^{-1}$ et 3 $mg.mL^{-1}$) et ceci au cours des trois tests répétés. Ce résultat est en parfait accord avec les données de la littérature qui montre la forte résistance de ce champignon face aux produits chimiques. En effet, il a été montré que l'utilisation de la dichlozoline, dicloran, quitozene, vinchlozoline **[14]** ou le dicarbox-imides, benzimidazoles, diethofencarb **[15, 16]**, ne révèle aucune activité antifongique.

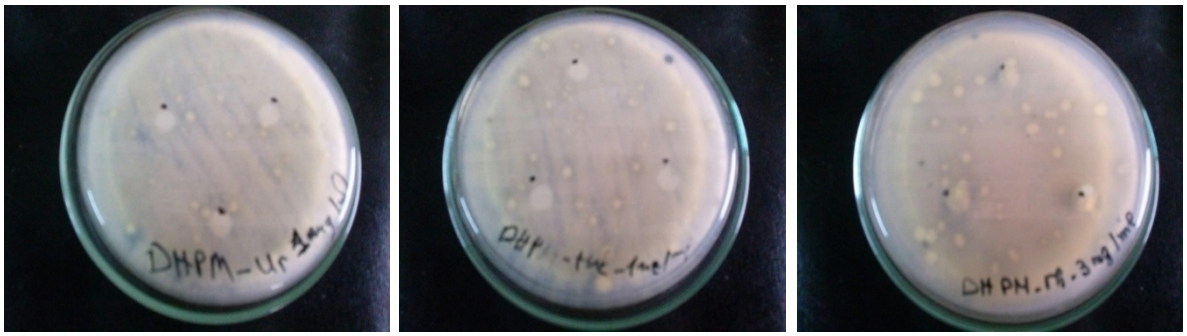


Figure III.5 : Activité antifongique des solutions DHPMs via-à-vis de *Botrytis cinerea*

II.2 Test antifongique sur l'*Aspergillus*

Par la suite nous avons testé l'effet antifongique des mêmes produits de Biginelli en présences de deux espèce d'*Aspergillus* : *flavus* et *niger*. Pour cela la méthode des puits à été adoptée. Les résultats regroupés dans le Tableau III.5, révèle une absence totale d'une activité antifongique à l'égard des deux espèces étudiées en présence des DHPM-Ur, DHPM-Thio (1 et 3 $mg.mL^{-1}$) et DHPM-nitro (1 $mg.mL^{-1}$). En revanche, avec une concentration de 3 $mg.L^{-1}$ en DHPM-nitro une zone d'inhibition de diamètre 13 mm et 13,67 mm est enregistrée en présence de l'*Aspergillus niger* et *flavus* respectivement. Ce résultat, montre un effet promoteur du groupement NO_2 qui semble se manifester

au-delà d'une concentration de 1 $mg.mL^{-1}$, et qui serait probablement responsable de la diffusion de la molécule à travers la paroi fongique qui se traduit par l'apparition d'halo d'inhibition autour du champignon (Figure III.6).

Tableau III.5 : Activité antifongique des différentes solutions DHPMs par la méthode des puits (50 µL).

Solutions à différentes concentrations ($mg.mL^{-1}$)		champignons cibles en fonction du diamètre d'inhibition (mm)	
		Aspergillus niger	*Aspergillus flavus*
DHPM-Ur	1	0	0
	3	0	0
DHPM-Th	1	0	0
	3	0	0
DHPM-nitro	1	0	0
	3	13	13,67

