

Sommaire

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION GENERALE : | 1 |
| CHAPITRE I | 4 |
| <i>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</i> | 4 |
| I.1. REACTIFS UTILISES : | 6 |
| <i>I.1.1 L'isatine :</i> | 6 |
| <i>I.1.2. Les chalcones :</i> | 9 |
| I.2. PROPRIETES BIOLOGIQUES DES DERIVES DE SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES]: | 12 |
| I.3. DIFFERENTES METHODES DE SYNTHESE DES PRODUITS SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES]: | 17 |
| CHAPITRE II | 26 |
| <i>SYNTHESE DES SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES]</i> | 26 |
| INTRODUCTION : | 27 |
| II.1. STRATEGIE DE SYNTHESE : | 27 |
| II.2. TECHNIQUES DE SYNTHESE UTILISEES : | 29 |
| II.3. REACTIFS SYNTHETISES : | 29 |
| <i>Les chalcones :</i> | 29 |
| II.4. PRODUITS SYNTHETISES : | 30 |
| II.4.1. Synthèse de l'ylure d'azomethine : | 30 |
| II.4.2. Optimisation des conditions opératoires pour chaque technique | 31 |
| II.4.3. Synthèse des spiro [oxindole-pyrrolidines] : | 32 |
| II.5. INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS : | 37 |
| II.5.1. Comparaison des techniques de synthèse : | 37 |
| II.5.2. Comparaison des acides aminés utilisés | 37 |
| II.6. DETERMINATION STRUCTURALE DES SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES] PAR RMN 2D : | 38 |
| II.7 Mécanisme d'obtention des spiro-[oxindole-pyrrolidines] | 46 |
| Conclusion | 47 |
| CHAPITRE III | 48 |
| <i>EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE</i> | 48 |
| <i>DES SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES]</i> | 48 |
| INTRODUCTION : | 49 |
| III.1. Historique de la maladie: | 50 |
| III.1.1. Les symptômes : | 50 |
| III.1.2. La lutte : | 50 |

| | |
|--|----|
| III.1.3. L'agent causal du Bayoud: | 51 |
| III.1.4. Le cycle de vie: | 52 |
| III.2. Tests de l'activité antifongique des spiro-[oxindole-pyrrolidines] <i>in-vitro</i> :..... | 53 |
| III.2.3. RESULTATS OBTENUS :..... | 53 |
| a. Série issue de la sarcosine :..... | 54 |
| b. Série issue de la proline | 55 |
| c. Série issue de la phényleglycine..... | 56 |
| CHAPITRE IV :..... | 58 |
| <i>PARTIE EXPERIMENTALE ET DONNEES SPECTROSCOPIQUES</i> | 58 |
| IV.1. APPAREILLAGE : | 59 |
| IV.2. PREPARATION DES CHALCONES :..... | 60 |
| IV.3. PREPARATION DES SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES]:..... | 64 |
| IV.3.1. Procédé 1 : Chauffage classique (Reflux)..... | 64 |
| IV.3.2. Procédé 2 : Méthode d'activation par les ultrasons..... | 65 |
| IV.3.3. Procédé 3 : Méthode d'irradiation aux micro-ondes sans solvant | 65 |
| IV.4. Caractérisation des produits synthétisés :..... | 66 |
| IV.5. Procédé d'évaluation de l'activité anti fongique | 75 |
| CONCLUSION GENERALE : | 77 |

Abréviations

| | |
|----------------------|--|
|))) ; US | Ultrason |
| Bn | Benzyle |
| Boc | Tertiobutoxycarbonyl |
| Cbz : | Benzyl carbamates |
| CCM | Chromatographie sur Couche Mince |
| DMPU | 1, 3Diméthyl-3,4,5,6 tétrahydro-2(1H)-pyrimidinone |
| DPPA | Diphénylphosphorylazide |
| M.O | Micro-onde |
| MsCl | Chlorure de Mesyle |
| NDMBA | Acide 1,3 diméthylbarbiturique |
| Rh(OAc) ₄ | Acétate de rhodium |
| TFA | Acide trifluoroacétique |
| Δ | Chauffage |

INTRODUCTION GENERALE :

Les composés hétérocycliques polyfonctionnalisés jouent un rôle très important dans le processus de la découverte des médicaments. D'ailleurs, les dernières statistiques sur les médicaments, mis sur le marché, ont montré que 68% d'entre eux sont des hétérocycles¹. Parmi ces derniers, on peut citer les hétérocycles azotés à cinq chaînons qui jouissent d'un large potentiel biologique. Il en est de même pour les produits spiraniques tels que les spiro-oxindoles² et les spiropyrrolidines³ qui sont dotés de propriétés biologiques vastes et très variées. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés au couplage de dérivés de ces deux familles afin d'accéder à des composés spiro-[oxindole-pyrrolidinone] afin d'étudier l'évolution de certaines activités biologiques intrinsèques tels leurs pouvoir antifongiques. Des exemples de la littérature⁴ montrent l'importance et les diverses applications de telles structures. On peut citer par exemple, l'agent inhibiteur puissant anti-peptidique de l'interaction de P53-MDM2 et les alcaloïdes comme l'HORSFILINE⁵, LA PTEROPODINE, L'ISOPTEROPODINE⁶, LE SPIROTRYPROSTATIN A et B⁷, L'ELACOMINE⁸,etc. (Figure 1 à 4).

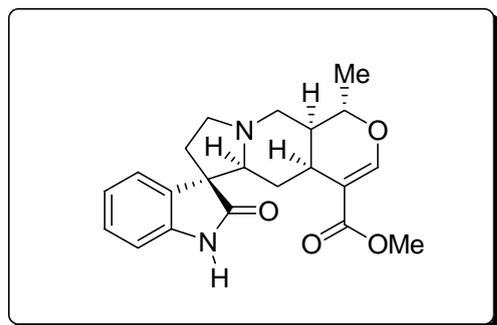


Figure 1 : Pteropodine

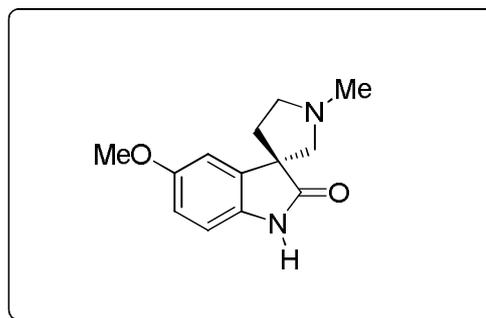


Figure 2 : L'Horsfiline

¹ K. Jadidi, R. Ghahremanzadeh, A. Bazgir. *J. Comb. Chem.* 2009, 11, 341 – 344

² R. R. Kumar, S. Perumal, P. Senthilkumar, P. Yogeewari, D. Sriram. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 5731 – 5735

³ M. A. Ali, R. Ismail, T. S. Choon, Y. K. Yoon, A. C. Wei, S. Pandian, R. S. Kumar, H. Osman, E. Manogaran. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010, 20, 7064 – 7066

⁴ V. Rajkumar, N. A. Aslam, C. Reddy, S. A. Babu. *SYNLETT*. 2012, 23, 549 – 556

⁵ a) G. Lakshmaiah, T. Kawabata, M. Shang, K. Fuji. *J. Org. Chem.* 1999, 64, 1699 – 1704 b) G. Cravotto, G. B. Giovenzana, T. Pilati, M. Sisti, G. Palmisano. *J. Org. Chem.* 2001, 66, 8447 – 8453

⁶ M. Li, W. L. Yang, L. R. Wen, F. Q. Li. *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 2751 – 2758

⁷ A. S. Girgis. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009, 44, 91 – 100

⁸ K. Karthikeyan, N. Saranya, A. Kalavani, P. T. Perumal. *SYNLETT*. 2010, 18, 2751 – 2754

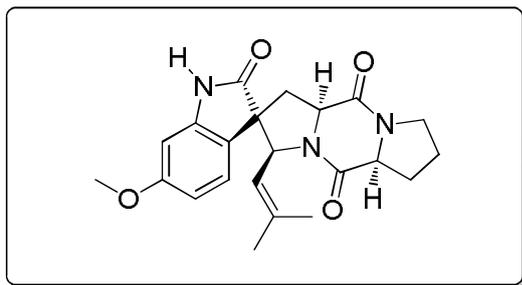
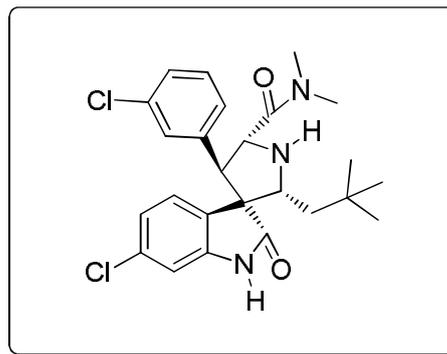


Figure 3 : Spirotryprostatin A

Figure 4 : Un inhibiteur de l'interaction de p53 MDM2⁹

Plusieurs voies de synthèse ont été développées pour accéder à ce type de structures parmi elles, la réaction de cycloaddition dipolaire-1,3 qui semble la plus adaptée pour préparer ces produits car c'est une réaction multi-composés en "one pot" donc simple et plus efficace.

Nous avons également fait appel à des techniques non conventionnelles telles que les Ultrasons et les Micro-ondes.

Une étude comparative entre les différentes techniques d'activation sera réalisée afin de mettre au point une méthode fiable et performante conformément aux spécifications de la chimie verte (réduction au maximum de la consommation de l'énergie, minimisation à l'extrême du temps de réaction et éviter l'usage du solvant dans la mesure du possible).

L'ensemble du travail réalisé est ainsi présenté dans ce mémoire selon quatre chapitres :

1. Le premier chapitre englobe une étude bibliographique sur les produits spiro-[oxindole-pyrrolidines] avec des illustrations de leurs propriétés biologiques de quelques exemples de cette famille. Ce chapitre contient aussi les différentes méthodes de synthèse de ces produits.
2. Le deuxième chapitre contient la stratégie de synthèse des dérivés de ces produits à partir des réactifs disponibles sur le marché, moins coûteux et qui possèdent des activités biologiques et cela par différentes techniques (chauffage classique, Ultrasons et Micro-ondes).
3. Le troisième chapitre sera consacré à l'étude et l'évaluation de l'activité antifongique de ces produits vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* un champignon

⁹ J. N. S. Rao, R. Raghunathan. *Tetrahedron Letters*.2012, 53, 854 – 858

responsable de la maladie du Fusariose (ELBAYOUD) qui fait des ravages au niveau des palmiers dattiers au sud de l'Algérie.

4. Le quatrième chapitre rassemble la partie expérimentale, précisant les différents modes opératoires ainsi que les caractéristiques spectroscopiques des composés obtenus.

Enfin, une conclusion générale regroupant les principaux résultats obtenus clôturera ce travail.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

I.1. Propriétés de l'isatine

I.2. Propriétés des chalcones

I.2. PROPRIETES BIOLOGIQUES DES DERIVES DE SPIRO-OXINDOLES

I.2.1. Activité antibactérienne

I.2.2. Activité anti-inflammatoire

I.2.3. Activité anti-tumorale

I.2.4. Activité antituberculeuse

I.2.5. Activité antidiabétique

I.2.6. Activité antifongique

I.2.7. Activité antihistaminique

I.3. DIFFERENTES METHODES DE SYNTHESE DES PRODUITS SPIRO-OXINDOLES

I.3.1. Par expansion du cycle

I.3.2. Par Réarrangement oxydatif

I.3.3. Par Réaction de cycloaddition

a. Addition nucléophile sur les isocyanides

b. Cycloaddition [3+2] avec adduit de Baylis-Hillman comme dipolarophile

I.3.4. Synthèse de spiro-oxindole en présence et en absence de dipolarophile

I.3.5. Par Addition – Elimination asymétrique

I.3.6. Par Synthèse catalysée par le cuivre

INTRODUCTION :

Les dérivés spiro-[oxindole-pyrrolidines] représentent le squelette de base pour de nombreux alcaloïdes pouvant servir comme des intermédiaires synthétiques potentiels, de plus ils possèdent d'importantes activités biologiques telles que les activités anti-tumorales, antivirales, antibiotiques, anesthésiques locales, ..., etc¹⁰.

Leur préparation se fait via la réaction de cycloaddition dipolaire-1,3 qui est une méthode largement utilisée pour la synthèse des produits naturels tels que les alcaloïdes¹¹. Elle est considérée comme une méthode polyvalente¹², efficace et convergente pour la construction des unités structurales des spiro-[oxindole-pyrrolidines] qui représentent l'ossature d'une variété de produits pharmacologiquement et biologiquement actifs. C'est pour cette raison que les dernières décennies, ce type de réactions a attiré beaucoup d'attention parce qu'elles représentent une méthode pratique pour la génération des hétérocycles possédant des atomes d'azote et biologiquement actifs^{13,14} avec un rendement élevé; un temps de réaction réduit et sans formation de sous-produits¹⁵.

La réalisation des ces dérivés de spiro-[oxindole-pyrrolidines] a été faite à partir des réactifs disponibles, bon marché et certains d'origine naturelle. Ces réactifs sont doués d'intérêts biologiques importants et représentent la plaque tournante pour la synthèse des produits biologiquement actifs¹⁶.

A cet effet on expose dans ce chapitre des exemples illustrant l'importance et les intérêts biologiques et pharmacologiques de quelques chalcones, isatines et spiro-[oxindole-pyrrolidines], ainsi que leurs modes de préparation pour les derniers.

¹⁰ V. Rajkumar, N. A. Aslam, C. Reddy, S. A. Babu. *Synlett*.2012, 23, 549 – 556

¹¹ A. R. Suresh Babu, R. Raghunathan, G. Gayatri, G. Narahari Sastry. *J. Heterocyclic Chem.*2006, 43, 1

¹² S. U. Maheswari, K. Balamurugan, S. Perumal, P. Yogeewari. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.2010, 20, 7278-7282

¹³ S. E. Kiruthika, N. V. Lakshmi, B. R. Banu, P. T. Perumal. *Tetrahedron Letters*.2011, 52, 6508 – 6511

¹⁴ R. S. Kumar, S. M. Rajesh, S. Perumal, D. Banerjee, P. Yogeewari, D. Sriram. *European Journal of Medicinal Chemistry*.2010, 45, 411– 422

¹⁵ N. V. Lakshmi, Y. Arun, P. T. Perumal. *Tetrahedron Letters*.2011, 52, 3437 – 3442

¹⁶ M. A. Wegman, U. Heinemann, A. Stolz, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon. *Organic Process Research & development*.2000, 4, 318 – 322

Ce chapitre est clôturé par une conclusion qui élucide l'importance de l'étude bibliographique qui se présente comme une lanterne pour définir une voie de synthèse permettant l'accès à ces dérivés.

I.1. REACTIFS UTILISES :

I.1.1 L'isatine :

L'isatine (1H-indole-2,3-dione, *Figure.5*) fut obtenue par Erdman et Laurent en 1841 par oxydation de l'indigo (alcaloïde marin extrait d'éponge). C'est un composé endogène identifié chez l'homme comme dérivé métabolique de l'adrénaline. Elle a été localisée dans le tissu de certains mammifères, comme modulateur de processus biochimique, et dans des plantes de genre *Isatis*¹⁷.

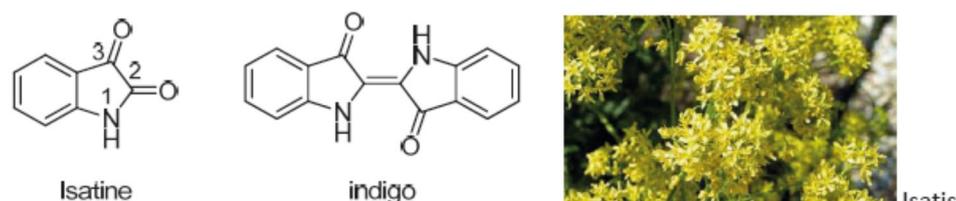


FIGURE.5

L'isatine est souvent couplée avec plusieurs réactifs pour la transformer à d'autres classes de molécules tels que les alcaloïdes. Le noyau indole affiche des propriétés pharmacologiques intéressantes¹⁸ qui se manifestent au niveau du système nerveux central par inhibition de certaines enzymes telle la MAO (MonoAmine Oxidase)¹⁹. Ce qui fait de l'isatine et ses dérivés des anxiogéniques, sédatives et anticonvulsivants. Les nouveaux dérivés de l'isatine comme les cétales dioxolane possèdent des propriétés sédatives et hypnotiques ; ils ont aussi des effets bénéfiques sur le désordre du sommeil et pourraient être des choix alternatifs pour la pré-anesthésie ou la prolongation de l'anesthésie²⁰ tout en rappelant que les bases de schiff

¹⁷ C. Iuga, E. Ortiz, J. R. Alvarez-Idaboy, A. Vivier-Bung. *J. Phys. Chem. A*.2012, 116, 3643 – 3651

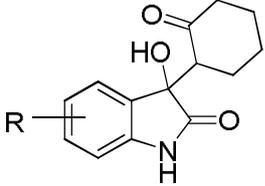
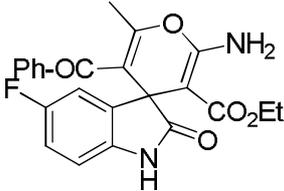
¹⁸ H. Liu, G. Dou, D. Shi. *J. Comb. Chem.*2010, 12, 633 – 637

¹⁹ S. N. Pandeya, S. Smitha, M. Jyoti, S. K. Sridhar, *Acta Pharm.* 2005, 55, 27–46.

²⁰ G. Zapata-Sudo, L. B. Pontes, D. Gabriel, T. C. F. Mendes, N. M. Ribeiro, A. C. Pinto, M. M. Trachez, R. T. Sudo. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.*2007, 86, 678 – 685.

et les bases de Mannich de l'isatine présentent des activités antifongiques, antibactériennes, antivirales et anti-HIV⁶.

Exemples de dérivés d'isatine biologiquement actifs

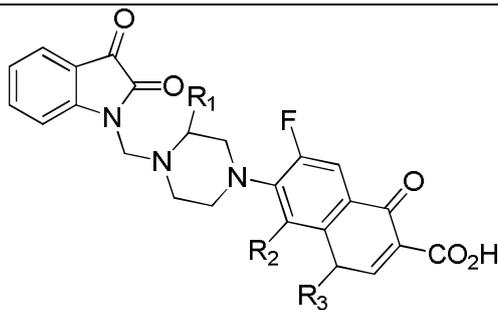
| activité | structure |
|--------------------------------------|--|
| <u>Anticonvulsant</u> ²¹ |  <p>R = H, 1-CH₂C₆H₅, 5-Br, 5-Cl, 5-CH₃, 5-OCH₃, 5-NO₂, 6-Cl, 7-CH₃, 4-Cl-7-CH₃, 4-Cl-7-OCH₃, 5-Cl-7-CH₃, 5-O-CH₃-6-Cl, 6-Cl-7-CH₃</p> |
| <u>Antiépileptique</u> ²² |  |
| <u>Antimicrobien</u> ²³ |  <p>R = H, Br; R₁ = piperidino, morpholino, N(C₂H₅)₂ p-(propylbenzyl)-piperidino</p> |

²¹ H. Pajouhesh, R. Parson and F. D. Popp, *J. Pharm. Sci.* 1983, 72, 318–321.

²² R. Jain, Bansal, *Pharmazie*. 1995, 50, 224–225.

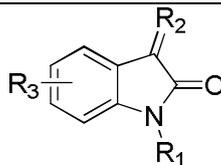
²³ R. S. Varma and W. L. Nobles, *J. Med. Chem.* 1967, 10, 510–513.

Anti-HIV²⁴



R = R₁ = H, CH₃; R₂ = H, F; R₃ = C₂H₅, cyclopropyl

Antifongique²⁵



R₁=H, CH₃, CH₂N(CH₂CH₂OH)₂, CH₂N(CH₂CH₂Cl)₂,
CH₂C₄H₈NO, CH₂NC₅H₁₀; R₂ = O, NNHCOCH₃,
NNHCH₃, NNHCSNH₂, NNHCOOH; R₃ = H, NO₂

²⁴ S. N. Pandeya, D. Sriram, G. Nath and E. De Clercq, *Eur. J. Pharm. Sci.* 1999, 9, 25–31.

²⁵ M. Kupinic, M. MediSari, M. Movrin and D. Maysinger, *J. Pharm. Sci.* 1979, 68, 459–462.

1.1.2. Les chalcones :

La chalcone (figure.6) est une énone aromatique qui représente l'ossature d'une classe de composés chimiques au rôle important en biologie. Elle est constituée d'une molécule de prop-2-èneal ou acroléine liée à chaque extrémité à un groupe phényle.

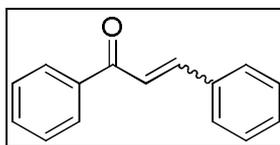


FIGURE.6

La chalcone existe donc sous la forme de deux stéréoisomères (Z et E) en fonction de la disposition des substituants autour de la double liaison centrale.