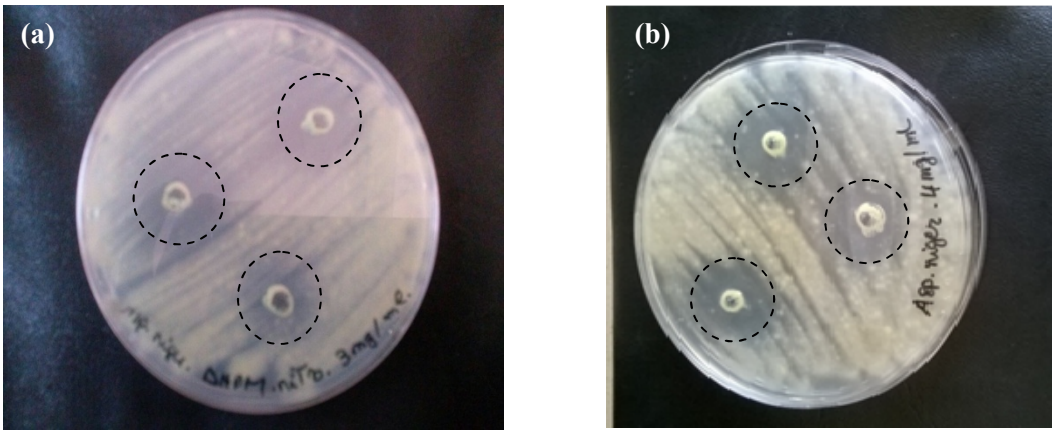


Figure III.6 : Activité antifongique de la solution DHPM-nitro (3 $mg.mL^{-1}$) via-à-vis de *l'Aspergillus flavus* (a) *et l'Aspergillus niger* (b).

Au vu de ces résultats, nous avons voulu déterminer la concentration de la substance DHPM-nitro pour laquelle l'activité antifongique commence à apparaitre sur les deux souches fongiques. Pour cela, deux concentrations supplémentaires : 2 et 4 $mg.mL^{-1}$ sont étudiées en plus de celles déjà testées.

D'après les résultats représentés dans le Tableau III.6 et la Figure III.7, nous pouvons remarquer l'apparition d'une activité antifongique via la formation d'une zone d'inhibition d'un diamètre de 6,33 mm dès la concentration de 2 $mg.mL^{-1}$, et cela exclusivement vis-à-vis de l'*Aspergillus niger*. De plus, pour cette même souche, on constate qu'une augmentation de la concentration entraine une augmentation de l'activité antifongique pour atteindre un diamètre d'inhibition de 15,66 mm pour une concentration de 4 $mg.mL^{-1}$ en DHPM-nitro. D'autre part, dans le cas de la souche *Aspergillus flavus* on constate que la meilleure activité antifongique est maintenue pour la concentration de 3 $mg.mL^{-1}$ et qu'une augmentation de cette dernière (4 $mg.mL^{-1}$) entraine une chute de l'activité (diamètre d'inhibition ~ 3 mm). Ce résultat pourrait s'expliquer par une réduction paradoxale de l'activité lorsque la souche est exposée à des concentrations en substance plus élevées. Cet effet est connu sous le nom de l'effet Eagle **[17, 18]** qui a été observé essentiellement *in vitro* par l'absence relative de l'efficacité des l'antibiotiques bêta-lactamines sur les infections ayant un grand nombre de bactéries. L'explication apportée à cette décroissance paradoxale repose sur les hypothèses suivantes :

- une forte concentration de l'antibiotique serait à la base de l'induction d'un mécanisme de résistance qui favoriserait la croissance bactérienne **[19]**.
- une précipitation de la substance voir sa cristallisation liée à sa concentration élevée rendrait la substance moins détectable par les colonies bactériennes ce qui privilégie leurs croissances **[17]**.

Tableau III.6 : Activité antifongique de la solution DHPM-nitro à différentes concentrations ($mg.mL^{-1}$) par la méthode des puits (50 µL).

Concentrations de la DHPM-nitro ($mg.mL^{-1}$)	champignons cibles en fonction du diamètre d'inhibition (mm)	
	Aspergillus niger	*Aspergillus flavus*
2	6,33	0
3	13	13,67
4	15,66	2,67

Figure III.7 : Activité antifongique de la solution DHPM-nitro (2 mg.mL^{-1}) via-à-vis de *l'Aspergillus niger et l'Aspergillus flavus.*

Cette partie du travail bien qu'elle ne soit pas plus approfondie et plus affinée, mais elle nous a permis d'avoir une idée sur l'activité antifongique des substances DHPMs synthétisées. Elle reste une étude très prometteuse et un point de départ qui mérite d'être plus développée et ce par l'utilisation d'autres DHPMs substituées à différentes concentrations et/ou d'autres souches fongiques.

Références bibliographiques

[1] C. Liu, J. Wang, Y. Li, J. Mol. Catal. A: Chem., 258 **(2006)** 367.

[2] W. Su, J. Li, Z. Zheng, Y. Shen,Tetrahedron Lett., 46 **(2005)** 6037.

[3] F Tamaddon, S. Moradi, J. Mol. Catal. A: Chem., 370 **(2013)** 117.

[4] Srinivasan et al. Patent application Publication., N°. US 2005/0215790 A1 29, 09, **(2005)**.

[5] E. Rafiee, H. Jafari, Biorganic & Medecinal Chemistry Lett., 16 **(2006)** 2463.

[6] Ghillus Yadav *et al*. Eur. J .Org. Chem., (**2004)** 552.

[7] H.R. Kalita, P. Phukan, Catalysis Communication, 8 **(2007)** 179.

[8] B. Boumoud Thèse de Doctorat « Développement de nouvelles voies de la réaction de Biginelli et la synthèse de nouvelles structures du type Quinoléine dihydropyrimidinone ». Faculté des Science, Université de Constantine-Algérie **(2008)**.

[9] M. Nasr-Esfahani, S. J Hoseini, F. Mohammadi. Chin. J. Catal., 32 **(2011)** 1484

[10] B. Gangadasu, S. Palaniappan, V. Jayathirtha Rao, Syn. Lett., 7 **(2004)** 1285

[11] Q. Sun, Y. Wang, Z. Ge, T. Cheng, R. Li. Synthesis, **(2004)** 1047

[12] Y. Ma, C. Qian, L. Wang, M. Yang, J. Org. Chem., 65 **(2000)** 3864

[13] S. Asgharia, M. Tajbakhsh, B. J Kenari, S. Khaksar, Chin. Chem. Lett., 22 **(2011)** 127

[14] G. Dal Bello , M.C. Rollán , G. Lampugnani , C. Abramoff , L. Ronco , S. Larrán , M. Stocco, C. Mónaco, International Journal of Pest Management, 57 **(2011)** 177

[15] C.K. Myresiotis, G.S. Karaoglanidis, K. Tzavella-Klonari, American Phytopathogical Society, 91 **(2007)** 407

[16] C. Tabus, Thèse de Doctorat « Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines ». Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse-France **(2007)**

[17] H. Eagle, A.D Musselman,.Journal of Experimental Medicine, 88 **(1948)** 99

[18] **E.** Yourassowsky, M.P. Vander Linden, MJ. Lismont; E. Schoutens, Chemotherapy, 24 **(1978)**. 92

[19] Y. Ikeda, Y. Fukuoka, K. Motomura, T. Yasuda, T. Nishino, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 34 **(1990)** 94

CONCLUSION GENERALE

La synthèse des composés hétérocycliques et la production de nouvelles molécules complexes et diversifiées à importance biologique et pharmacologique est l'objectif majeur des chimistes de synthèse. Les réactions à composants multiples (MCR) sont désignées comme la méthode la plus facile, économique et sélective à la fois, pour générer toute une bibliothèque de produits avec des propriétés thérapeutiques très importantes. Parmi les réactions multicomposant on peut citer la réaction de Biginelli qui offre une classe importante de produits à intérêt biologique très intéressant. Par ailleurs, l'amélioration des conditions opératoires de cette réaction classique pour atteindre de bons rendements, tout en respectant l'environnement, est une autre préoccupation des chercheurs et constitue un axe prioritaire de recherche en chimie organique qui fait l'objet d'une attention toute particulière. C'est dans ce cadre global que s'inscrit l'objectif du présent mémoire de Master.