La chalcone est naturellement synthétisée par un grand nombre de plantes suivant la voie métabolique des phénylpropanoïdes. La chalcone et les chalcones substituées sont aussi des intermédiaires dans la biosynthèse des flavonoïdes, des substances très répandues dans les plantes qui ont un rôle biologique important. Les chalcones sont d'ailleurs des intermédiaires réactionnels dans la production synthétique de flavones.

Les chalcones sont préparées par la condensation de Claisen-Schmidt dans laquelle l'aldéhyde réagit avec de l'acétophénone en présence de bases alcalines aqueuses²⁶, Ba(OH)₂/LiOH²⁷. Les Chalcones sont également synthétisées à l'aide de l'irradiation microondes, irradiation ultrasons²⁸ et par la réaction de Suzuki²⁹. Récemment, des méthodes modifiées pour la synthèse des chalcones ont été rapportées, utilisant différents catalyseurs tels que SOCl₂³⁰, nitrate de lithium de phosphate³¹, KF/phosphate³², liquides ioniques^{33, 34},

²⁶ 269 Y. R. Prasad A.L. Rao, R. Rambabu P. Ravikumar, *Oriental Journal of Chemistry*, 2007, 23, 927-937.

²⁷ M.S. Rao, J. Kotes, R. Narukulla, H. Duddeck, *Arkivoc*, 2004, XIV: 96-102.

²⁸ V. Calvino, M. Picallo, A.J. Lopez-peinado, R.M. Martin-Aranda, C.J. Duran-valle, *Applied Surface Science*, 2006, 252, 6071-6074.

²⁹ S. Eddarir N. Catelle Y. Bakkour, C. Ranlando, *Tetrahedron Lett*, 2003, 44, 5359-5363.

³⁰ O. Petrov, Y. Ivanova, M. Gerova, *Catalysis Communication*, 2008, 9, 315-317.

³¹ S. Sebti, A. Solhy, A. Somabh A. Kossir H, Oamimoun, *Catalysis Communication*, 2002, 3, 335-339.

³² D. J. Macquarrie, R. Nazih, S. Sebti, *Green Chemistry* 2002, 4, 56-59.

³³ F. Dong, C. Jian, F. Zhenghao, G. Kai, L. Zuliang, *Catalysis Communication*, 2008, 9, 1924-1927.

³⁴ K. Tanemura, T. Suzuki, Y. Nishida, T. Horaguchi, *Chemistry Lett.*, 2005, 34, 576-577.

Na_2CO_3 ³⁵, eau à hautes températures³⁶, l'acide sulfurique sur silice³⁷, ZrCl_4 , $\text{NaOH-Al}_2\text{O}_3$ ³⁸ et le chlorure de silice³⁹.

En plus de leur activité biologique, les chalcones ont été sélectionnées pour leur structure qui possède une double liaison carbone-carbone appropriée pour la réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire⁴⁰.

En ce qui concerne leur activité biologique, Les chalcones⁴¹ sont des métabolites secondaires très importants pour les plantes puisqu'ils sont des précurseurs pour toutes les classes de flavonoïdes et isoflavonoïdes⁴² et ils contribuent à la coloration jaune de certaines plantes décoratives. Autrefois, les chalcones ont été classées parmi les flavonoïdes mineurs (une sous classes des flavonoïdes).

Plusieurs travaux ont été effectués sur les chalcones. Ainsi, L. VAN PUYLDE et ses collaborateurs⁴³ ont travaillé sur l'isolation des flavonoïdes et une chalone nommée *Helichrysetin* (figure.7) à partir d'une plante répandue en Afrique du sud dont l'appellation botanique est *HELICHRYM ODORATISSUM* qui est utilisée dans cette région du continent Africain par les médecins populaires pour le traitement de certaines maladies : Douleurs abdominales, brulures cardiaques, toux, rhumes, blessures (plaies). Elle est également utilisée pour le traitement de la stérilité féminine, les douleurs des règles mensuelles et l'eczéma.

³⁵ E, Perozo-Rondon, R.M. Martin-Aranda, B. Casal, C.J. Duran-Valle, W. N. Lau, X.F. Zhang, K.L. Yeung, *Catalysis Today*, 2006, 114, 183-187.

³⁶ M. Craig, P. Comisor, E. Sarage, *Green Chemistry*, 2004, 6, 227-231.

³⁷ Zhang Z, Dong YW, Guan WU, Wang GW, 2003. *Chemistry Lett.*, 32: 966-967.

³⁸ G. Thirunarayanan, G. Vanangamudi, *Arkivoc*, XII, 2006, 58-64.

³⁹ S.R. Sarda, W.N. Jadhav, S.K. Wasmakar, S.A. Dake, R.P. Pawar, *International Journal of Chem Tech Research*, 2009, 2, 265-269.

⁴⁰ D. G. Powers, D. S. Casebier, D. Fokas, W. J. Ryan, J. R. Troth, D. L. Coffen. *Tetrahedron*.1998, 54, 4085 – 4096

⁴¹ K. Schlungen, S. Miosic, F. Topuz, G. Muster, T. Marosits, C. Seitz, H. Halbwirth. *Plant Science*.2009, 177, 97 – 102

⁴² S. K. Kumar, E. Hager, C. Pettit, H. Gurulingappa, N. E. Davidson, S. R. Khan. *J. Med. Chem.*2003, 46, 2813 – 2815

⁴³ L. Van Puyvelde, N. D. Kimpe, J. Costa, V. Munyjabo, S. Nyirankuliza, E. Hakizamungu, N. Schamp. *Journal of National Products*.1989, 52, 629 – 633

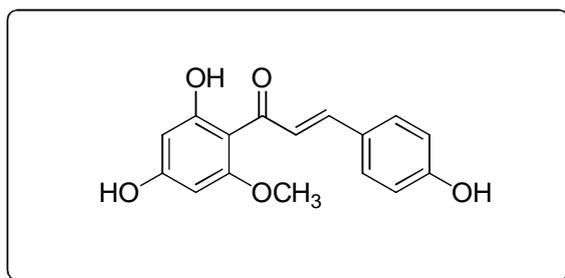


Figure 7 : La Helichrysetin

S. K. Kumar et ses collaborateurs¹⁴ ont effectué des travaux sur de nouveaux dérivés de chalcones boroniques (figure 8) comme agents anti tumoraux surtout pour tester son activité contre le cancer des seins chez les femmes. Les dérivés des chalcones boroniques sont utilisés aussi comme des détecteurs biologiques de diabète.

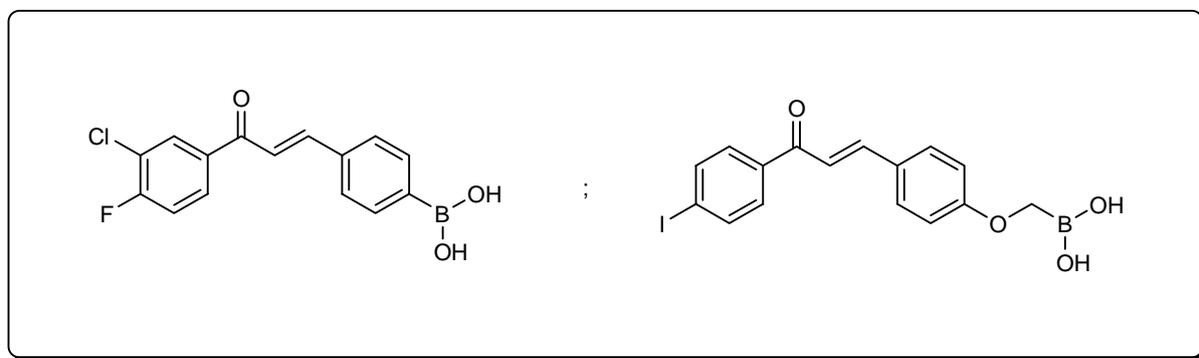


Figure 8 : deux exemples de chalcones boroniques

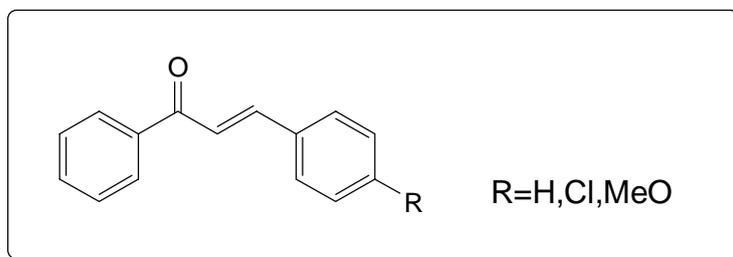


Figure 9 : La molécule de la chalone utilisée

I.2. PROPRIETES BIOLOGIQUES DES DERIVES DE SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES]:

Le système des cycles Spiro-[oxindole-pyrrolidines] est le squelette de base pour un nombre important d'alcaloïdes et de produits pharmacologiques. Certains spiro-[oxindole-pyrrolidines] sont des agents anti-leucémiques et anticonvulsivants. Ils possèdent également une activité antivirale et anesthésique locale⁴⁴. On peut les trouver aussi au niveau de certains d'alcaloïdes tels que l'horsifiline, rhyncophylline, corynoxéine, mitraphylline, vincatine³, spirotryprostatin A et B (spirotryprostatin A est un produit naturel isolé à partir de la fermentation du bouillon d'*Aspergillus fumigatus*⁴⁵, élacomine...etc. Ils jouissent également d'une importance biologique comme agents antimicrobiens, antitumoraux, antibiotiques, antifongiques, antibactériens, hypotensifs et anticonvulsivants⁴⁶ et comme inhibiteurs potentiels de l'aldose réductase (Figure 10)⁵ qui aident à traiter et prévenir les complications diabétiques engendrées par l'élévation du niveau de sorbitol ; les dérivés d'oxindole sont connus aussi comme des inhibiteurs d'enzymes ou comme inhibiteurs de HIV-1 protéase⁴⁷.

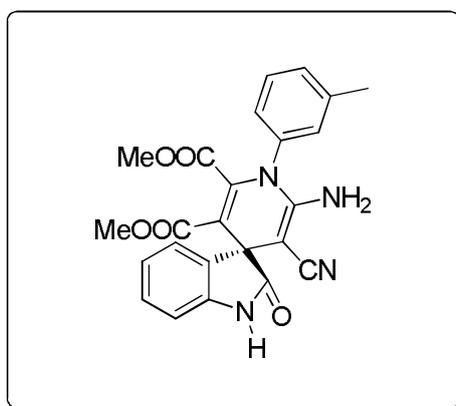


Figure .10 : Dérivé de spiro-[oxindole-pyrrolidine] qui possède une activité antidiabétique

⁴⁴ a) M. Ghandi, A. Taheri, A. Abbasi. *Tetrahedron Letters*.2010, 66, 6744 – 6748. b) M. Ghandi, A. Yari, S. J. T. Rezaei, A. Taheri. *Tetrahedron Letters*.2009, 50, 4724 – 4726

⁴⁵ a) G. Periyasami, R. Raghunathan, G. Surendiran, N. Mathivanan. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008, 18, 2342 – 2345. b) N. Arumugam, G. Periyasami, R. Raghunathan, S. Kamalraj, J. Muthumary. *European Journal of Medicinal Chemistry*.2011, 46, 600 – 607

⁴⁶H. Liu, G. Dou, D. Shi. *J. Comb. Chem.* 2010, 12, 292 – 294

⁴⁷S. U. Maheswari, K. Balamurugan, S. Perumal, P. Yogeewari, D. Sriram. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.2010, 20, 7278 – 7282

Dans ce qui suit on donne des exemples de produits spiro-[oxindole-pyrrolidines] avec illustrations sur leurs structures et leurs activités biologiques

I.2.1. Activité antibactérienne :

A.Thangamani⁴⁸ a procédé à la synthèse de deux spiro-oxindolopyrrolizidines 1'-(p-chlorophenyl)-2'-(2-thienylcarbonyl)-spiro[3H-indole-3,3'-[3H]pyrrolizine]-2-one et 1'-(p-fluorophenyl)-2'-(2-thienylcarbonyl)-spiro[3H-indole-3,3'-[3H]pyrrolizine]-2-one (Figure.11) qui ont montré une activité antibactérienne contre deux puissantes bactéries *staphylococcus aureus* et la *salmonella typhi* et cela à faible concentration (6,25µg /ml).

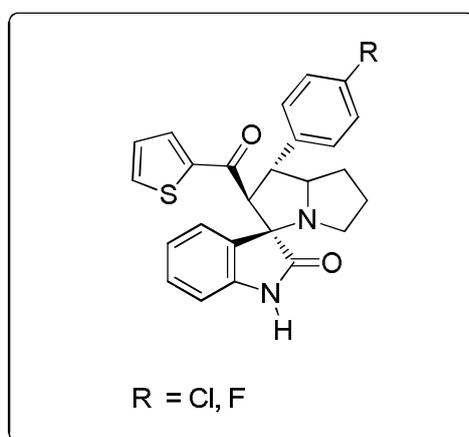


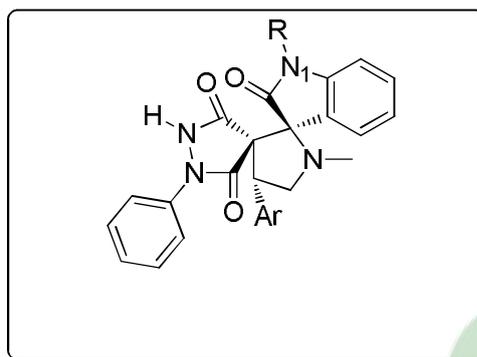
Figure 11 : Dérivés à activité antibactérienne

I.2.2. Activité anti-inflammatoire :

E. M. Hussein et ses collaborateurs⁴⁹ ont examiné l'activité anti inflammatoire des produits dispiro [pyrazolidine-4, 3'-pyrrolidine2',3''-indoline]-2'', 3,5-triones.

⁴⁸A. Thangamani. *European Journal of Medicinal Chemistry*.2010, 45, 6120 – 6126

⁴⁹E. M. Hussein, M. I. Abdel-Monem. *Arkivoc*.2011, 85 – 98,



Ar = C₆H₅, 4-ClC₆H₄, 4-BrC₆H₄, 4-OHC₆H₄, 4-CH₃OC₄H₄
 R = H, CH₃

Figure 12 : Dérivés de spiro-[oxindole-pyrrolidine] à activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire du produit ciblé a été déterminée in vivo (pour 10mg/kg par jour).

La relation entre la structure et l'activité, basée sur les résultats obtenus, indique que le type des substituants Ar et ceux liés à N1 sont des facteurs de contrôle pour développer les propriétés pharmaceutiques. La meilleure propriété anti-inflammatoire observée est celle qui coïncide avec la liaison N1-CH₃ et la liaison C-Ar (Phényle avec un substituant méthoxy). Cependant, avec un groupe phényle non substitué ou substitué avec un groupe attracteur (chlore ou brome), l'activité anti-inflammatoire diminue. Il a été montré que quand N1 est lié à un atome d'hydrogène, l'activité anti-inflammatoire augmente si Ar représente un groupe phényle substitué avec un groupement hydroxyle électro-donneur.

1.2.3. Activité anti-tumorale :

La Strychnofoline⁵⁰ (Figure 13) appartient à une classe de produits naturels isolés à partir des feuilles de *Strychnos usambarensis* qui affiche une activité potentielle anti-mélanomique et anti-cellule tumorale d'Ehrlich, observée par des essais effectués sur des rats.

⁵⁰A. Lerchner, E. M. Carreira. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 14826 – 14827

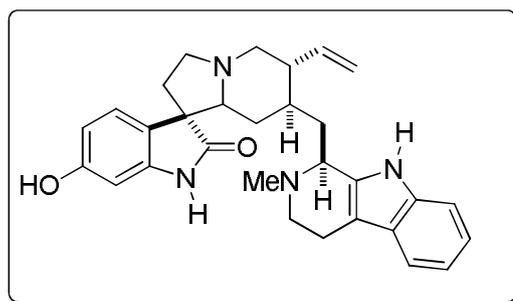


Figure 13 : La Strychnofoline

1.2.4. Activité anti-tuberculeuse :

S. Perumal et ses collaborateurs⁶ ont cherché à développer de nouveaux médicaments contre la tuberculose via la synthèse de dispiropyrrolidines (figure 14) à travers de nouvelles réactions multi composants qui offrent un accès rapide à des molécules de structures compliquées et poly-fonctionnalisées en une seule étape.

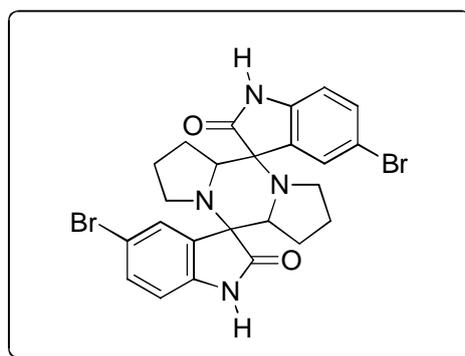


Figure 14 : Dérivé de spiro-[oxindole-pyrrolidine] à activité antituberculeuse

Ce produit a montré une efficacité remarquable à faible concentration de 5.61 μM contre le H37Rv qui est un type de tuberculose.

1.2.5. Activité antidiabétique :

S. Narayanan et ses collaborateurs ont synthétisé des dérivés de 5-arylidène-1,3-thiazolidine-2,4-dione et 5-arylidène-4-thioxo-1,3-thiazolidine-2-one (Figure 15) via la cycloaddition 1,3dipolaire. Les produits synthétisés ont été soumis par la suite à des essais biologiques qui ont révélé que ces dérivés avaient une meilleure activité anti diabétique⁵¹.

⁵¹R. Murugan, S. Anbazhagan, S. S. Narayanan. *European Journal of Medicinal Chemistry*.2009, 44, 3272 – 3279

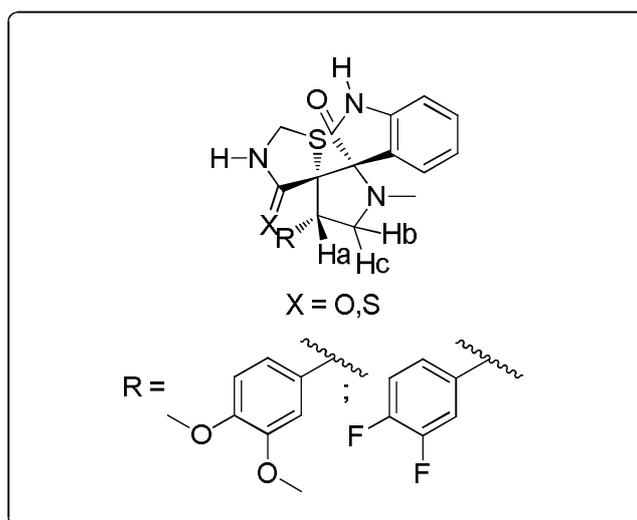


Figure 15 : Dérivés de spiro-[oxindole-pyrrolidine] à activité antidiabétique.

A une concentration d'administration de 200mg/kg, ce médicament a fait diminuer d'une manière considérable le niveau du glucose dans le sang.

1.2.6. Activité antifongique :

Les travaux de A. Amal et ses collaborateurs⁵² sont basés sur la synthèse d'une série de produits spiraniques caractérisés par des activités antifongiques prononcées. Parmi ces produits, on trouve la 1-N-méthyl-spiro [2.3¹] oxindole-spiro [3.2¹¹]1¹¹-cyclohexanone-4-aryl-pyrrolidine (Figure 16).

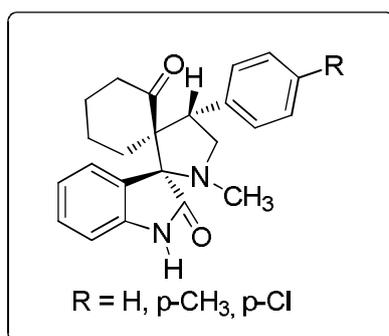


Figure 16 : Dérivés de spiro-[oxindole-pyrrolidine] à activité antifongique

Les essais sur les dermatophytes ont montré un taux d'activité inhibitrice de 100% à 200µL de concentration. L'introduction du chlore comme substituant sur le groupe aryle augmente ce taux d'activité qui peut atteindre les 100% à une concentration de 50µL.

⁵²A. Amal, R. Raghunathan, M. R. SrideviKumari, N. Raman. Bioorganic & Medicinal Chemistry.2003, 11, 407 – 419

1.2.7. Activité antihistaminique :

Parmi les propriétés biologiques des dérivés de spiro-[oxindole-pyrrolidines], on cite l'activité antihistaminique qui caractérise le produit spiro [3H-indole-3,2'-thiazolidine]-2,4'-(1H)-diones (Figure 17) qui a été synthétisé par K. Arya et ses collaborateurs⁵³.

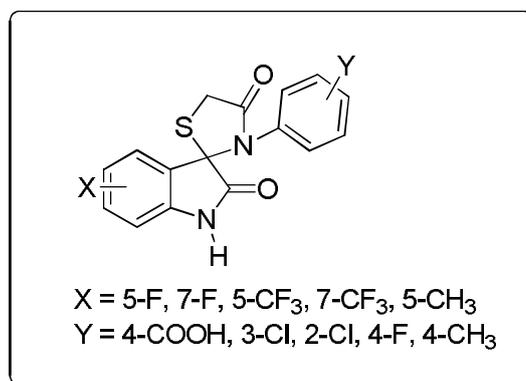


Figure 17 : Dérivés de spiro-[oxindole-pyrrolidine] à activité antihistaminique

Le produit synthétisé est évalué pour son aptitude à inhiber les contractions induites par l'histamine. L'activité est liée étroitement à la nature des substituants liés aux groupes phényle ou indole ; les groupes électro-attracteurs augmentent le pouvoir d'inhibition par rapport aux groupes électro-donneurs qu'ils soient sur le phényle ou sur l'indole.

1.3. DIFFERENTES METHODES DE SYNTHÈSE DES PRODUITS SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES]:

Les dérivés de spiro-[oxindole-pyrrolidines] se préparent à travers différentes voies de synthèse. Nous allons en décrire quelques unes.

1.3.1. Expansion du cycle :

Une nouvelle méthode pour la préparation de spiro-[oxindole-pyrrolidines] a été développée par Carrera et ses collaborateurs. Elle nécessite l'expansion de spirocyclopropane en utilisant le sel de magnésium. Cette méthodologie est utilisée au

⁵³K. Arya, D. S. Rawat, A. Dandia, H. Sasai. *Journal of Fluorine Chemistry*.2012, 137, 117 – 122

niveau de la synthèse de la (±)-Horsfiline, (-)-Stryprostatin B et (±)-Strychnofoline³³. Le mécanisme proposé pour l'expansion du cycle fait appel à l'iodure de magnésium en tant que réactif bi-fonctionnel puisque le magnésium agit comme un acide de Lewis et l'iodure comme un nucléophile, agissant ensemble pour l'ouverture du cycle⁵⁴.

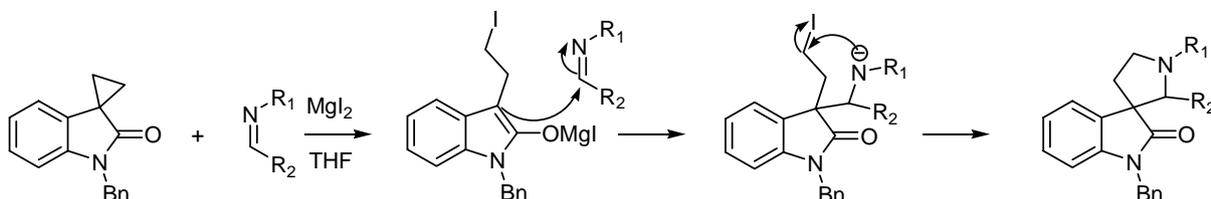


Figure 18 : Mécanisme général de l'expansion du cycle

Pour la synthèse de la (-)-spirotryprostatin B (Figure 20), le spirocyclopropane a été préparé comme un mélange de diastéréoisomères en utilisant le diazo-cétone, l'acétate de rhodium et le pipérylène. Le cyclopropane résultant a été chauffé dans le THF avec une imine en présence de l'iodure de magnésium pour donner un mélange de deux diastéréoisomères.

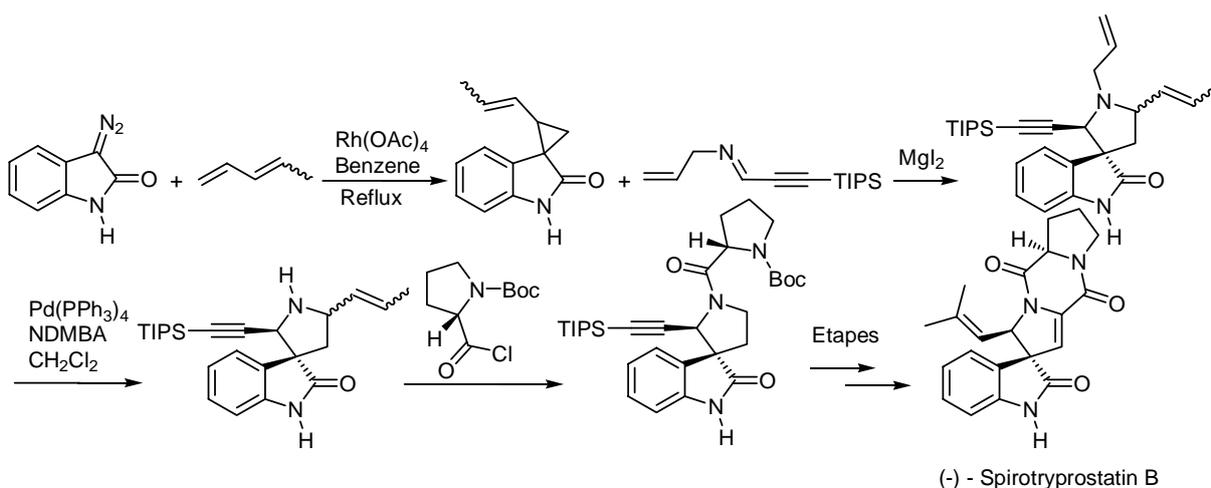


Figure 19 : Synthèse de (-) – Spirotryprostatin B

1.3.2. Réarrangement oxydatif:

L'une des plus populaires méthodes de synthèse de spiro [pyrrolidine-3,3'-oxindoles] est une séquence de réarrangement oxydatif de tétrahydro-β-carbolines³⁷. Une variété d'oxydants peut être employée tel que le tétroxyde d'osmium, l'hypochlorite de

⁵⁴B. M. Trost, M. K. Brenan. *Synthesis*.2009, 18, 3003 – 3025

tertiobutyle et le N-bromosuccinimide. Cette réaction peut être contrôlée à travers l'utilisation des conditions d'oxydation appropriées (Figure 20)

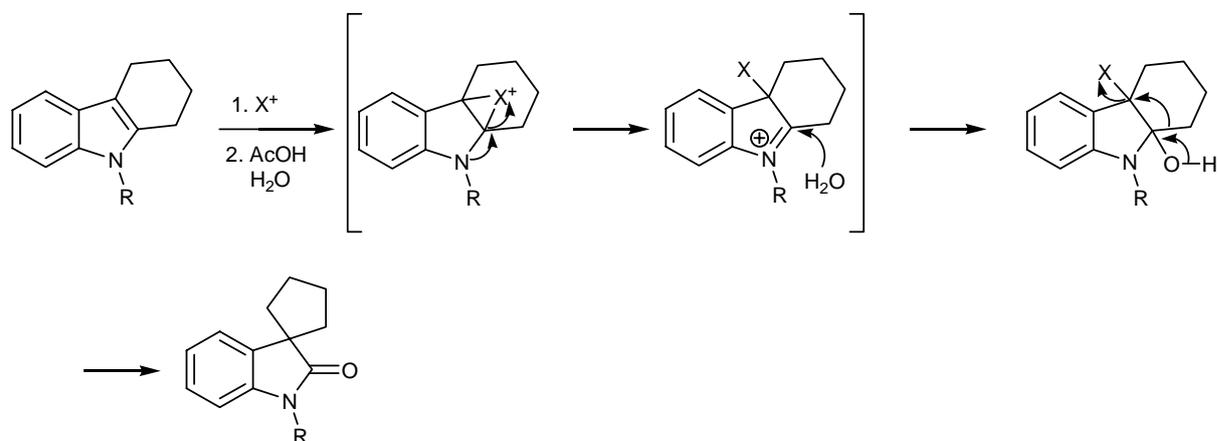


Figure 20 : Réaction de réarrangement oxydatif

Une autre synthèse utilise également le réarrangement oxydatif pour installer l'oxindole et le spirocycle en une seule étape chimique, chose qu'on peut trouver au niveau de la de paraherquamide A synthétisé par A. William ; sachant que cette espèce appartient à une famille structurellement complexe d'alcaloïdes. L'hypochlorite de tertibutyle est ajouté pour former le 3-chloroindoline, lequel, quand il est traité par l'acide *p*-toluènesulfonique dans le tétrahydrofur aqueux a formé l'oxindole (Figure 21).

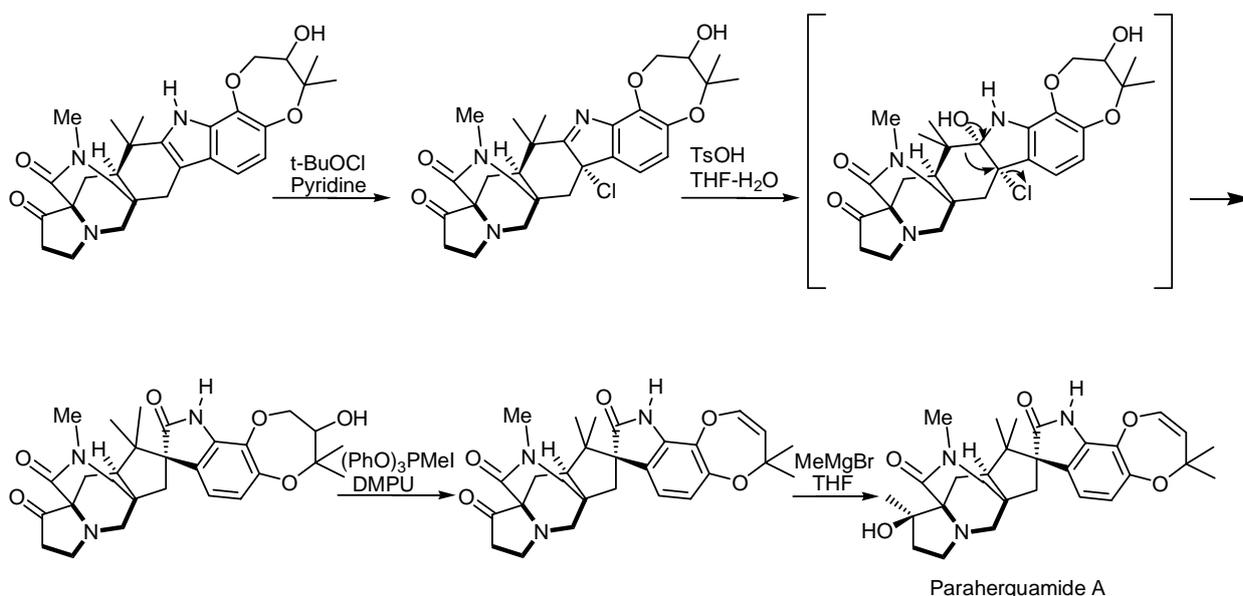


Figure 21 : Synthèse de la Paraherquamide A

1.3.3. Cycloaddition :

1.3.3.a. Addition nucléophile sur les isocyanides :

S. E. Kiruthika et ses collaborateurs ont décrit une réaction (one pot multi-composants) pour la synthèse d'une collection en spiro-dihydropyridines employant mono/di/tri-cétones, malononitrile, amines primaires et esters acétyléniques⁵. L'intermédiaire zwitterionique, formé in situ à partir des amines et des esters acétyléniques joue un rôle clé dans la formation de spiro-dihydropyridines (Figure 22).

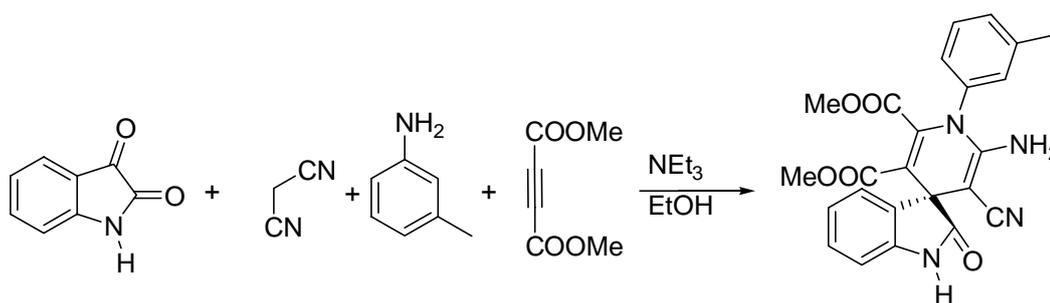


Figure 22 : Synthèse de 2-oxospiro-[indole-3,4'-(1',4'-dihydropyridine)]

Le mécanisme proposé pour cette réaction est le suivant (Figure 23):

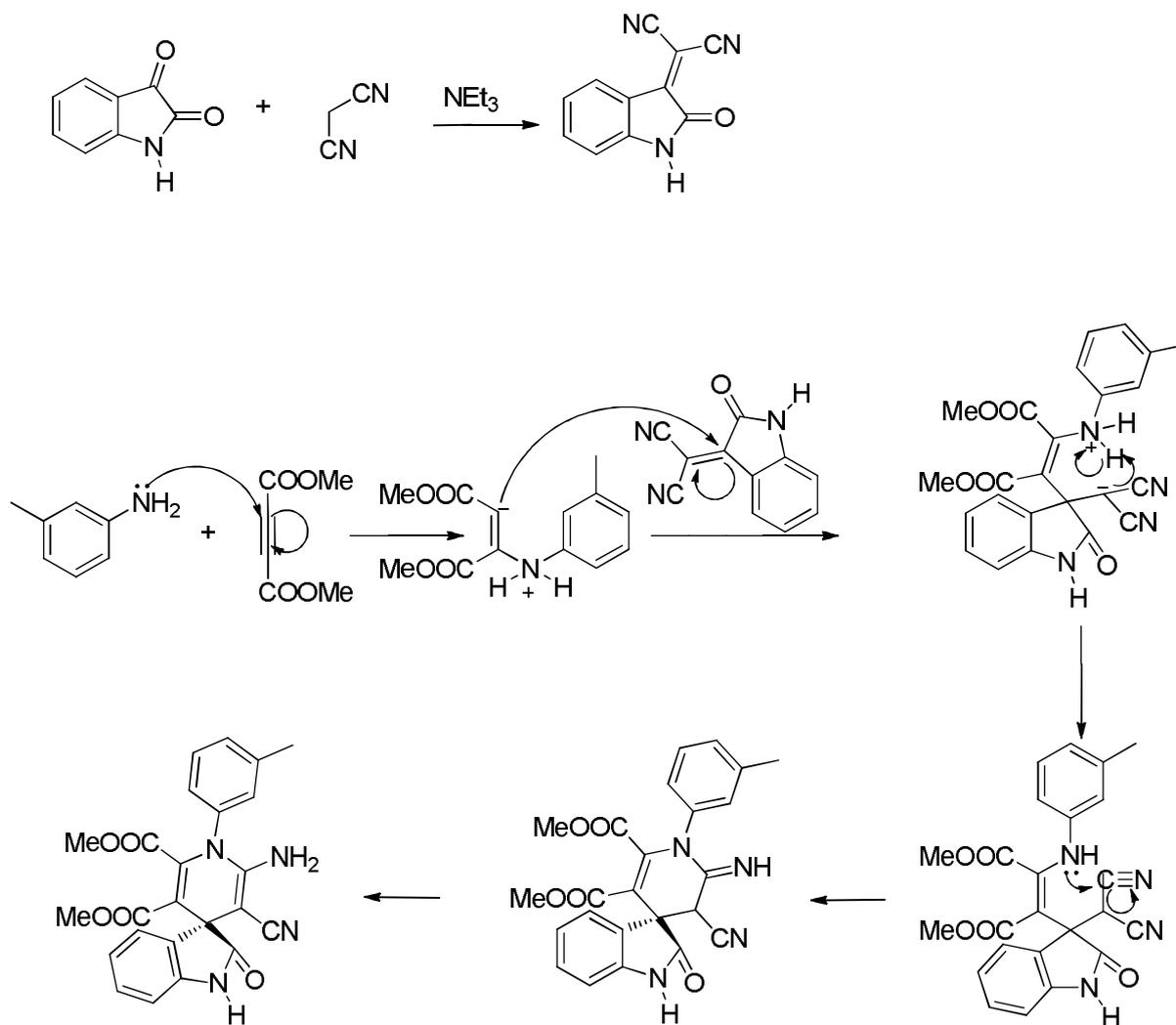
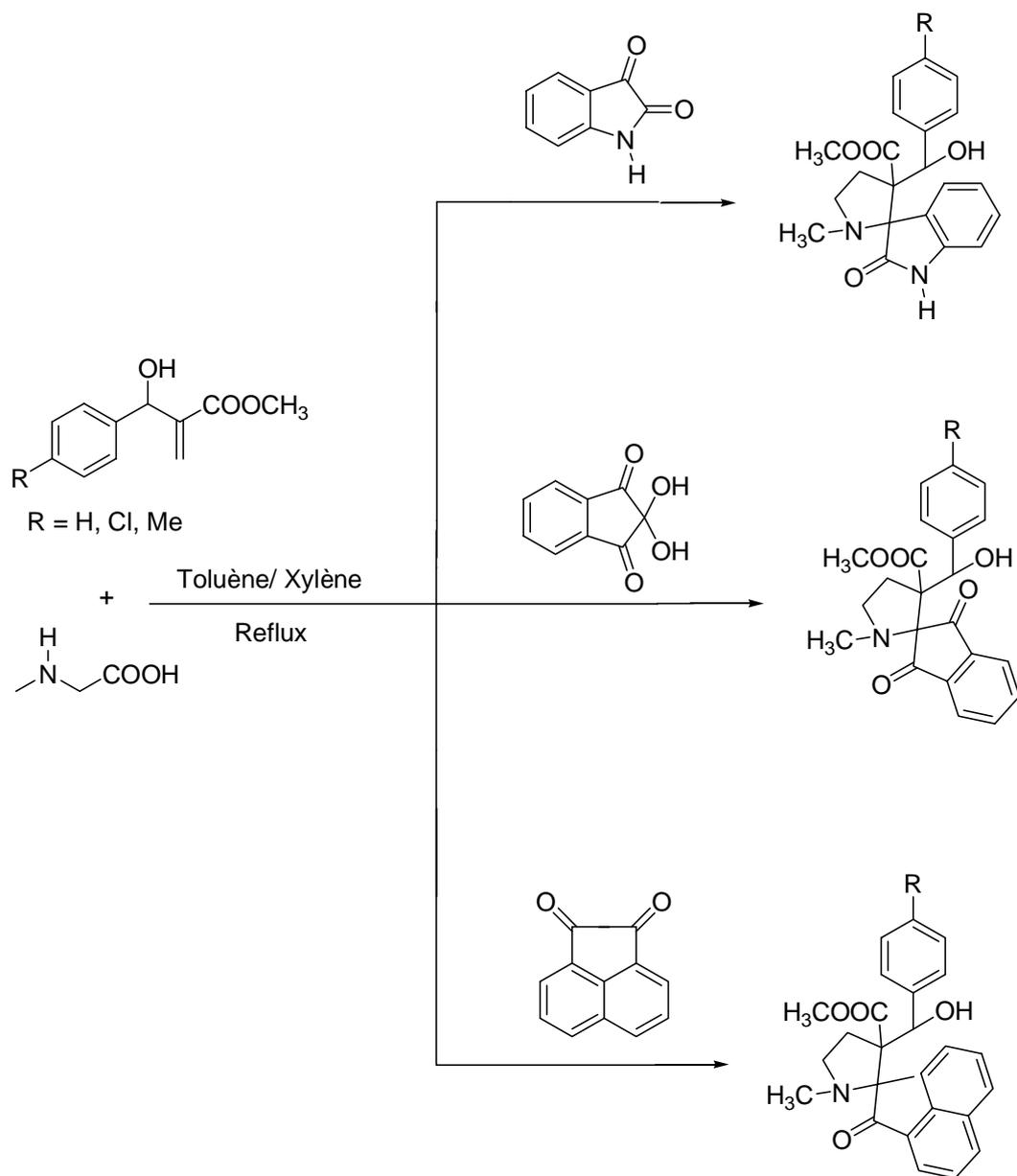


Figure 23 : Mécanisme plausible pour la formation de spirodihydropyridine

IV. 3. b. Cycloaddition [3+2] avec adduit de Baylis-Hillman comme dipolarophile :

La réaction Baylis-Hillman(BH) est une méthode attractive pour former des liaisons simples carbone-carbone et produire des produits fonctionnalisés.

J. Jayashankaran et ses collaborateurs⁵⁵, par le biais de la réaction de cycloaddition de l'ylure d'azométhine instable sur une liaison oléfinique (adduit de Baylis-Hillman), ont pu synthétiser de nouveaux spiro-hétérocycles.



⁵⁵J. Jayashankaran, R. D. R. S. Manian, M. Sivaguru, R. Rughunathan. *Tetrahedron Letters*.2006, 47, 5535 – 5538

1.3.4. Synthèse de dérivés spiro-[oxindole-pyrrolidines] en absence et en présence de dipolarophile:

R. T. Pardasani et ses collaborateurs⁵⁶ ont procédé à la synthèse de dérivés de spiro-oxindoles via une réaction de condensation de l'isatine sur la L-Proline qui conduit à une espèce iminium comme intermédiaire. Ce dérivé donne par la suite la possibilité d'offrir deux voies réactionnelles :

1. Une cyclisation intramoléculaire pour donner le produit (2-S, 5-S)-spiro {1-aza-3-oxa-bicyclo [3, 3,0] octane-2, 3'-indole} 4,2'-dione (A).
2. Une decarboxylation pour donner un yluire d'azomethine qui subit une cycloaddition 1,3 dipolaire pour donner (2-R, 5-S)-spiro{3-phenyl-1-aza-bicyclo[3,3,0]octane-2,3'-indol}2'-one(B) si le dipolarophile est le phenylacétylene ; ou le (2-R, 5-S)-spiro{3-ethoxycarbonyl-1-aza-bicyclo[3,3,0]octane-2,3'-indol}2'-one (C) si le dipolarophile est l'éthyle phenylpropiolate (Figure 24).