Au cours de notre travail nous nous sommes proposé d'étudier deux parties : la premiere porte sur la synthèse des 3,4-dihydropyrimidinones (DHPMs) via la réaction de Biginelli et la seconde partie se propose d'évaluer l'activité antifongique de certains composés synthétisés sur trois souches de champignons.

Dans l'étude de la réaction de Biginelli nous avons développé une méthode simple, efficace et respectueuse de l'environnement pour la synthèse de la 3,4-dihydropyrimidinone (DHPM) via la combinaison du benzaldéhyde, l'acétoacétate d'éthyle, l'urée, sans solvant en présence de catalyseur à base de strontium. Pour cela, différents paramètres ont été étudié et optimisés dont les principaux résultats révèlent que le meilleur rendement en DHPM (66 %) est obtenu en présence de 0,1 mmol de $Sr(NO_3)_2$, dans un milieu exempt de solvant pour une durée de réaction d'une heure à 120°C. Sur la base de ces résultats, une variété de composés DHPMs a été synthétisée à partir des dérivés du benzaldéhyde différemment substitués, avec des rendements plus ou moins acceptables dans les conditions optimisées.

Quant à l'étude de l'activité antifongique de certains produits de Biginelli sur trois souches de champignons, il a été montré dans un premier temps qu'aucune activité antifongique n'est observée à l'égard de *Botrytis cinerea* en présence de DHPM-Ur, DHPM-thio et DHPM-nitro et cela quelle que soit la concentration étudiée. En revanche,

avec 3 $mg.mL^{-1}$ en DHPM-nitro une activité antifongique est obtenus via-à-vis des deux souches d'*Aspergillus*. Par ailleurs, cette activité augmente avec l'augmentation de la concentration en DHPM-nitro dans le cas de l'*Aspergillus niger* (diamètre d'inhibition = 15,66 mm pour 4 $mg.mL^{-1}$ en DHPM-nitro) comparé à son homologue l'*Aspergillus flavus*.

PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats obtenus durant notre travail sont bons et encourageants, et ouvre des voies prometteuses vers quelques perspectives pour les travaux futurs parmi elles :

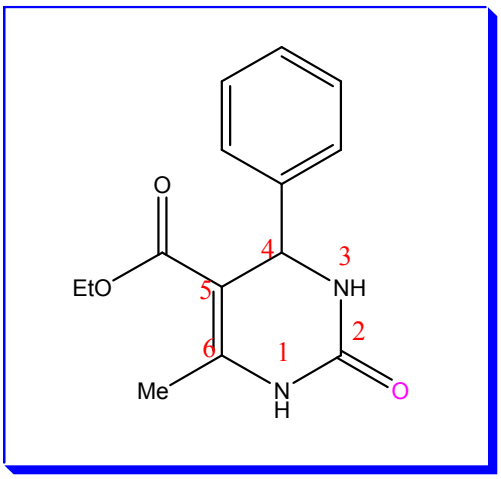
- Réaliser la réaction de Biginelli en présence de catalyseurs supportés : $Sr(NO_3)_2$/support (Al_2O_3, SiO_2, zéolites, …) en adoptant les mêmes ou d'autres conditions réactionnelles dans le but d'améliorer le rendement de l'adduit de la réaction.

- Etude de la réaction de Biginelli en présence de l'acide Lewis Sr^{2+} et/ou Sr/support en adoptant d'autres méthodes de la synthèse améliorée comme la synthèse sous irradiations micro-ondes.

- Réaliser la réaction de Biginelli en utilisant des aldéhydes aromatiques substitués par des groupements électron-attracteurs et/ou électron-donneurs. Les produits obtenus peuvent être le siège d'une large gamme de molécules potentiellement actives.

- Elargir les essais de l'activité biologique sur d'autres champignons ou bactéries via une interaction et collaboration avec les laboratoires de recherches de la Faculté des Science de la Nature et de la Vie - Université de Béjaia.