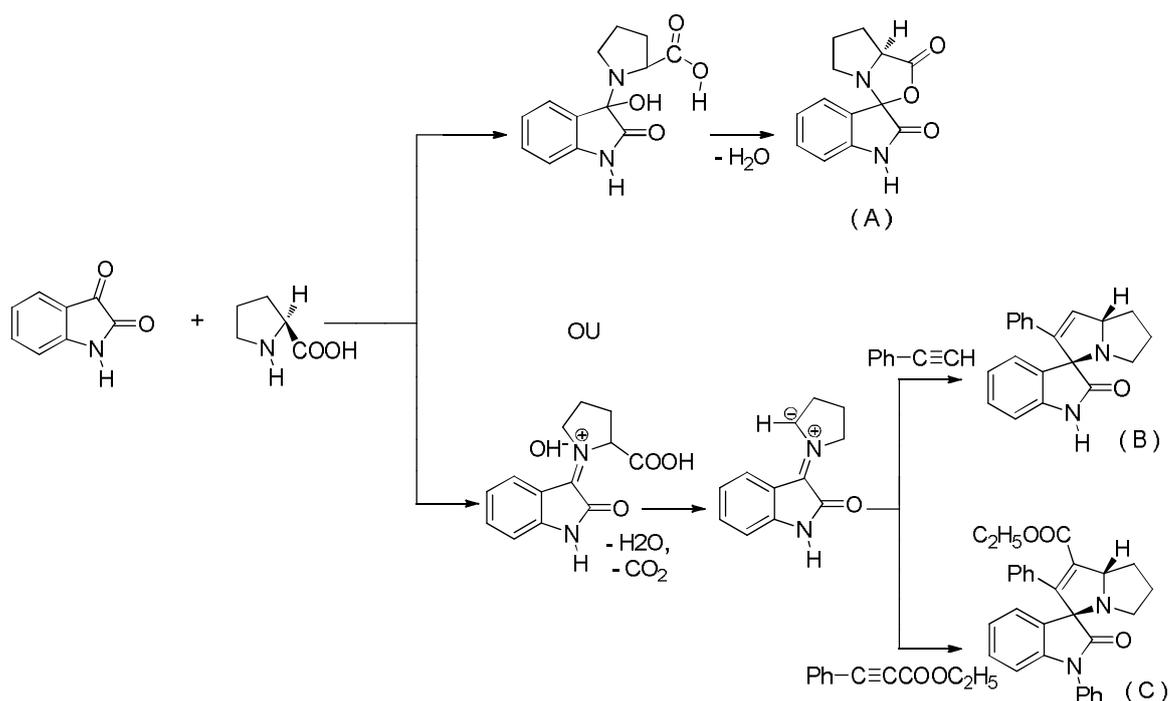


Figure 24 : Réaction de l'isatine avec la L-Proline en absence et en présence du dipolarophile

⁵⁶R. T. Pardasani, P. Pardasani, V. Chaturvedi, S. K. Yadav, A. Saxena, I. Sharma. *Heteroatom Chemistry*.2003, 14, 37 – 41

1.3.5. Addition – Elimination asymétrique :

Afin de synthétiser des oxindoles chiraux, Fuji et ses collaborateurs ont développé un protocole de nitrooléfination asymétrique qui utilise un auxiliaire chiral pour préparer certains alcaloïdes tels que (-)-Horsifiline et (-)-Spirotryprostatin.

Pour la synthèse de (-)-Horsifiline⁴⁵ (Figure 25), le centre quaternaire qui va se transformer dans la spiropyrrolidine est formé en utilisant un auxiliaire chiral de nitrooléfination d'un dérivé de la Proline.

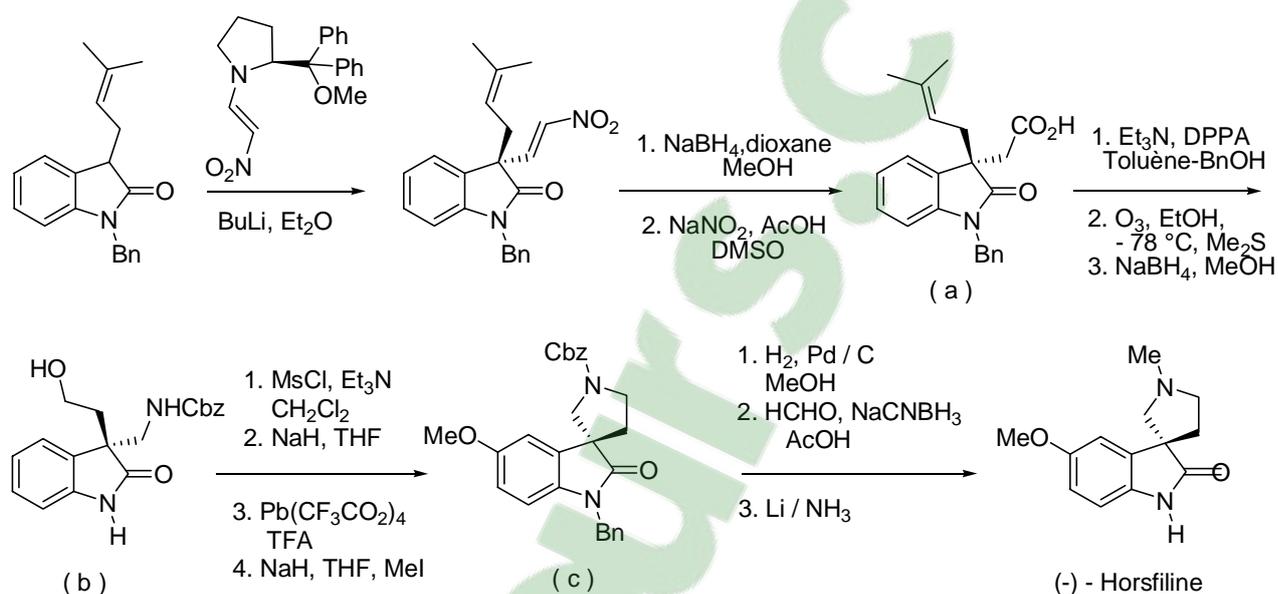


Figure 25 : Synthèse du (-) – Horsifiline

La réduction de ce groupe nitro vinyle est suivie par une conversion du nitro – alcane en un acide carboxylique.

Le réarrangement thermique suivi d'ozonolyse de l'oléfine, après réduction, conduit à l'alcool souhaité (b). La Méthylation suivie d'un traitement par un hydrure termine la construction de ce cycle pyrrolidinique par le biais d'une réaction de substitution intramoléculaire.

Le spiro-oxindole est par la suite transformé en (-) – Horsifiline après plusieurs étapes.

1.3.6. Synthèse des composés, catalysée par le cuivre :

Récemment, il y a eu une remarquable progression pour établir des stratégies de préparation des N-hétérocycles catalysées par des mélanges de cuivre et de catalyseurs cuivreux⁵⁷ facilement disponibles, insensible à l'air, faiblement toxiques et bon marché.

Les recherches de Scheidt ont abouti à la synthèse de composés spiro-[oxindole-pyrrolidines] via une réaction catalysée par ce mélange cuivrique avec trois composés : l'imine, le dérivé diazo et un dipolarophile (oléfine substituée) (Figure 26).

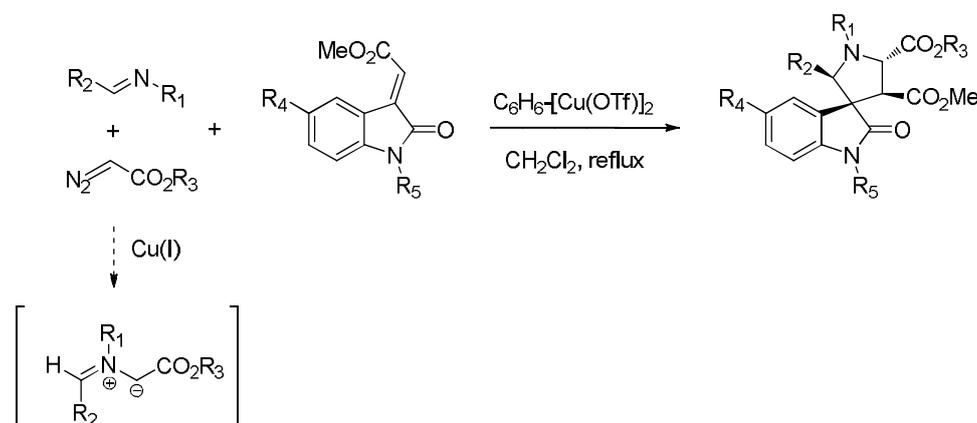


Figure 26 : Synthèse catalysée par le cuivre

Le couplage de l'imine et diazo-ester, est catalysé par le cuivre, conduit à une espèce azométhine suivie d'une cycloaddition avec une oléfine substituée (dipolarophile) ; cette stratégie permet la synthèse de spiro-[oxindole-pyrrolidines] avec un excellent rendement et une très bonne régiosélectivité.

L'étude bibliographique montre bien l'intérêt biologique et pharmacologique des dérivés de spiro-[oxindole-pyrrolidines] qui possèdent des activités thérapeutiques très importantes. Ce sont des agents anti-inflammatoires, analgésiques, antihistaminiques, antiviraux, antifongiques,....etc. et cela selon le récepteur sur lequel ils agissent.

Cela nous a encouragé à développer une approche de synthèse permettant un accès simple et facile à ce genre de structure par diverses techniques telles que les micro-ondes et les ultrasons en milieu sec chaque fois que cela est possible, dans un souci de préservation de l'environnement.

⁵⁷ T. Liu, H. Fu, *Synthesis*.2012, 44, 2804 – 2805.

CHAPITRE II

SYNTHESE *DES SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES]*

INTRODUCTION

II. 1. STRATEGIE DE SYNTHESE

II. 2. TECHNIQUES DE SYNTHESE UTILISEES

II.3. REACTIFS SYNTHETISES

II.4. PRODUITS REALISES :

II.4.1. Synthèse de l'ylure d'azomethine

II.4.2. Optimisation des conditions opératoires pour chaque technique

II.4.2.1. Le Chauffage classique

II.4.2.2. L'Activation par les ondes Ultrasons

II.4.2.3. L'Irradiations par les Micro-ondes

II.4.3. Synthèse des dérivés de spiro-[oxindole-pyrrolidines]

a. 3'-benzoyl-1'-methyl-4'-phenylspiro [indoline-3,2'-pyrrolidin]-2-one et ses dérivés

b. 2'-benzoyl-1'-phenyl-1',2',5',6',7',7a'-hexahydrospiro [indoline-3,3'-pyrrolizin]-2-one et ses dérivés

c. 3'-benzoyl-4',5'-diphenylspiro[indoline-3,2'-pyrrolidin]-2-one et ses dérivés

II.5. INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS

II.5.1. Comparaison des techniques de synthèse

II.5.2. Comparaison des résultats des acides aminés utilisés

II.6. DETERMINATION STRUCTURALE DES SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES] OBTENUS PAR RMN 2D

Clicours.COM

INTRODUCTION :

Partant de l'idée que les produits spiro-[oxindole-pyrrolidines] jouissent d'une importance biologique qui ne cesse de s'amplifier comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, nous avons essayé à travers une série de synthèses de préparer quelques dérivés de cette famille et cela via la réaction multi-composés essentiellement basée sur la cycloaddition 1,3 dipolaire one-pot. Les réactions en question emploient les chalcones qui ont été préparées comme dipolarophiles et des ylures d'azomethine issus de l'isatine comme dipôles. Ces derniers sont formés in-situ via une condensation de Knoevenagel de l'isatine sur un acide aminé, suivie d'une décarboxylation.

Du fait que les deux familles de composés (isatines et chalcones) possèdent séparément des activités biologiques intéressantes en particulier antifongiques la question était donc de savoir comment va évoluer cette activité si on réalisait un couplage entre ces deux familles pour conduire à de nouveaux spiro-[oxindole-pyrrolidines]. Afin de répondre à cette question, nous avons effectué des tests d'évaluation de leur activité antifongique.

II.1. STRATEGIE DE SYNTHÈSE :

La stratégie adoptée pour la préparation de ces spiro-[oxindole-pyrrolidines] est la synthèse multi-composés (one pot) caractérisée par le mélange de trois (03) réactifs : l'isatine, un acide aminé et une chalcone ; qui vont tout d'abord former un dipôle 1,3 l'ylure d'azomethine, entre l'isatine et l'acide aminé via une condensation de Knoevenagel suivie d'une décarboxylation. Ce dipôle est ensuite additionné à la chalcone.

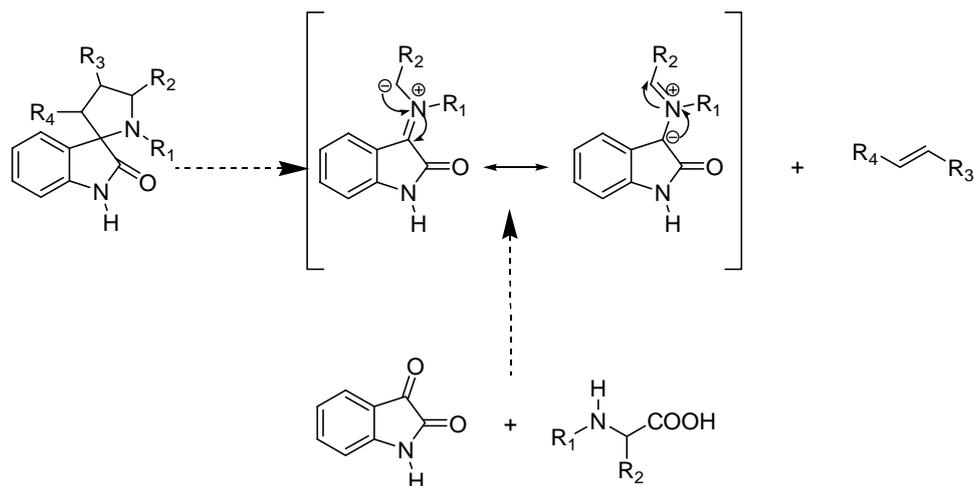


Figure 27 : Schéma de retro-synthèse de spiro-[oxindole-pyrrolidines] synthétisées au cours de ce travail

Comme toute réaction de cycloaddition, on peut penser que cette stratégie peu conduire à deux cycloadduits issus des deux sens d'addition.

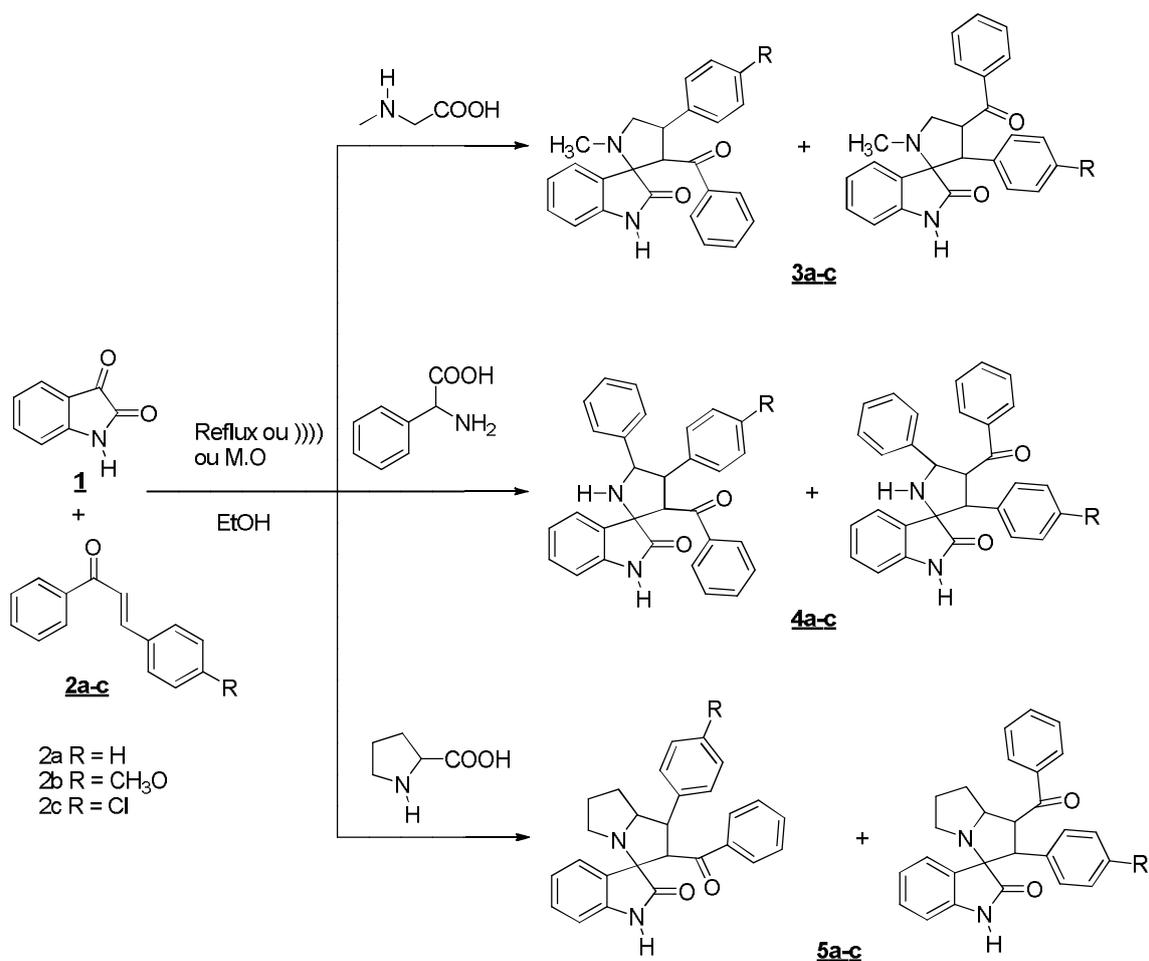


Figure 28 : Synthèse des dérivés de spiro-[oxindole-pyrrolidines] théoriquement attendus

II.2. TECHNIQUES DE SYNTHÈSE UTILISÉES :

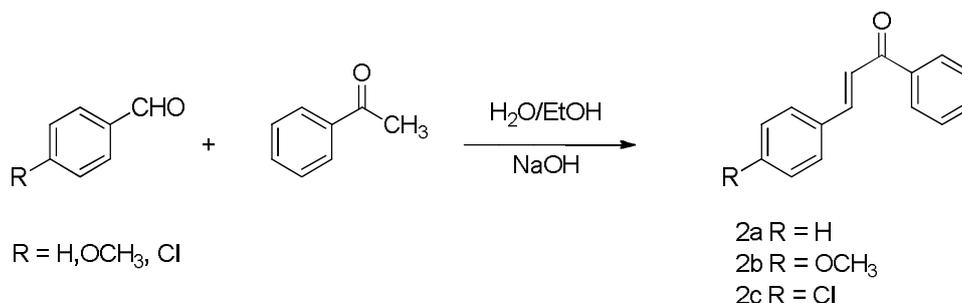
Afin de réaliser ces synthèses, trois techniques ont été utilisées:

- Le chauffage classique qui est connu par l'usage de solvants, le plus souvent toxiques ainsi que des temps de réaction parfois assez longs.
- L'activation par les ultrasons qui présente l'avantage de travailler à des températures peu élevées voir ambiantes.
- L'irradiation par les micro-ondes qui ne cesse de gagner du terrain chaque jour et cela en raison de ses avantages à savoir la possibilité de suppression de l'usage de solvant et des temps de réaction très courts⁵⁸.

II.3. REACTIFS SYNTHÉTISÉS :

Les chalcones :

La préparation du 1,3-diphényl -2-propène-1-one, connu sous le nom de chalcone et ses dérivés, se fait par la condensation de Claisen-Schmidt⁵⁹ d'un aldéhyde et d'une cétone par une catalyse acide ou basique (le cas de notre travail) suivie de déshydratation.



A cet effet, dans le solvant H₂O/EtOH, nous avons fait une condensation catalysée par une base forte (NaOH) de 1 équivalent de l'acétophénone sur 1 équivalent de benzaldéhyde ou l'un de ces dérivés. Le mélange est soumis à l'agitation, à température ambiante, pendant 02 à 03 heures selon le substituant sur le phényle.

⁵⁸ a) M. Dabiri, Z. N. Tisseh, M. Bahramnejad, A. Bazgir. *Ultrasonics Sonochemistry*.2011, 18, 1153 – 1159

b) A. Dandia, R. Singh, S. Bhaskaran. *Ultrasonics Sonochemistry*.2010, 17, 399 – 402

⁵⁹ C. B. Patil, S. K. Mahajan, S. A. Katti, Chettana B Patil et al / *J. Pharm. Sci. & Res.*2009, 1, 11 – 22.