5-(Ethoxycarbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one

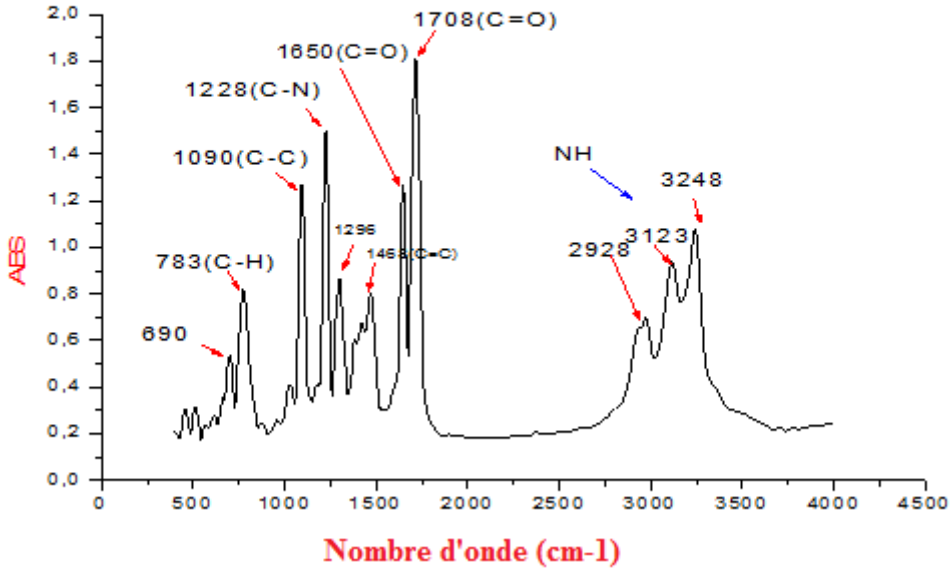


Introduire 0,1 mL de benzaldéhyde (1 mmol), 0,3 ml d'acétoacétate d'éthyle (1 mmol), 0,09 g d'urée (1,5 mmol) et une quantité de nitrate de strontium égale à 0,02 g (0,1 mmol) pour atteindre au compose DHPM de masse de 0,18 g. Le rendement est de 65,8%.

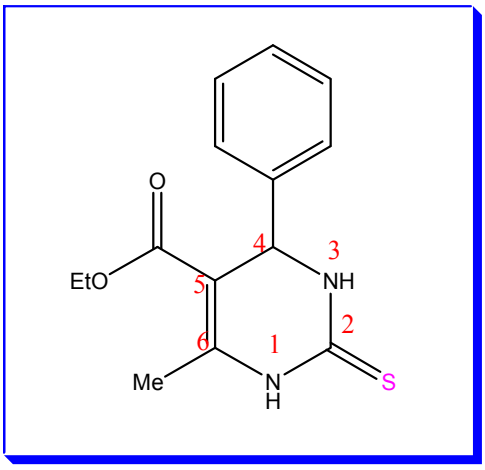
T_{fusion}= 199-201°C

IR(KBr) : **λ** (cm^{-1}) 3245-3120 (NH); 1722 (C=O ester) ; 1600-1820 (C=O cétone); 1450-1650 (C=C cycle aromatique) ; 1228 (C-N) ; 706-784 (C-H du cycle aromatique).