Le tableau 1 suivant regroupe les résultats de ces essais:

| R | Produit | Rendement (%) | Point de fusion (°C) |
|------------------|-----------|---------------|----------------------|
| H | <u>2a</u> | 55 | 56 - 58 |
| OCH ₃ | <u>2b</u> | 75 | 79 - 81 |
| Cl | <u>2c</u> | 70 | 114 - 116 |

Tableau 1 : Caractéristiques physicochimiques des chalcones

II.4. PRODUITS SYNTHETISES :

II.4.1. Synthèse de l'ylure d'azomethine :

Ces dernières années, les ylures d'azomethine sont devenus l'une des classes des dipôles-1,3 les plus étudiées grâce notamment à leur fort pouvoir à piéger les dipôlarophiles²¹ dans les réactions de cycloaddition 1,3 dipolaire qui en général permettent de fournir une large gamme de produits hétérocycliques pyrrolidiniques biologiquement et pharmacologiquement intéressants^{16,60}. Les ylures d'azomethine sont des dipôles-1,3 planaires composés d'un atome d'azote et deux atomes terminaux de carbone hybridés Sp² (Figure 29)

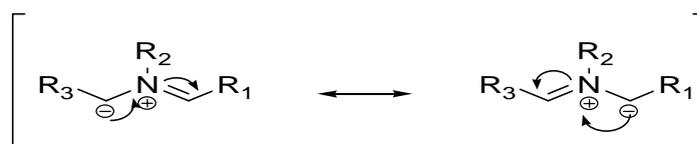


Figure 29 : L'ylure d'azomethine et ces formes limites

La cycloaddition des ylures d'azomethine avec des diplarophiles oléfiniques fournit une méthode simple et directe pour la synthèse des dérivés hétérocycliques pyrrolidiniques¹⁷ permettant aussi la formation des pyrrolizines et des pyrazolidines⁶¹.

⁶⁰H. Pellissier. *Tetrahedron Letters*.2007, 63, 3235 – 3285

⁶¹R. R. Kumar, S. Perumal, P. Senthilkumar, P. Yogeewari, D. Sriram. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009, 44, 3821 – 3829

Expérimentalement, les ylures d'azomethine sont générés « in situ » et piégés par presque toutes les liaisons multiples Carbone-Carbone ou Carbone-Hétéroatome.

Plusieurs méthodes ont été développées pour générer les ylures d'azomethine, parmi elle, la condensation décarboxylative des acides aminés qui fait l'objet de ce travail et qui offre un outil pratique pour synthétiser des pyrrolidines substitués²⁷.

II.4.2. Optimisation des conditions opératoires pour chaque technique :

Afin d'obtenir les conditions adéquates pour la synthèse des spiro-[oxindole-pyrrolidines], nous avons travaillé avec des quantités stœchiométriques mais les réactions n'avançaient que partiellement ce qui nous a poussé à faire varier les quantités de réactifs pour améliorer les rendements et cela de la manière suivante :

En travaillant avec des quantités stœchiométriques, nous avons remarqué qu'il restait toujours des réactifs de départ et cela même après 48 heures de reflux.

Nous avons donc changé ces quantités de manière à consommer toute la chalcone car elle présente les mêmes propriétés de solubilité que les spiro correspondants. Pour cela, nous avons augmenté le nombre d'équivalents d'isatine 1,1 eq (l'excès peut être éliminé par lavage dans l'éthanol) et un excès d'acide aminé qui va consommer l'isatine pour former l'ylure et le reste sera éliminé par simple lavage dans l'eau.

Trois modes d'activation ont été employés :

Le chauffage classique (reflux) : Le mélange est laissé réagir pendant 48 heures car au delà de ce temps, aucune amélioration du rendement n'a été relevée.

L'activation par les ultrasons : au delà de 08 heures de réaction aucune amélioration du rendement n'a été observée.

L'irradiation par micro-ondes :

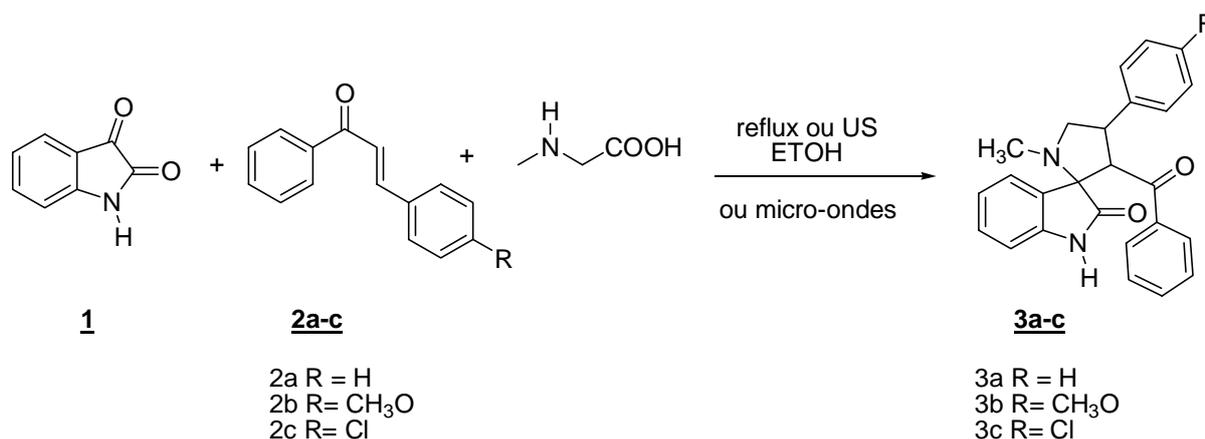
- Après 30 minutes et sous une puissance de 160W, ce que nous avons remarqué c'est uniquement la fusion des réactifs sans formation de nouveaux produits. Cette situation nous a amené à travailler avec la puissance supérieure (350W) qui s'avère appropriée pour cette réaction.

- Au delà de 350W, nous avons remarqué une dégradation totale (réactifs et produits sont cramés).

Le temps de réaction approprié était de 30 minutes pour les produits réalisés avec la sarcosine et l' α -phénylglycine et 25 minutes pour ceux réalisés avec la L-proline ; sachant que nous sommes partis de 05 minutes avec des paliers de 05minutes (05mn, 10mn, 15mn,..... etc.).

II.4.3. Synthèse des spiro [oxindole-pyrrolidines] :

II. 4.3.a. Synthèse de 3'-benzoyl-1'-methyl-4'-phenylspiro [indoline-3,2'-pyrrolidin]-2-one et ses dérivés :



La synthèse des spiro-[oxindole-pyrrolidines] est effectuée selon le protocole d'une seule étape. On fait réagir 1 équivalent de chalcone, 1,1 équivalent d'isatine et 1,5 équivalent de sarcosine (la sarcosine a été déshumidifiée au préalable dans un four à micro-ondes pendant 10 minutes à une puissance de 160W). Cette synthèse est réalisée par trois modes :

- Le chauffage classique : Le mélange est soumis à l'agitation et porté au reflux dans l'éthanol pendant 48heures (suivie par C.C.M).
- Activation par les ultrasons : Le mélange dans l'éthanol est activé par les ultra-sons à température ambiante. La réaction est suivie par C.C.M ce qui a permis d'estimer son temps à 08heures.

- Irradiation par micro-ondes : Sans passer par l'usage du solvant, le mélange est activé par exposition aux micro-ondes à une puissance de 350W. La réaction est suivie par CCM ce qui permet d'estimer le temps de réaction à 30minutes.

Les résultats de ces essais sont regroupés dans le tableau 2 suivant :

| R | Produit | La voie classique (reflux) | | La voie (Ultrason) | | La voie(Micro-ondes) | |
|------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|
| | | ^(a) Taux de conversion | Rendement | ^(a) Taux de conversion | Rendement | ^(a) Taux de conversion | Rendement |
| H | <u>3a</u> | 75 % | 67 % | 80 % | 72 % | 72 % | 58 % |
| OCH ₃ | <u>3b</u> | 66 % | 54 % | 83 % | 70 % | 81 % | 65 % |
| Cl | <u>3c</u> | 61 % | 43 % | 85 % | 68 % | 78 % | 55 % |

(a): Estimé par l'analyse RMN ¹H du brut réactionnel.

Tableau 2 : Rendement des cycloadduits obtenus par les trois méthodes d'activations :

Reflux, US, MO

Discussion :

1. Rendement et taux de conversion :

A partir du tableau 2 et selon les résultats des rendements et ceux des taux de conversion, on peut constater que les rendements obtenus par l'activation aux US sont légèrement, meilleurs par rapport à ceux des micro-ondes qui sont meilleurs par rapport à ceux du chauffage classique (sauf pour le produit 3a ou le rendement obtenu par chauffage classique est meilleur que celui des micro-ondes). En d'autres termes, les rendements obtenus par ultrasons et par micro-ondes sont nettement meilleurs.

2. Substituants :

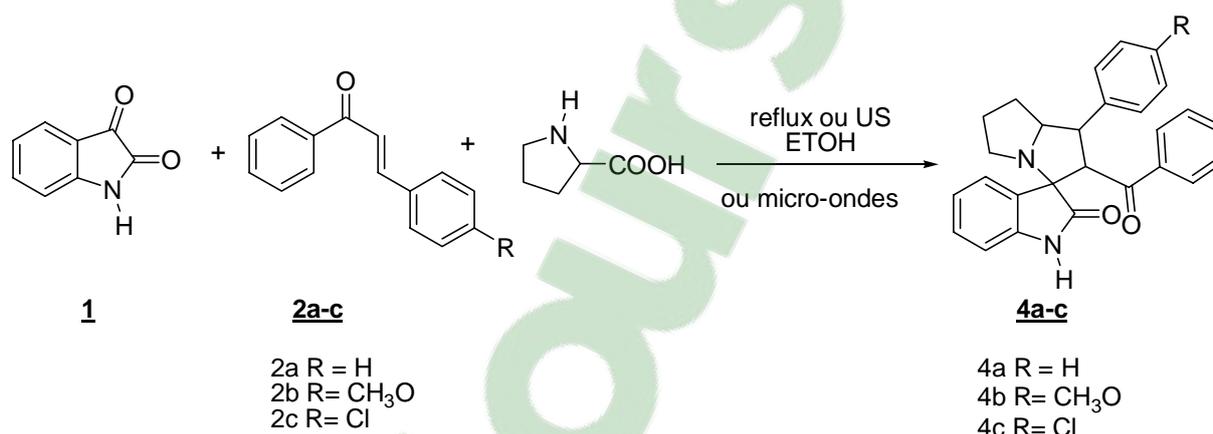
Le rôle des substituants (H, OCH₃, Cl) sur le phényle semble être assez minime puisque les résultats sont aléatoires et assez proches.

Les résultats des micro-ondes et des ultrasons sont assez proches avec un léger avantage pour les ultrasons. Mais le gain de temps réalisé qui est de 30 minutes au lieu de 08 heures pour les ultrasons nous fait dire que les micro-ondes restent la méthode de choix pour

accéder à ce type de molécules surtout que cette dernière est réalisée sans solvant et donc plus écologique en plus d'être plus économique en énergie.

La différence assez prononcée entre les rendements et les taux de conversion vient du fait que les spiro-[oxindole-pyrrolidines] obtenus sont partiellement solubles dans l'EtOH et le MeOH utilisé lors de la purification pour éliminer la chalcone restante. C'est pourquoi nous avons travaillé avec un excès en isatine en acide aminé, mais malgré cela, il restait toujours de la chalcone. Pour réaliser les tests biologiques, nous étions obligés de purifier au maximum nos produits ce qui nous a fait perdre en rendement.

II.4.3.b. Synthèse de 2'-benzoyl-1'-phenyl-1',2',5',6',7',7a'-hexahydrospiro [indoline-3,3'-pyrrolizin]-2-one et ses dérivés :



Cette synthèse est réalisée suivant les trois méthodes :

- Méthode de chauffage classique : Un mélange composé de 1 équivalent de chalcone, 1,1 équivalent d'isatine et 1,5 équivalents de L-Proline est agité et chauffé jusqu'au reflux dans un volume d'éthanol approprié, le suivi par C.C.M a fait apprécier le temps de réaction de 48heures.
- Méthode de sono-chimie : Le même mélange, dans la même quantité d'éthanol, est activé par les ondes ultra-sons et cela sous température ambiante. La réaction est suivie par C.C.M ce qui a permis d'estimer son temps de 08heures.

- Méthode d'irradiation par micro-ondes : Elle consiste en une activation du même mélange et cela par son exposition aux micro-ondes à une puissance de 350W, sans solvant. Le temps de réaction est estimé à 25minutes après un suivi par C.C.M.

Les résultats de ces essais sont regroupés dans le tableau 3 suivant :

| R | Produit | La voie classique (reflux) | | La voie (Ultra-son) | | La voie (Micro-ondes) | |
|------------------|-----------|----------------------------|-----------|---------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| | | Taux de conversion | Rendement | Taux de conversion | Rendement | Taux de conversion | Rendement |
| H | <u>4a</u> | 90 % | 76 % | 95 | 87 % | 94 % | 80 % |
| OCH ₃ | <u>4b</u> | 75 % | 62 % | 100 | 86 % | 89 % | 75 % |
| Cl | <u>4c</u> | 78 % | 69 % | 97 | 75 % | 85 % | 78 % |

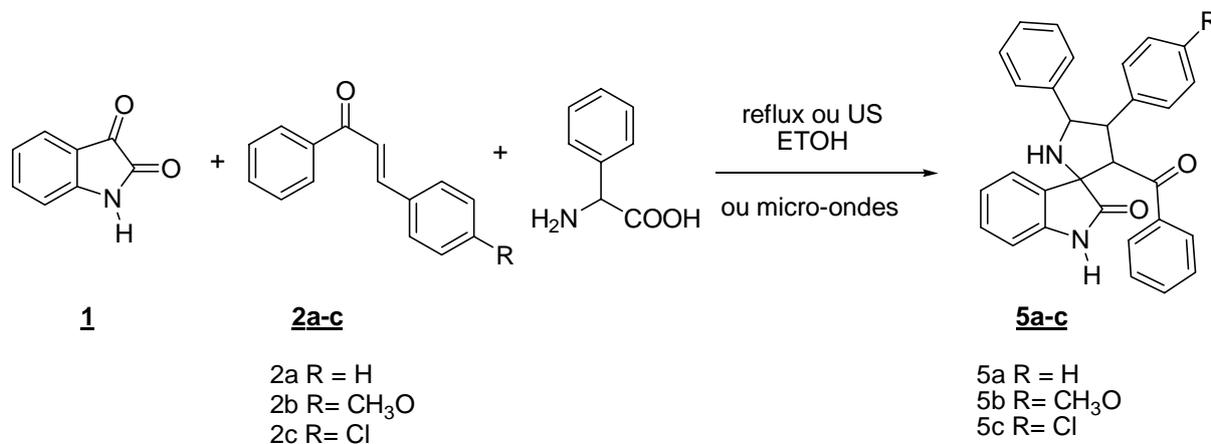
Tableau 3 : Rendements des produits 4, obtenus par les trois méthodes d'activation :

Reflux, US, MO

Discussion des rendements et des taux de conversion :

A partir du tableau 3 et selon les résultats des rendements et ceux des taux de conversion, on peut constater que là aussi les rendements obtenus par activation aux ultrasons sont meilleurs que ceux obtenus micro-ondes qui sont, pour leur part, meilleurs que ceux du chauffage classique.

II.4.3.c. Synthèse de 3'-benzoyl-4',5'-diphénylspiro [indoline-3,2'-pyrrolidin]-2-one et ses dérivés :



Les dérivés des spiro-[oxindole-pyrrolidines] sont préparés à partir d'un mélange de 1 équivalent de chalcone, 1,1 équivalent d'isatine et 1,5 équivalent d' α - Phénylglycine. Cette préparation est activée par les trois types d'activation et suivie par C.C.M tout cela selon le tableau 4 suivant :

| Méthode | Chauffage classique | Sono-chimie | Micro-ondes |
|-------------------|---------------------|-------------|----------------|
| Solvant | Ethanol | Ethanol | Pas de solvant |
| Mode d'activation | chauffage au reflux | ultrasons | micro-ondes |
| Temps de réaction | 48 heures | 08 heures | 0,5 heures |

Tableau 4 : Conditions opératoires des produits 5

Les résultats de ces essais sont regroupés dans le tableau 5 suivant :

| R | Produit | La voie classique (reflux) | | La voie(Ultra-son) | | La voie(Micro-ondes) | |
|------------------|-----------|----------------------------|-----------|--------------------|-----------|----------------------|-----------|
| | | Taux de conversion | Rendement | Taux de conversion | Rendement | Taux de conversion | Rendement |
| H | <u>5a</u> | 80 % | 75 % | 92 | 84 % | 84 % | 75 % |
| OCH ₃ | <u>5b</u> | 72 % | 69 % | 82 | 71 % | 79 % | 65 % |
| Cl | <u>5c</u> | 81 % | 77 % | 97 | 85 % | 92 % | 90 % |

Tableau 5 : Rendements des produits 5, obtenus par les trois méthodes d'activation : Reflux, US, MO

Discussion : Rendement et taux de conversion :

A partir des résultats obtenus, on peut là aussi constater que la méthode ultrasons et celle des micro-ondes sont plus avantageuses pour nos synthèses.

II.5. INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS :

II.5.1. Comparaison des techniques de synthèse :

Dans l'ensemble on constate que la technique d'activation par les Ultra-sons et celle de l'irradiation par micro-ondes ont donné des rendements élevés par rapport à la technique classique avec des temps très courts ce qui confirme l'étude bibliographique concernant les avantages de l'utilisation des deux premières techniques en terme d'amélioration du rendement tout en respectant l'économie d'énergie et du temps. Cependant les micro-ondes présentent l'avantage de n'utiliser aucun solvant. Cela fait de cette technique une méthode écologique en plus d'être économique.

II.5.2. Comparaison des acides aminés utilisés :

Les réactions qui ont utilisé la L-Proline et l' α -Phénylglycine ont enregistré des rendements élevés par rapport à celles qui utilisent de la sarcosine et cela à cause probablement des facteurs suivants :

1. La sarcosine utilisée est hygroscopique malgré qu'elle ait été exposée à une déshumidification dans un four à micro-ondes.
2. Le produit réalisé avec la sarcosine est caractérisé par une solubilité élevée dans le solvant ce qui fait baisser la quantité récupérée après filtration.

Après l'achèvement de la réaction, un seul produit a été obtenu.

II.6. DETERMINATION STRUCTURALE DES SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES] PAR RMN 2D :

Théoriquement, la réaction de cycloaddition dipolaire-1,3 entre l'ylure d'azomethine et la chalcone peut conduire à deux cycloadduits (Figure 30).

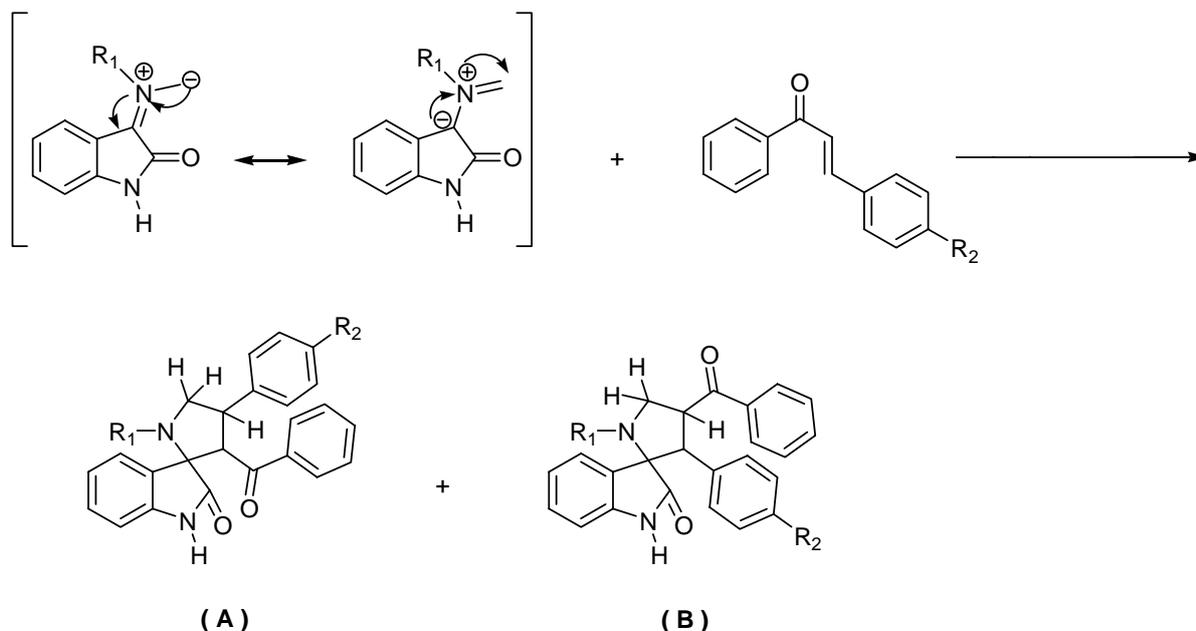


Figure 30

Or, l'analyse RMN du brut réactionnel a montré un seul isomère. Pour élucider sa structure, nous avons fait appel à la RMN 2D qui va nous permettre de trancher entre les deux cycloadduits A et B. Pour cela, nous avons choisi le composé 3c comme exemple pour cette étude structurale. Les spectres RMN¹H et ¹³C sont représentés respectivement sur les figures 31 et 32.

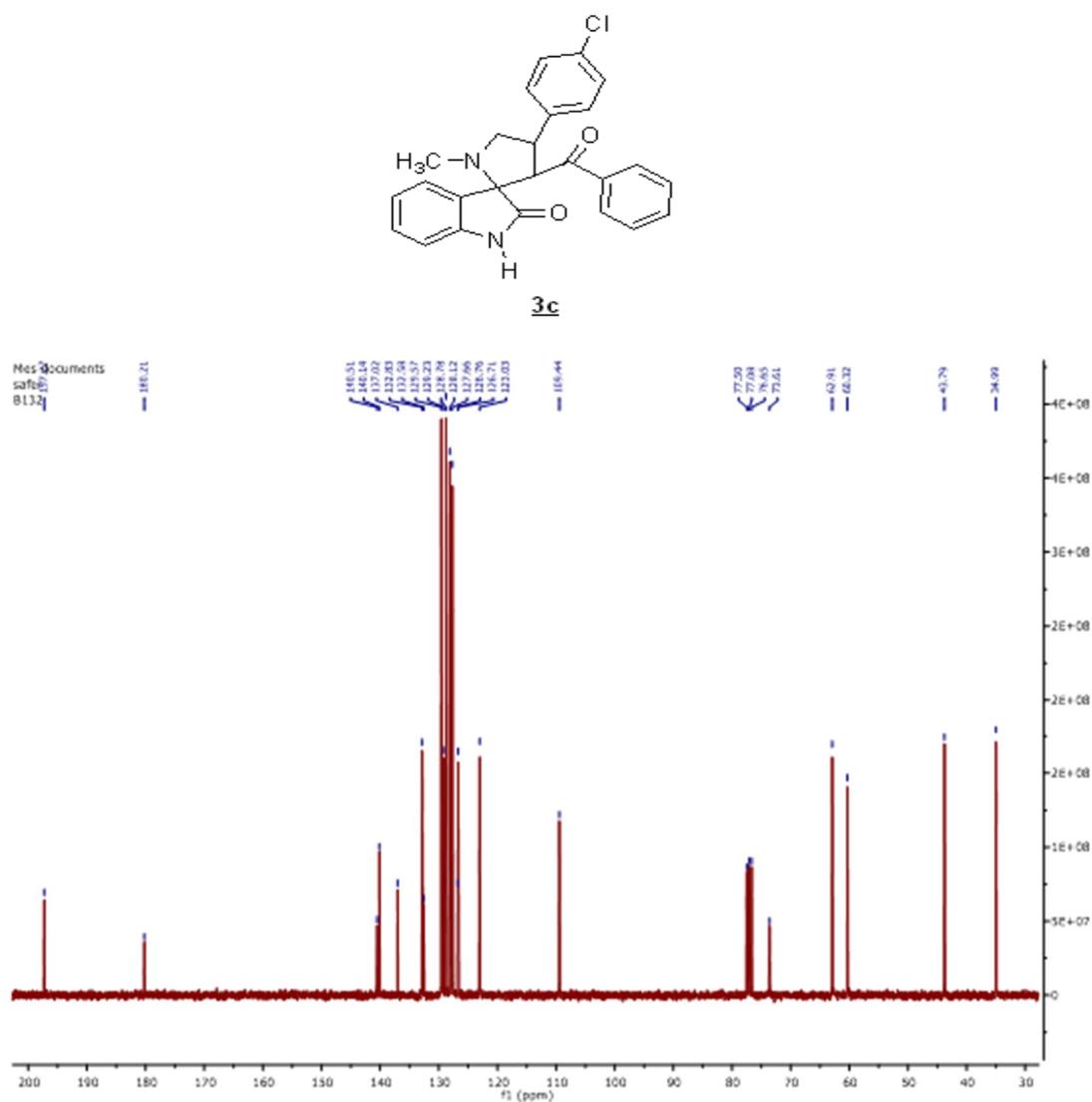


Figure 32 : Spectre RMN ^{13}C de la molécule **3c**

Tout d'abord, nous avons réalisé un spectre Dept 135 (Figure 33) afin d'identifier le CH_2 et une superposition des spectres ^{13}C ET Dept135 afin d'identifier le carbone quaternaire au niveau du nœud du spiro (Figure 34).

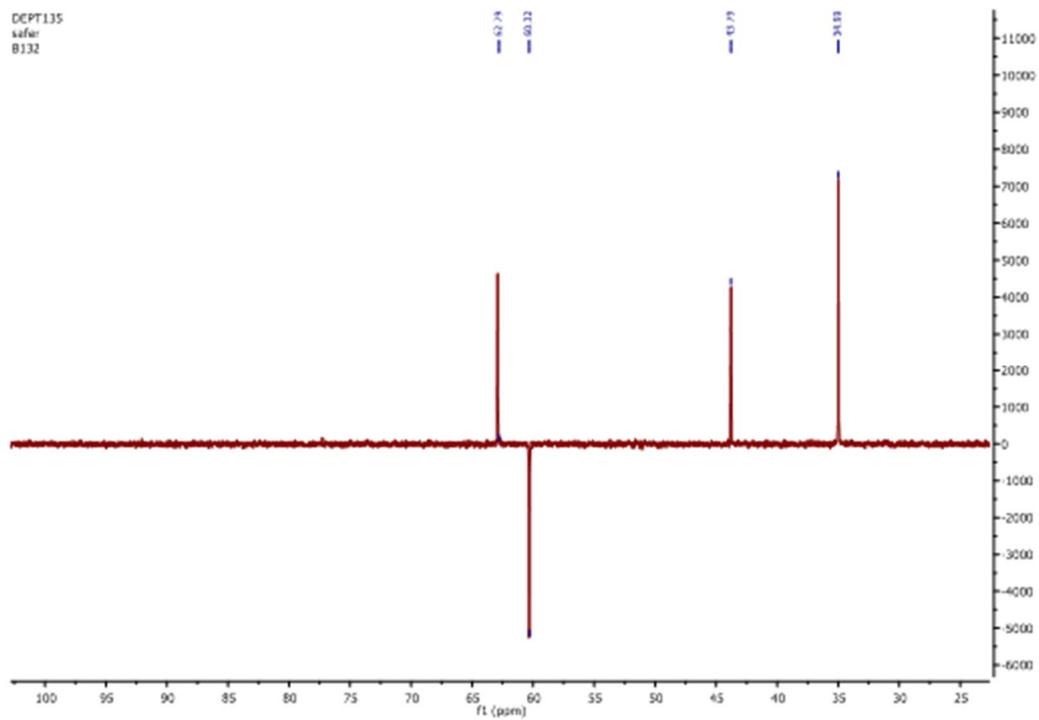
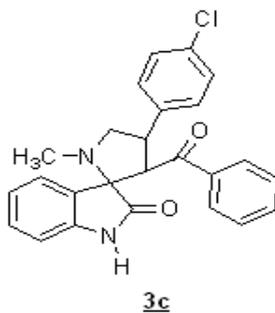


Figure 33 : Spectre RMN-Dept 135 de la molécule **3c**

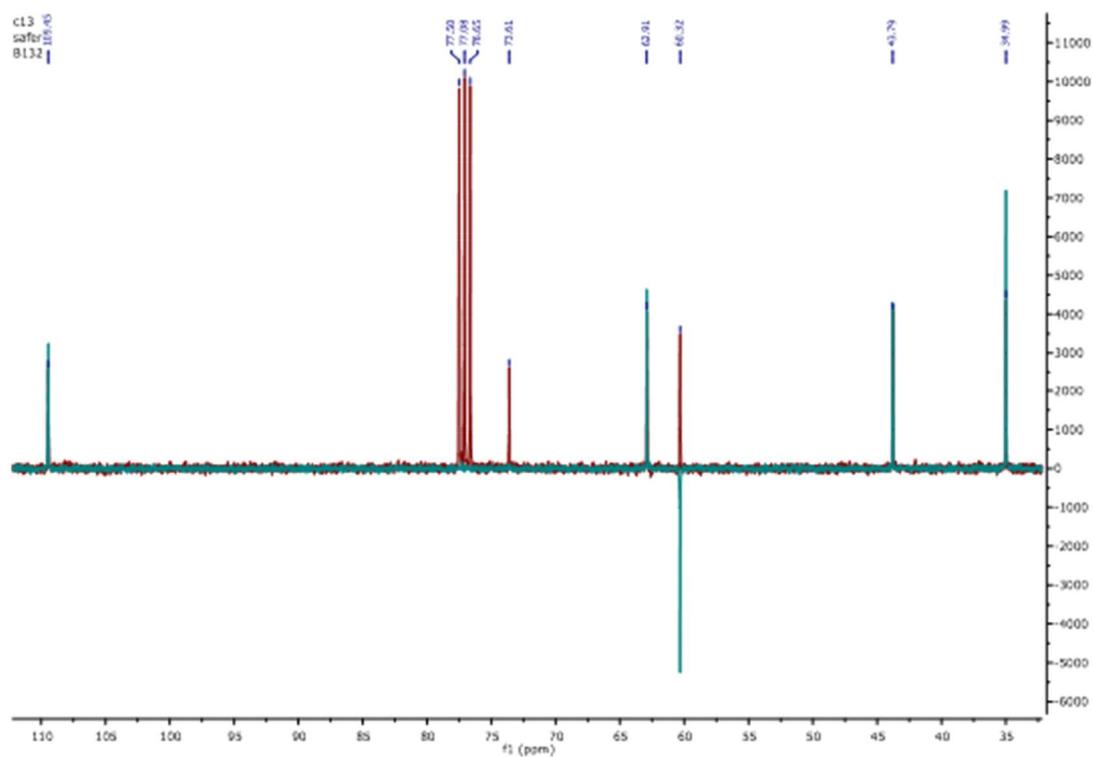
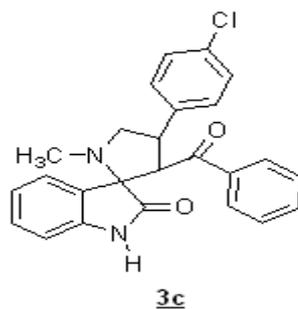
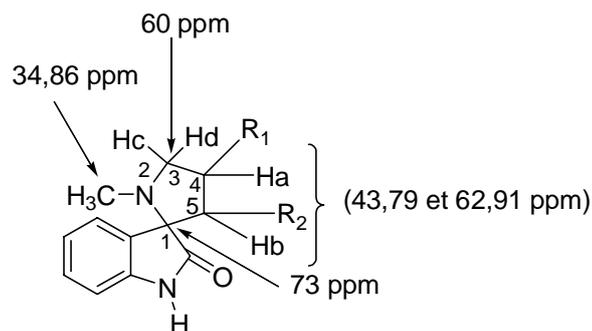


Figure 34 : superposition de Spectres RMN ¹³C-Dept 135 de la molécule **3b**

Cette première évaluation nous a permis de localiser les carbones C₁, C₃, C₄, C₅ et le CH₃ (Figure 35)



A : R₁ = -CO-Ph ; R₂ = Ph-OCH₃

B : R₁ = Ph-OCH₃ ; R₂ = -CO-Ph

Figure 35

Par la suite, nous avons réalisé une expérience HSQC (Figure 36) qui va nous renseigner sur les corrélations entre les protons et les carbones qui les portent ($^1J_{C-H}$) et ainsi localiser les différents protons.

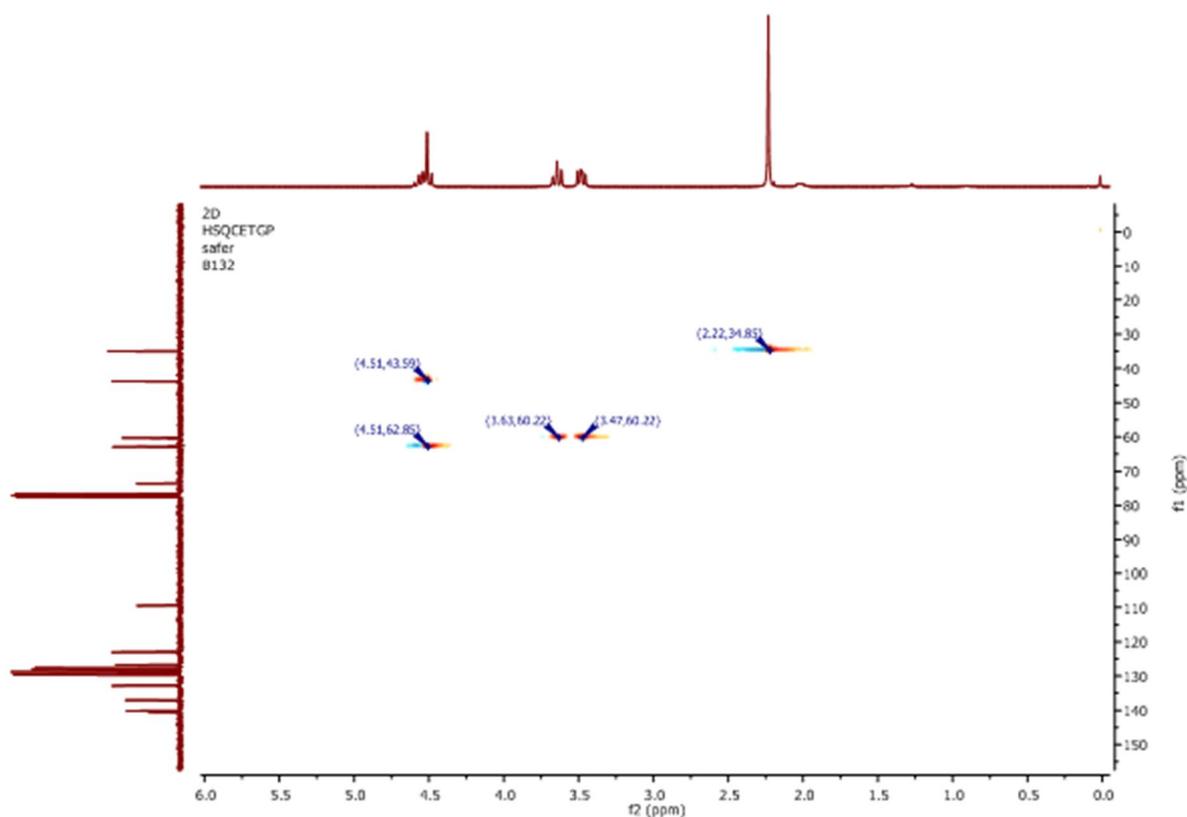


Figure 36 : spectre HSQC de la molécule 3c

Les corrélations obtenues sont résumées dans le tableau ci-dessous :

| PROTONS | CH ₃ | Hc , Hd | Ha , Hb |
|---|-----------------|----------------|----------------|
| δ (ppm) – ¹ H / ¹³ C | (2,22 ; 34,85) | (3,47 ; 60,22) | (4,51 ; 43,79) |
| | | (3,63 ; 60,22) | (4,50 ; 62,91) |

Cela nous indique que les deux protons Hc et Hd du CH₂ sont portés par le même carbone à 60,22ppm. Une fois ces deux protons (CH₂) identifiés, on peut alors procéder à l'exploration de leur environnement en utilisant la technique HMBC (Figure 37) qui va nous renseigner sur la corrélation ²J_{C-H} et ³J_{C-H}.

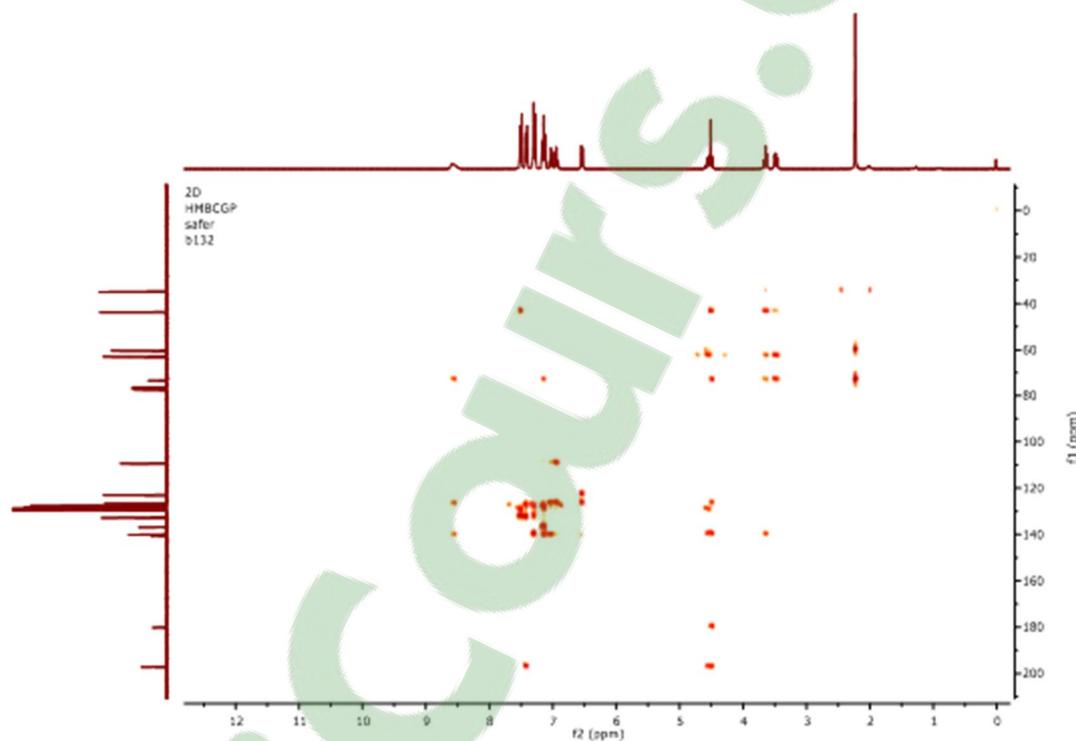


Figure 37 : spectre HMBC de la molécule 3c

Si on regarde les deux structures A et B, on peut s'apercevoir que les deux protons du CH₂ peuvent être corrélés aux deux carbones des deux carbonyles via des constantes de couplage ⁴J_{C-H} pour le cycloadduit A chose qu'on ne peut pas observer par la technique HMBC. Le cycloadduit B par contre peut présenter une corrélation entre les protons Hc et Hd du CH₂ et le carbone du carbonyle avec une constante de couplage ³J_{C-H} observable par l'expérience HMBC. (Figure 38).

On devrait alors observer dans la zone des 200ppm soit une tache 3,4 – 3,6 ppm si c'est le cycloadduit B ou bien ne rien observer si c'est le cycloadduit A.

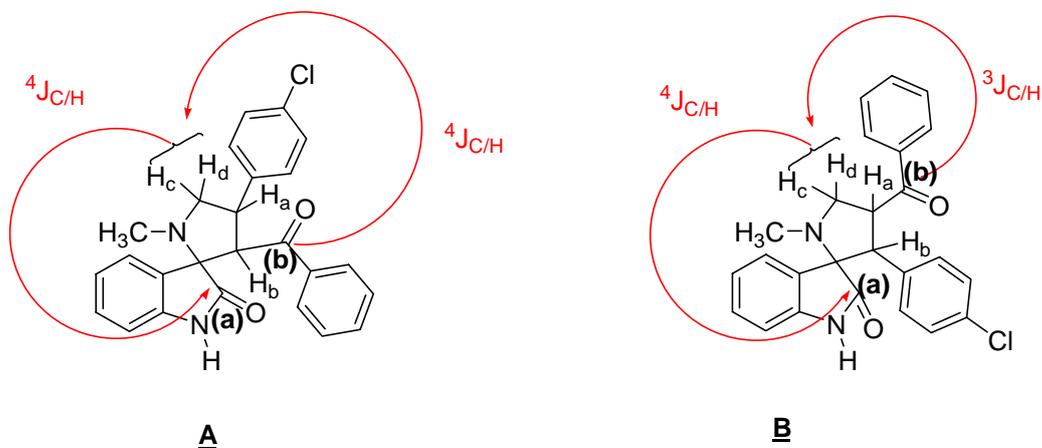


Figure 38

Effectivement, l'exploration de cette zone (3,5 ppm/180-200ppm) ne montre aucune corrélation entre H_c et H_d « CH₂ » et les deux carbones des carbonyles. Ce qui indique que nous avons obtenu le cycloadduit A. (Figure 39).