Spectre IR



5-(Ethoxycarbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione

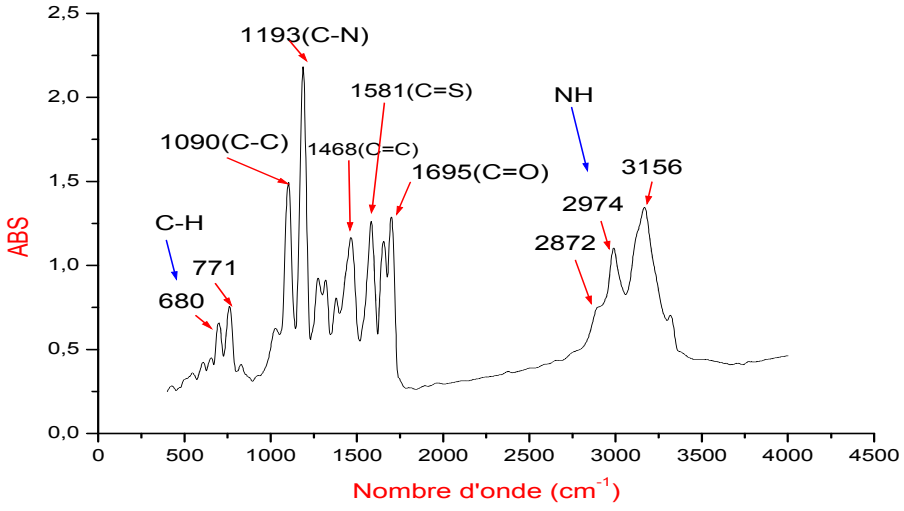


Introduire 0,1 ml de benzaldéhyde (1 mmol), 0,3 ml d'acétoacétate d'éthyle (1 mmol), 0,144 g de thiourée (1,5 mmol) et une quantité de catalyseur (nitrate de strontium) = 0,02 g (0,1mmol) pour atteindre à une quantité de 0,09 g du composé sous forme de poudre jaune. Le rendement est de 32,61%.

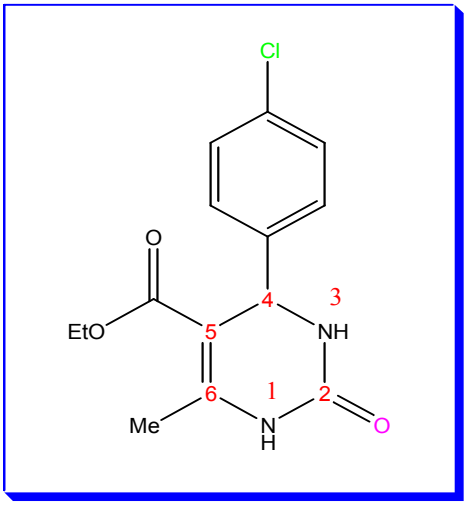
T_{fusion} = 193-196°C

IR(KBr): **λ** (cm^{-1}) 3121-3244 (NH); 1705 (C=O ester); 1662 (C=S); 1470 (C=C cycle aromatique) ; 1221(C-N) ; 700-767 (C-H du cycle aromatique).

SpectreIR



5-(Ethoxycarbonyl)-6-méthyl-4-chlorophényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one

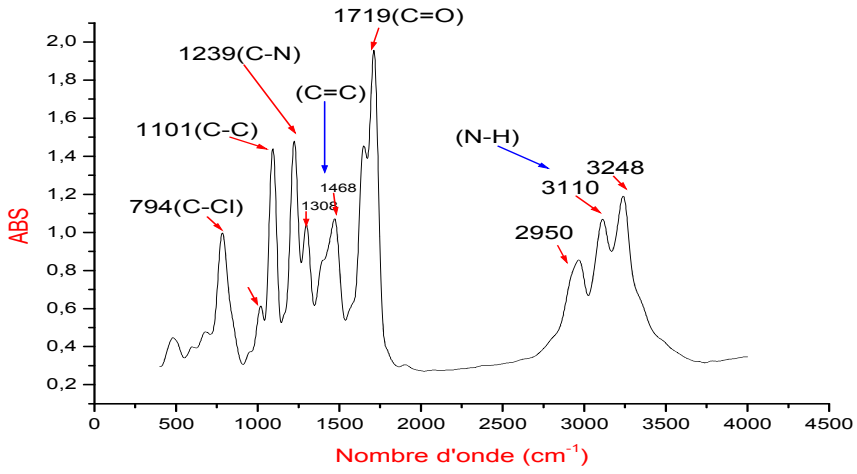


Introduire 0,14 g de chlorobenzaldéhyde (1 mmol), 0,3 ml d'acétoacétate d'éthyle (1 mmol), 0,09 g d'urée (1,5 mmol) et une quantité de nitrate de strontium égale à 0,02 g (0,1 mmol) pour obtenir une quantité 0,15g du produit. Le rendement est de 50,93%

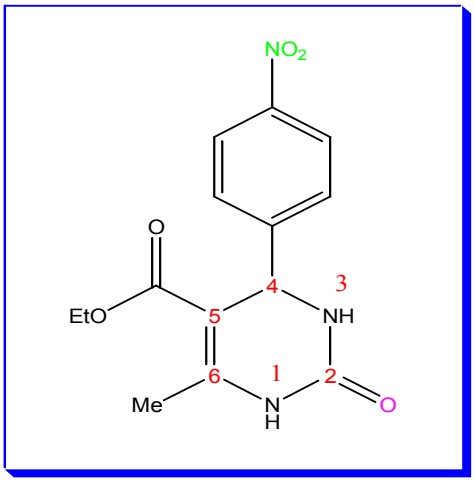
T_{fusion} = 212-217°C

IR(KBr): λ (cm^{-1}) 3123-3244 (NH) ; 1705 (C=O ester) ; 1653 (C=O) ; 1470 (C=C cycle aromatique) ; 1220 (C-N) ; 784 (C-Cl).

Spectre I



5-(Ethoxycarbonyl)-6-méthyl-4-Nitrophényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one

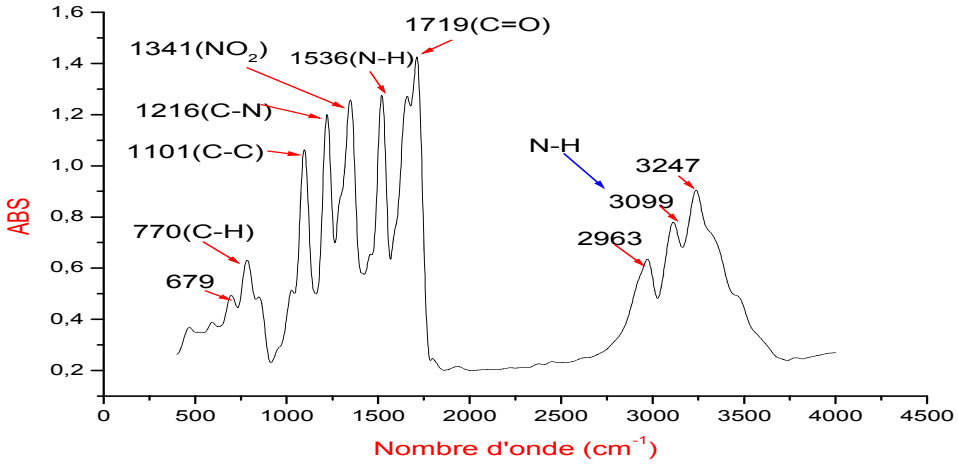


Introduire 0 ,151 g de Nitrobenzaldéhyde (1 mmol), 0,3 ml d'acétoacétate d'éthyle (1 mmol), 0,09 g d'urée (1,5 mmol) et une quantité de nitrate de strontium égale à 0,02 g (0,1 mmol) pour obtenir 0,19 g du produit. Le rendement est de 62,3%.

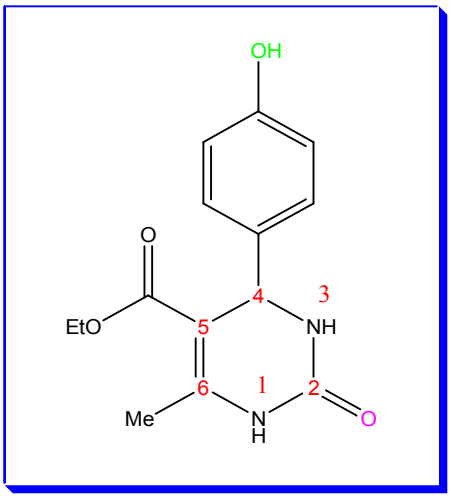
T_{fusion}= 210-214°C

IR (KBr) : λ (cm^{-1}) 3105-3244 (NH); 1732 (C=O ester) ; 1630-1680 (C=O amide) 1300- 1390 (NO2) ; 1450-1600 (C=C cycle aromatique) ; 1000-1400 (C-N amine) ; 690-910 (C-H aromatique)