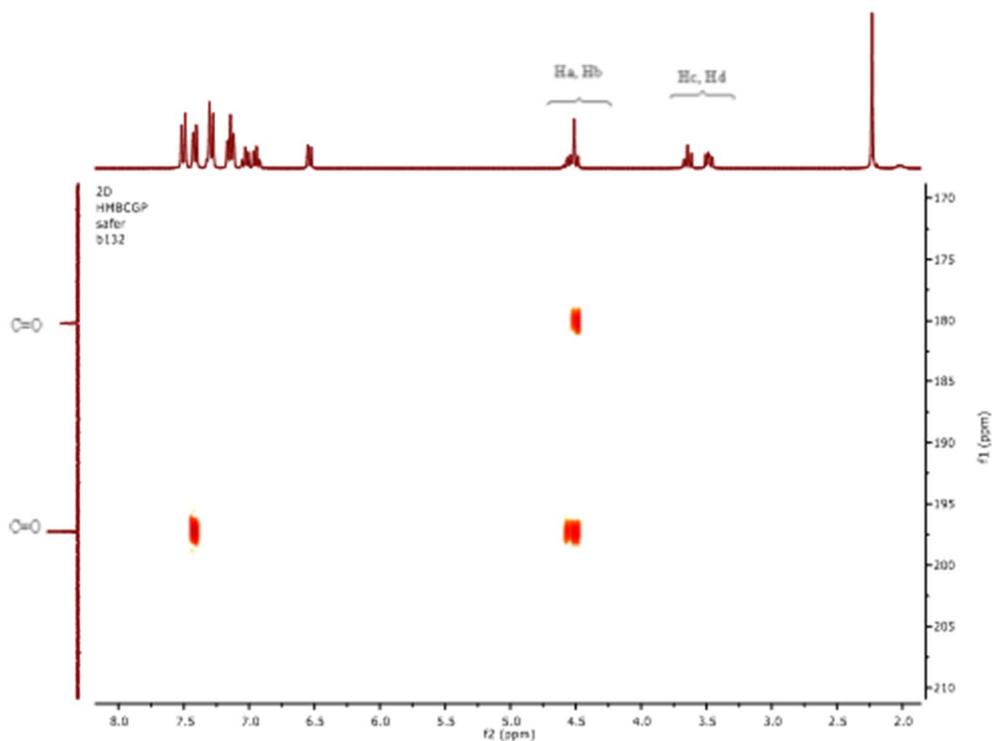


Figure 39.

II.7 Mécanisme d'obtention des spiro-[oxindole-pyrrolidines]

Il se passe tout d'abord une condensation de KNOEVENAGEL de l'isatine sur la sarcosine suivie d'une décarboxylation donnant un ylure d'azométhine qui représente le dipôle-1,3 qui s'additionne systématiquement sur le dipolarophile représenté dans ce cas la par la chalcone.

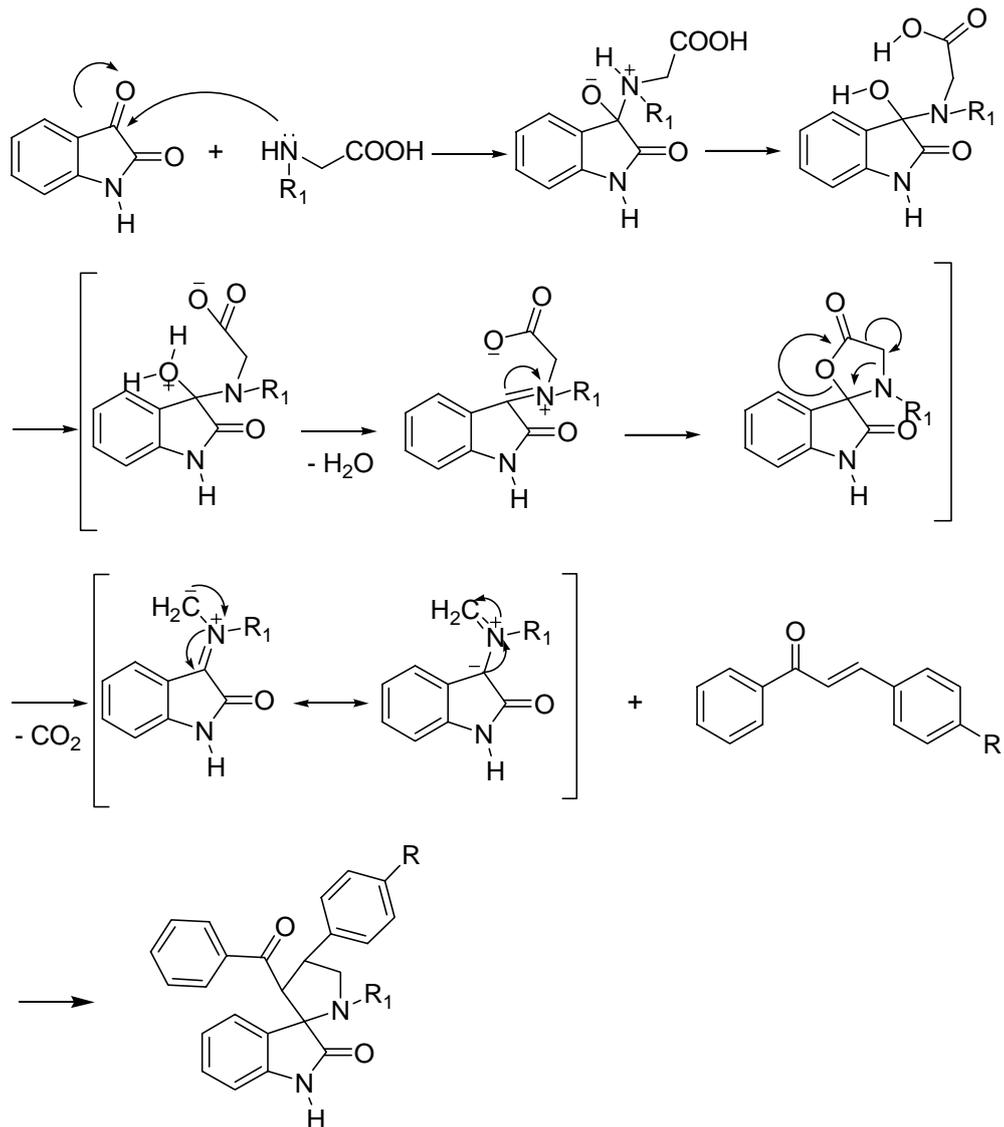


Figure 40 : mécanisme réactionnel

Clicours.COM

Conclusion

En conclusion, d'après ce que nous avons vu dans ce chapitre, les techniques modernes, répondant aux exigences de la chimie verte, à savoir la technique des ultrasons et celle des micro-ondes se sont montrées de puissants outils pour la réalisation de la synthèse avec un bon rendement et une regioselectivité totale et cela dans une durée courte et en consommant moins d'énergie par rapport à ce que peut fournir le chauffage classique. Par ailleurs, la technique des micro-ondes nous a permis d'avoir, en plus du gain du temps de réaction, l'élimination de l'usage des solvants ce qui sert à réduire le taux de pollution.

La RMN 2D nous a beaucoup servi pour l'identification structurale des spiro[oxindole-pyrrolidines] préparés et de montrer que la réaction est totalement regioselective puisque nous avons obtenu un seul des cycloadduits théoriquement attendus.

CHAPITRE III

EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE

DES SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES]

INTRODUCTION

IV.1. Historique de la maladie

IV.1.2. Les symptômes

IV.1.3. La lutte

IV.1.4. L'agent causal du Bayoud

IV.2. Le cycle de vie

IV.3. Matériels et méthodes

IV .4. Résultats des tests de l'activité antifongique des spiro-[oxindole-pyrrolidines] *in-vitro*

INTRODUCTION :

Le palmier dattier est l'arbre fruitier par excellence du désert saharien où il joue à la fois un rôle économique grâce à la production des dattes qui constituent la base de l'alimentation humaine et animale, et un rôle écologique puisqu'il confère sa structure à l'oasis⁶². Le palmier dattier a fait l'objet d'une exploitation intense en Afrique du nord, au Moyen-Orient et aux USA⁶³. La production mondiale pour l'an 2002 est estimée à 6 405 178 tonnes, à travers environ 34 pays, occupant une superficie de 2,7 millions d'hectares. La production globale du monde a doublé en l'an 2002 par rapport à l'an 1980. Les dix principaux pays producteurs estimés en 2002 par la FAO sont figurés dans le tableau ci-dessus⁶⁴.

Les dix principaux producteurs des dattes (FAO 2011).

| Pays | Production (tonne) | Pourcentage de la production mondiale (%) |
|----------------------------|--------------------|---|
| Egypte | 1373570 | 18,3 |
| Arabie Saoudite | 1122820 | 14,9 |
| Iran | 1016610 | 13,5 |
| Emirats Arabe Unies | 900000 | 12,0 |
| Algérie | 690000 | 9,2 |
| Iraq | 619182 | 8,2 |
| Pakistan | 557279 | 7,4 |
| Oman | 268011 | 3,6 |
| Tunisie | 180000 | 2,4 |
| Libye | 165948 | 2,2 |
| Chine | 150000 | 2,0 |
| Maroc | 119473 | 1,6 |
| Yémen | 59627 | 0,8 |

Le patrimoine phoenicicole Algérien, estimé en 1996 à plus de 10 millions de palmiers, se caractérise par une diversité exceptionnelle aussi bien dans les variétés que les techniques utilisées. Pendant la campagne phoenicicole (2003/2004), la production de dattes a été estimée à 4 721 540 quintaux soit une augmentation de 13 % par rapport aux années écoulées⁶³.

La fusariose du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), connue localement sous le nom de « Bayoud », constitue une grave menace pour l'Algérie sur les plans économique et social. Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié en collaboration avec l'équipe du

⁶² D. Fernandez, M. Lourd, M.Ouinten, A. Tantaoui, J.P.Geiger, 1995. Phytoma; n°469, 36-39.

⁶³ A. Bessas Mémoire d'ingénieur d'état en biologie option contrôle de qualité et analyses 2008 Université Djillali Liabes -Sidi Bel Abbes -

⁶⁴ Rapport de la Food agriculture Organization (faostat.fao.org) 2011.

Professeur Henni⁶⁵ l'activité antifongique des composés spiro-(oxindole-pyrrolidines) sur différentes souches de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* isolées à partir de rachis provenant de différentes oasis algériennes, dont l'identification morphologique, effectuée a permis de classer ces souches dans l'espèce de *Fusarium oxysporum* de la forme spéciale *albedinis*.

III.1. Historique de la maladie :

Le Bayoud sévit uniquement en Afrique du Nord, dans toutes les grandes palmeraies du Maroc (sauf Ouarzazate et Marrakech) et dans la plupart de celles du centre, de l'ouest et du sud-ouest de l'Algérie. La maladie est originaire de la vallée du Draa, au Maroc, où elle fut observée pour la première fois vers 1870⁵⁴. La maladie est passé ensuite dans notre pays ainsi après la contamination de Fogaret Ezzoua (Ain Salah) vers les années 1902 et des palmeries frontalières Algéro-Marocaine, Le Bayoud s'est propagé vers l'est du pays et forme actuellement un front allant du M'zab à Métlili. Il menace les palmeraies de l'Oued Rhir du Souf et des Zibans, aire de production de la variété Deglet Nour sensible au Bayoud⁶⁶.

III.1.1. Les symptômes :

Les premiers symptômes externes apparaissent sur une ou plusieurs feuilles du milieu de la couronne. La feuille atteinte prend une coloration grise cendrée ou grise plomb, et flétrit d'une manière caractéristique. Les arbres malades présentent relativement peu de racines atteintes (rougeâtres). Les frondes qui manifestent des symptômes externes ont une coloration brune-rougeâtre avec des faisceaux vasculaires très colorés lorsqu'on les coupe⁶⁷.

III.1.2. La lutte :

La désinfection du sol est très coûteuse et difficile. La lutte chimique n'est envisageable que si on découvre précocement le point de départ d'une nouvelle infection dans une région saine. Dans ce cas, on peut traiter le sol avec du bromure de méthyle⁶⁸, ou

⁶⁵ Laboratoire de phytopathologie, Département de Biologie, Université d'Oran.

⁶⁶ Rapport de l'Institut National de la Protection des Végétaux INPV, 1985

⁶⁷ Rapport de l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP), 2003

⁶⁸ M.J.J. Frederix, K. Den Brader, 1989 Résultats des essais de désinfection des sols contenant des échantillons de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. FAO/PNUD/RAB/88/024.

plus récemment l'Iprodione® [3-(3,5-dichlorophenyl)-N-isopropyl-2,4-dioximidazolidine-1-carboxamide] (Figure 37) qui a prouvé une efficacité importante dans la lutte contre le *Fusarium oxysporum*⁶⁹.

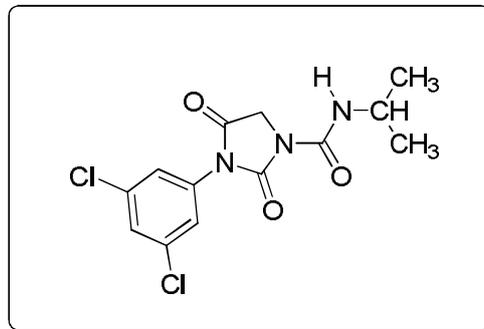


Figure 40 : La molécule de l'Iprodione

Ce produit est utilisé pour lutter contre une large gamme de maladies fongiques véhiculées par le sol parmi elles la fusariose (le bayoudh). Ce produit est conditionné et vendu à des concentrations de 0,24g/ml. Mais l'application des doses élevées de l'Iprodione peut potentiellement, après sa décomposition, détruire la structure de la communauté bactérienne et la diversité du sol, laquelle peut par la suite conduire à la détérioration de la qualité et la fertilité du sol. Quoique l'addition du Vermicompost⁷⁰ à ce traitement réduit la décomposition de l'Iprodione et stabilise les matières organiques produites par l'intervention des vers de terre et les microorganismes⁷¹ puisqu'il représente une ressource d'énergie pour certaines bactéries et un remède pour le sol en améliorant leur teneur en carbone et en renforçant la fertilité par la stimulation de l'activité bactérienne.

III.1.3. L'agent causal du Bayoud :

*L'agent causal du Bayoud est le Fusarium oxysporum Schlechtendahl f.sp albedinis*⁷². La forme sauvage du *Fusarium oxysporum albedinis* est caractérisée par un tapis mycélien fin frisé au sein du quel se forme de petites sporodochies rose saumon ; la forme sauvage

⁶⁹ QUAL –PRO. 105 –150 Crowfoot Crescent NW, Calgary, Alberta T3G3T2. WWW.quali-pro.com

⁷⁰ le Vermicompost est un amendement organique entièrement naturel issu de la transformation des fumiers de cheval, de bovin ou de déchets domestiques organiques par des vers de terre

⁷¹ R. A. Verdenelli, A. L. Lamarque, J. M. Meriles. *Science of the Total Environment*. 2012, 414, 210 – 219.

⁷² W.L.Gordon, *Can. J. Bot.*, 1965, 43: 1309-1318.

permet d'identifier l'agent causal du Bayoud sans recours aux tests de virulence⁷³. Des sclérotés de couleur bleu à noir naissent parfois groupés et ont de 1 à 3 mm de diamètre⁷⁴.

- *Fusarium. oxysporum albedinis* possède un mycélium hyalin et cloisonné, il est fin et régulier en culture jeune. Il présente des cellules hypertrophiées en chaîne, d'aspects globuleux en culture âgée ayant une grande ressemblance avec les chlamydospores, mais sans épaissement de la paroi. La multiplication asexuée se réalise par des microconidies et des macroconidies⁷⁵.

III.1.4. Le cycle de vie :

Le *Fusarium. oxysporum* f.sp *albedinis* persiste pendant l'hiver sous la forme de chlamydospores dans les tissus de palmiers malades (racines, rachis, etc.). La désintégration de ces tissus permet la libération des chlamydospores dans le sol où elles demeurent à l'état dormant.

Les chlamydospores germent dès que les conditions sont favorables et pénètrent dans les tissus vasculaires des racines, à partir desquels le mycélium atteint la tige. Dans les vaisseaux, le mycélium produit des microconidies qui sont transportées vers le haut par la sève. Quand ce mouvement est empêché par une paroi transversale, les microconidies germent, le tube germinatif pénètre dans la paroi et la formation de microconidies reprend de l'autre côté de la paroi. La mort de l'arbre intervient quand le champignon atteint avec ses toxines le bourgeon terminal. Au cours de sa progression, *F. oxysporum* f.sp *albedinis* s'échappe du xylème et colonise le parenchyme environnant par un mycélium inter et intracellulaire, c'est ce qui donne plus tard la coloration brun rougeâtre caractéristique des arbres malades. Après la mort de l'arbre, le mycélium continue à se développer dans les tissus morts et forme de nombreuses chlamydospores dans les cellules du sclérenchyme⁷⁶.

⁷³ M. Djerbi, L. Aouad, H. Filali, M. H. Sedra., M. Saaidi, A. Tantaoui, *Colloque d'Agronomie Saharienne*. 6-8 mai 1985, Université Cadi Ayad, Marrakech, Maroc.

⁷⁴ M. Djerbi, *Les maladies du palmier dattier*, 1988; Accession No: 286709 ; Projet de Lutte contre le Bayoud, Arab States, RAB/84/018, Report No: FAO-AGO--RAB/84/018, Fiche No: 89X01396-F.

⁷⁵ R. GACEB-TERRAK, *Thèse de doctorat d'état* FSB, USTHB, Alger, 2010.

⁷⁶ J. Louvet, 1977, Observations sur la localisation des chlamydospores de *Fusarium oxysporum* dans les tissus des plantes parasitées. *INRA*, Paris, 193-197.

III.2. Tests de l'activité antifongique des spiro-[oxindole-pyrrolidines] in-vitro:

Cette étude est conduite « *in vitro* », par des tests de l'action des molécules spiro-[oxindole-pyrrolidines] testées sur la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*. Trois répétitions sont réalisées pour chaque concentration, les boîtes sont ensemencées avec une rondelle de 5 mm de diamètre issue de la marge de la colonie âgée de 7 jours, sont incubées à 28°C à l'obscurité. Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans la molécule. La croissance mycélienne est estimée lorsque le témoin a envahi la boîte de Pétri en mesurant la moyenne des diamètres perpendiculaires les plus dissemblables de chaque colonie. Le pourcentage d'inhibition (PI) par rapport au témoin est calculé selon la formule suivante :

$$PI = \frac{V_t - V_f}{V_t} \times 100$$

V_t : vitesse de la croissance du champignon dans le milieu de culture sans molécule.

V_f : vitesse de la croissance du champignon dans le milieu de culture à une concentration [c] de la molécule.

De l'équation de régression linéaire entre les logarithmes népériens des concentrations (en abscisses) et les pourcentages d'inhibition de la croissance (en ordonnées) qui sont transformés en probits, on détermine les concentrations inhibitrices de 50 (CI₅₀) de la croissance mycélienne.

III.2.3. RESULTATS OBTENUS:

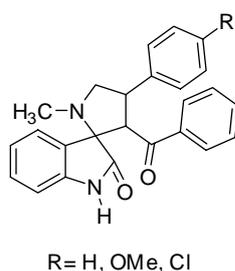
Avant de déterminer l'activité antifongique de nos produits synthétisés, nous avons d'abord procédé à l'évaluation de cette dernière pour les réactifs utilisés à savoir la sarcosine et les différentes chalcones (tableau ci-après). Les résultats ainsi obtenus seront de ce fait comparés avec ceux des composés spiro-[oxindole-pyrrolidines].

| | Chalcone | MeO-Chalcone | Cl-Chalcone | Isatine |
|-------------------------|----------|--------------|-------------|---------|
| IC ₅₀ gr/ml | 0,162 | 0,142 | 0,236 | 0,0017 |
| IC ₅₀ mmol/l | 778,509 | 596,388 | 975,005 | 11,562 |

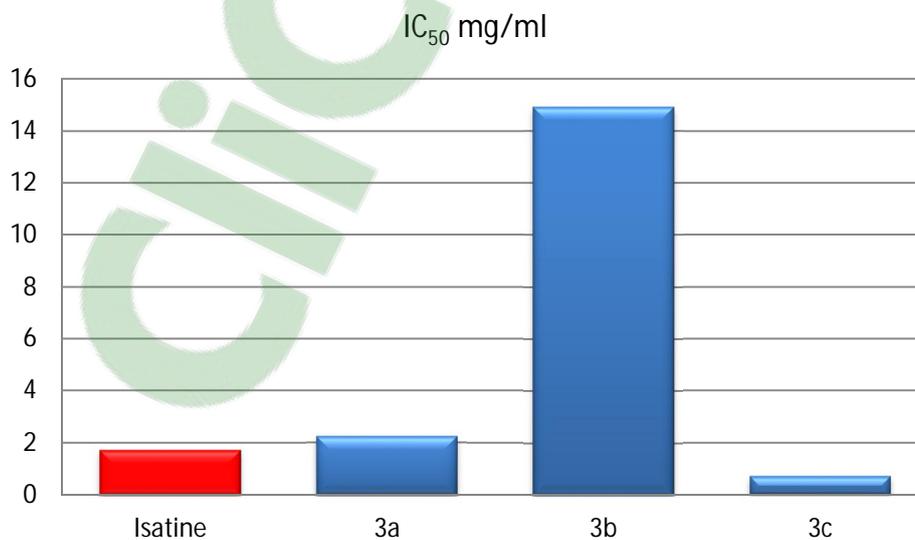
Ce tableau montre une assez faible activité des chalcones. L'isatine quant à elle est beaucoup plus réactive avec un IC₅₀ de 1,7 mg/ml. On pourra donc conclure que les chalcones sont inactives sur le *Fusarium oxysporum*.