Spectre IR



5-(Ethoxycarbonyl)-6-méthyl-4-hydroxyphényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one

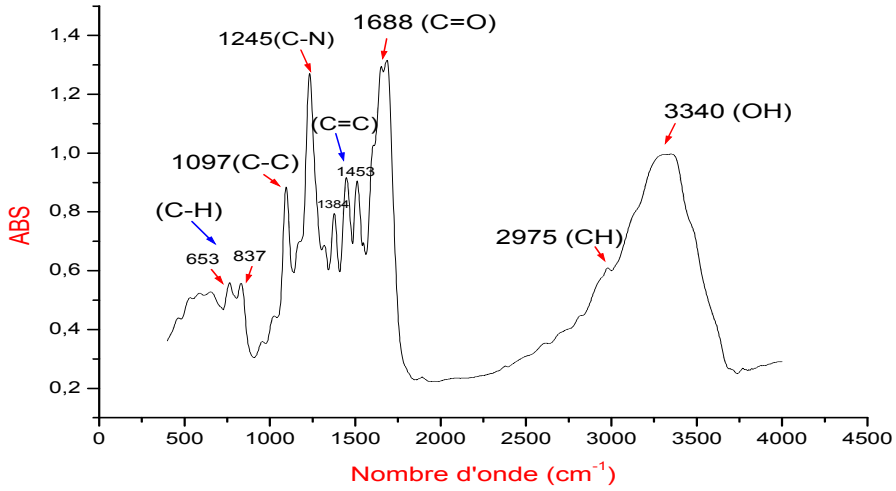


Introduire 0,122 g de hydroxybenzaldéhyde (1 mmol), 0,3 ml d'acétoacétate d'éthyle (1mmol), 0,09 g d'urée (1,5 mmol) et une quantité de nitrate de strontium égale à 0,02 g (0,1 mmol) pour obtenir une quantite de 0,09 g. Le rendement est de 32,6%

T_{fusion} = 215-219°C

IR(KBr) : λ (cm^{-1}) 3200-3400 (OH) ; 1650-1730 (C=O cétone) ; 3100-3500 (C-N) amide; 1560-1640 (C-N) amine ; 775 (C-H du cycle aromatique) ; 1445 (C=C cycle aromatique)

Spectre IR



Résumé

La réaction de Biginelli est l'une des RMCs qui permet la synthèse de noyau DHPM, par condensation des trois composants, ce noyau présente une attention grandissante pour améliorer les rendements et faciliter les conditions opératoires, de même il est largement utilisées pour construire des librairies diverses de molécules médicamenteuses.

Ce manuscrit comprend deux parties principales : Dans la première partie, nous avons décrit, la synthèse des DHPMs 3,4-dihydropyrimidinones selon la réaction à trois composants de type Biginelli catalysée par le nitrate de strontium $Sr(NO_3)_2$, Ce catalyseur s'est avéré très efficace pour l'obtention des produits DHPMs avec un bon rendement dans nos conditions réactionnelles optimisées. Dans la deuxième partie les composés synthétisés ont été analyses pour leur activité antifongique sur trois souches fongiques.

Abstract

The reaction of Biginelli is one of the MCRs that permits the synthesis of DHPM core, by condensation of the three components, this core presents a growing attention to improve the yields and to facilitate the operative conditions, in the same way it is used extensively to construct various bookstores of medicinal molecules.

This manuscript consists of two main parts: In the first part, we described, the synthesis of the DHPMs 3,4-dihydropyrimidinones according to the reaction to three components of Biginelli type catalyzed by the nitrate of strontium $Sr(NO_3)_2$, This catalyst proved to be very efficient for the obtaining of the DHPMs products with a good yields in our optimized reactional conditions. In the second part the synthesized compounds were analyses for their antifongal activities on three fungal stumps.