Après avoir comparé l'activité inhibitrice des chalcones avec celle de l'isatine, nous allons prendre cette dernière comme référence pour étudier l'évolution de cette activité en fonction de la structure des spiro-[oxindole-pyrrolidines] obtenue.

a. Série issue de la sarcosine :

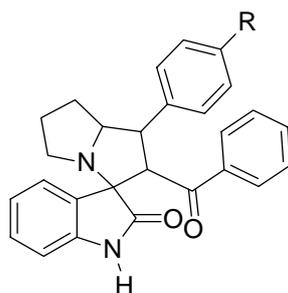


| | Isatine | <u>3a</u> | <u>3b</u> | <u>3c</u> |
|-------------------------|---------|-----------|-----------|-----------|
| Structure | | | | |
| IC ₅₀ mgr/ml | 1,7 | 2,230 | 14,918 | 0,700 |



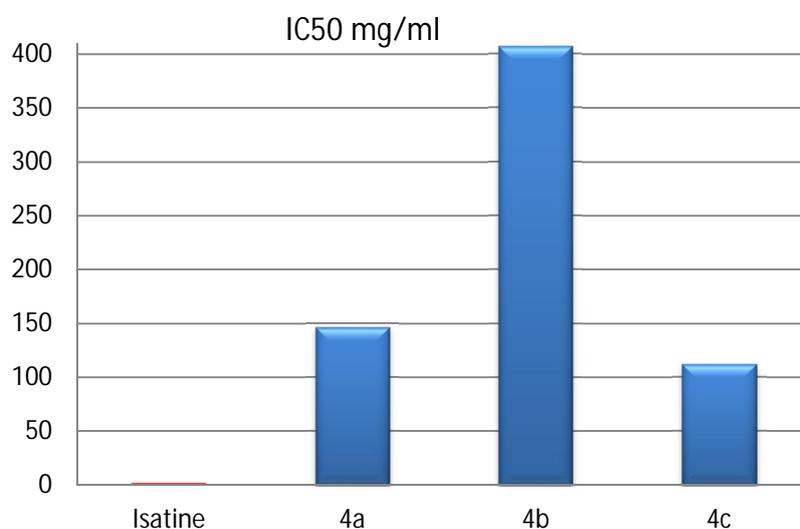
Pour cette série de taux d'inhibition est relativement le même pour l'isatine, le 3a (H) et le 3c (Cl). Cependant, le composé 3c reste le plus actif même par rapport à l'isatine (notre témoin). Par ailleurs, le composé 3b (OCH₃ plus volumineux et donneur par effet mésomère) est nettement moins actif.

b. Série issue de la proline

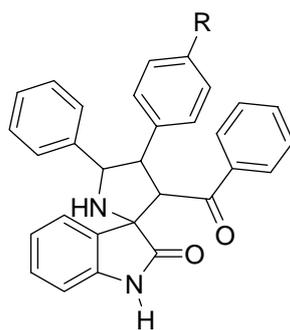


R= H, OMe, Cl

| | Isatine | <u>4a</u> | <u>4b</u> | <u>4c</u> |
|-------------------------|---------|-----------|-----------|-----------|
| Structure | | | | |
| IC ₅₀ mgr/ml | 1,7 | 146,500 | 407,000 | 112,120 |

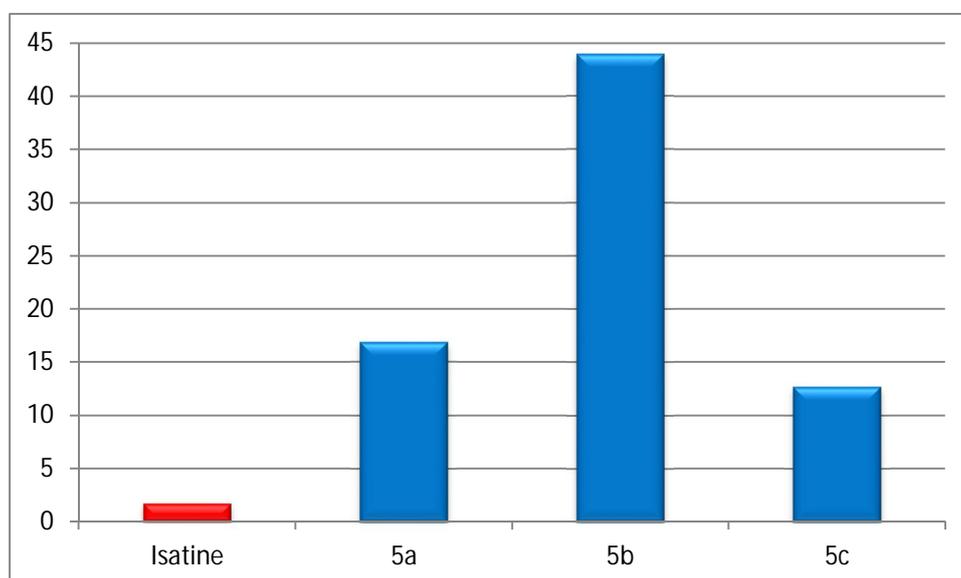


c. Série issue de la phénylgycoline

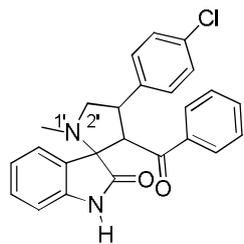


R= H, OMe, Cl

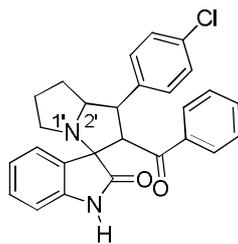
| | Isatine | <u>5a</u> | <u>5b</u> | <u>5c</u> |
|-------------------------|---------|-----------|-----------|-----------|
| Structure | | | | |
| IC ₅₀ mgr/ml | 1,7 | 16,860 | 43,960 | 12,660 |



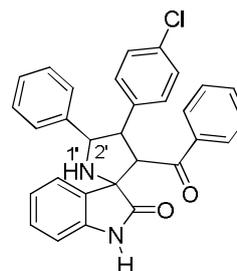
Pour la série issue de la proline et celle issue de la phénylgycoline, on constate une très faible activité biologique comparée aux produits de la sarcosine. Dans toutes les séries les spiro chlorés sont nettement plus actifs. Par contre, le meilleur taux d'inhibition est obtenu lorsque la position 5' est libre (non substituée) 3c.



3c



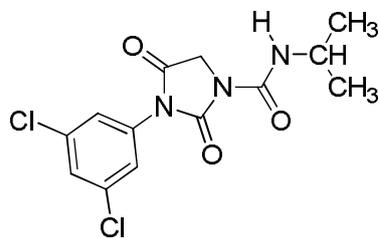
4c



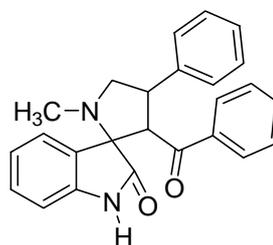
5c

En conclusion, Le test de l'effet antifongique des spiro « *in-vitro* » vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* nous a permis d'enregistrer que le taux d'inhibition dans certains cas a atteint 90% et que la concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) égale à 0,7 mg/ml enregistré par le produit 3c.

Enfin, en comparant l'iprodione commercial utilisé à une concentration optimale de 240 mg/ml avec la concentration inhibitrice à 95% de la molécule 3c (IC₉₅) 177,8 mg/ml, on s'aperçoit que cette dernière est active à une concentration bien inférieure à celle de l'iprodione.



iprodione



3c

CHAPITRE IV :

PARTIE EXPERIMENTALE ET DONNEES SPECTROSCOPIQUES

IV.1. APPAREILLAGE UTILISE

IV.2. PREPARATION DES CHALCONES

- a. Chalcone non substituée
- b. *p*-méthoxy-chalcone
- c. *p*-chloro-chalcone

IV.3. PREPARATION DES SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES]

1. Procédé 1 : Chauffage classique
2. Procédé 2 : Méthode d'activation par les ondes ultrasons
3. Procédé 3 : Méthode d'irradiation par les micro-ondes sans solvant
4. Les rendements et les caractéristiques des produits synthétisés

IV.1. APPAREILLAGE :

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

1. Spectromètre BRUKER 200 AM et BRUKER 300 AVANCE

Les déplacements chimiques δ sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pour la RMN du proton et du carbone ^{13}C . Les constantes de couplage « J » sont exprimées en Hertz (Hz) ; pour décrire la multiplicité des signaux, les abréviations suivantes ont été utilisées : s singulet, d doublet, t triplet, q quadruplet, quint quintuplet, sext sextuplet, hept heptuplet, dd doublet de doublet, dt doublet de triplet, td triplet de doublet, sl singulet large, m multiplet.

Le solvant utilisé pour l'enregistrement des spectres est le CDCl_3 qui apparaît à 7,16 ppm pour les spectres du proton et à 77 ppm pour les spectres du ^{13}C . La température d'acquisition des spectres est, sauf indication contraire, la température ambiante.

2. Four micro-ondes

Au cours de ce travail, on a utilisé un four micro-ondes domestique Easytronic (Whirlpool) d'une puissance maximale de 750W à irradiation continue.

3. Banc Kofler

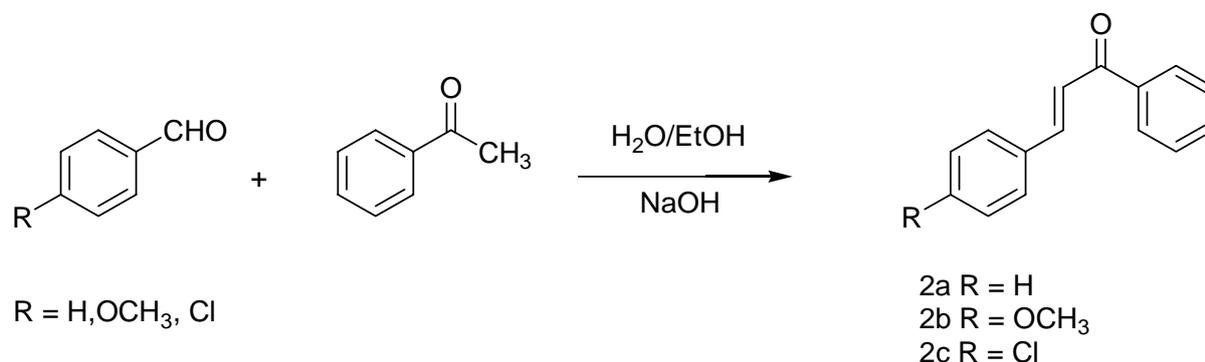
Les points de fusion, exprimés en degré Celsius ($^{\circ}\text{C}$) ont été mesurés sur un banc Kofler Leica VMBH et ne sont pas corrigés.

4. Cuve à ultra-sons : de type Fisherbrand. FB11023

Les nomenclatures des produits sont décrites systématiquement en anglais selon les règles érigées par l'IUPAC.

IV.2. PREPARATION DES CHALCONES :

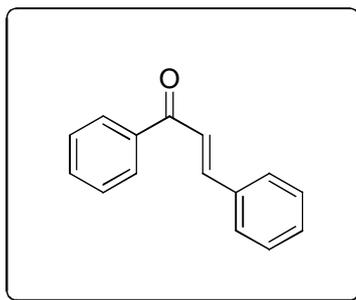
La préparation des dérivés de la chalcone s'effectue selon ce qui suit



Mode opératoire :

Dans un ballon de 500ml, on fait dissoudre 22g de NaOH dans une solution composée de 200ml d'eau distillée et 100g (122,5ml) d'éthanol. Le mélange est versé sur 0,43mole d'acétophénone fraîchement distillée. On commence l'agitation et on ajoute 0,43mole de benzaldéhyde pur. On garde la température du mélange aux environs de 25°C pendant 02 à 03heures. On laisse le mélange se refroidir dans un réfrigérateur pendant une nuit, ensuite le produit est filtré sous vide et lavé avec de l'eau distillée jusqu'à PH neutre, puis on lave avec 20ml de l'éthanol froid. La recristallisation se fait dans l'éthanol absolu chauffé à 50°C à raison de 5ml/g. Cette opération nous a permis d'avoir les chalcones suivantes :

a. Chalcone non substituée : 2a



(*E*)-chalcone: (*E*)-1,3-diphenylprop-2-en-1-one

Rendement : 55 %

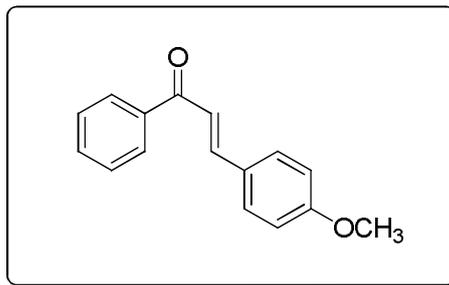
Point de fusion : 56 -58 °C

Aspect physique : solide jaune

Données spectroscopiques

RMN ^1H (200MHz, Chloroforme - d) ; δ (ppm) : 7.32 – 7.64 (m, 9H), 7.77 (dd, $J = 7.2, 1.8\text{Hz}$, 2H), 8.01 (d, $J = 15.1\text{ Hz}$, 1H).

b. *p*-méthoxychalcone : 2b



(*E*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one

Rendement : 75 %

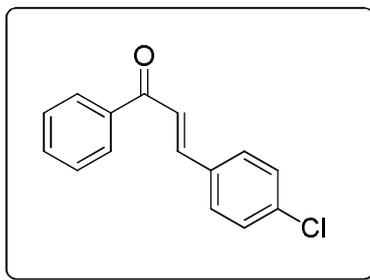
Point de fusion : 79 – 81 °C

Aspect physique : solide jaune

Données spectroscopiques

RMN ¹H (200MHz, Chloroforme – d) ; δ (ppm) : 3.81 (s, 3H), 7.04 (d, J = 7.5Hz, 2H), 7.32 – 7.64 (m, 6H), 7.32 (dd, J = 7.3, 2.1Hz, 2H), 7.99 (d, J = 15.1 Hz, 1H).

c. *p*-chlorochalcone : 2c



(*E*)-3-(4-chlorophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one

Rendement : 70 %

Point de fusion : 114 – 116 °C

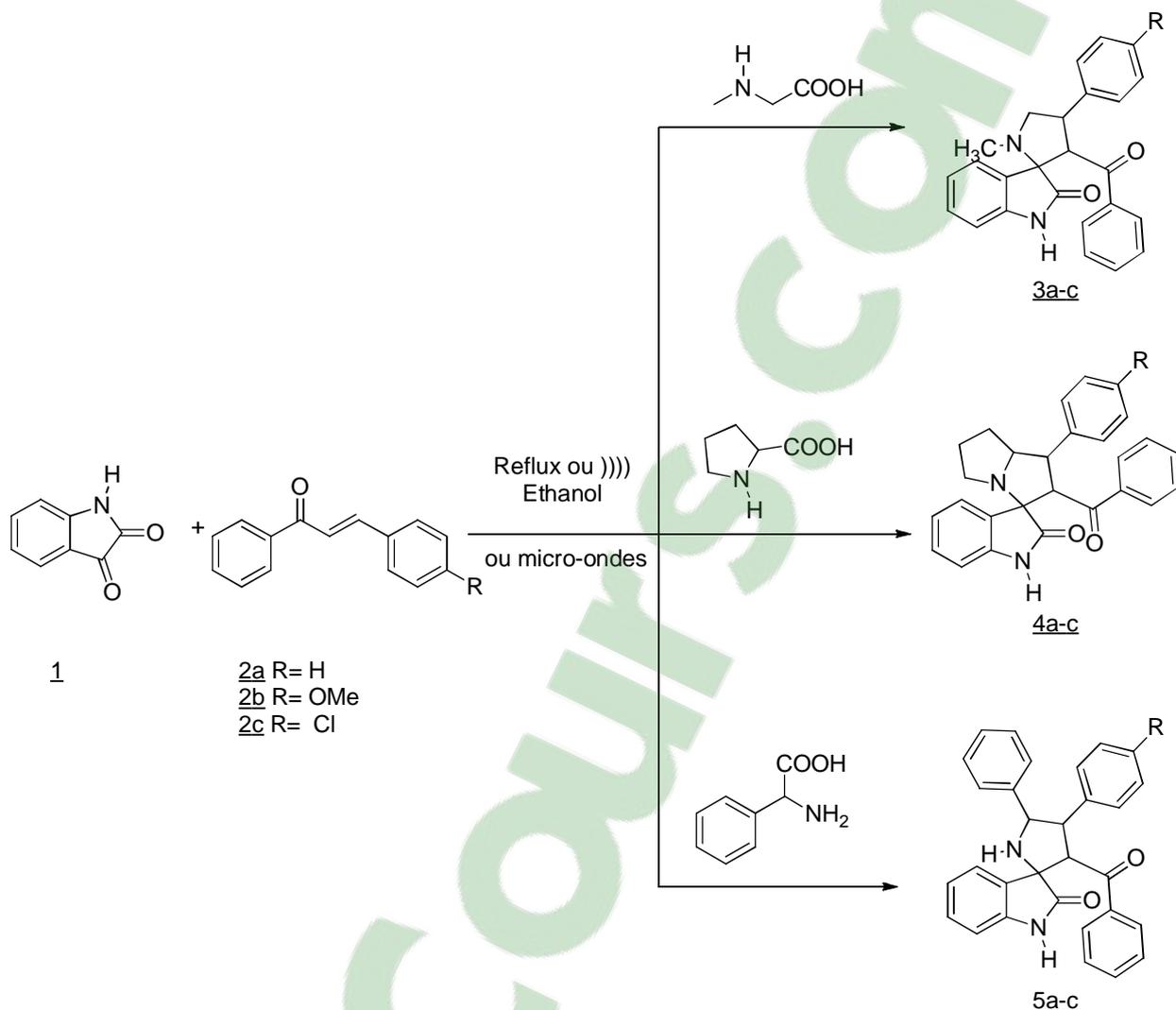
Aspect physique : solide jaune

Données spectroscopiques

RMN ¹H (200MHz, Chloroforme – d) ; δ (ppm) : 7.33 – 7.59 (m, 8H), 7.77 (dd, J = 7.1, 1.7Hz, 2H), 8.00 (d, J = 15.1 Hz, 1H).

IV.3. PREPARATION DES SPIRO-[OXINDOLE-PYRROLIDINES]:

La synthèse des spiro-[oxindole-pyrrolidines] s'est faite par les trois méthodes : reflux, activation par les ultrasons et par irradiation aux micro-ondes sans solvant



IV. 3.1. Procédé 1 : Chauffage classique (Reflux)

Dans un ballon tricol de 100ml, on fait dissoudre 1eq (1mmole) de la chalcone (non substituée, *p*-methoxychalcone ou *p*-chlorochalcone), 1,1eq (1,1mmole) d'isatine et 1,5eq (1,5mmole) d'acide aminé (sarcosine, L-Proline ou DL α - Phénylglycine) dans 10 ml d'éthanol. Le mélange est porté au reflux ; la réaction est suivie par CCM. Le temps de réaction est estimé à 48heures. Après achèvement de la réaction, on laisse refroidir, un produit solide se dépose. On filtre et on traite le produit solide de la manière suivante :

1. Lavage du produit solide par 10ml d'éthanol pour éliminer l'isatine et la chalcone résiduelle.
2. Lavage du produit solide par de l'eau distillée pour éliminer la sarcosine et la L-Proline résiduelles.
3. Lavage du produit solide par de l'eau distillée acidulée de 3 à 4 % en HCl pur et cela pour éliminer la DL α – phénylgylicine résiduelle.

IV.3. 2. Procédé 2 : Méthode d'activation par les ultrasons

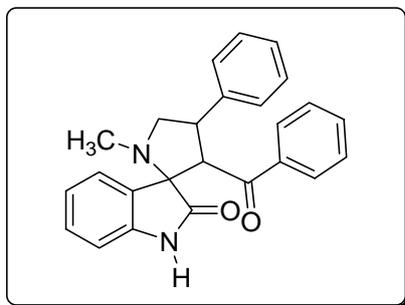
Dans un ballon monocol de 50ml, on fait dissoudre 1eq (1mmole) de la chalcone (non substituée, *p*-methoxychalcone ou *p*-chlorochalcone), 1,1eq (1,1mmole) d'isatine et 1,5eq (1,5mmole) d'acide aminé (sarcosine, L-Proline ou DL α – phénylgylicine) dans 10 ml d'éthanol. Le mélange est plongé dans la cuve à ultrasons. La réaction est suivie par CCM ce qui a permis d'estimer le temps de réaction à environ 08heures. Après achèvement de la réaction, on suit la même procédure pour la filtration et le traitement du produit récupéré appliquée précédemment.

IV.3. 3. Procédé 3 : Méthode d'irradiation aux micro-ondes sans solvant

Dans un tube à essai, on mélange 1eq (1mmole) de la chalcone (non substituée, *p*-methoxychalcone ou *p*-chlorochalcone), 1,1eq (1,1mmole) d'isatine et 1,5eq (1,5mmole) d'acide aminé (sarcosine, L-Proline ou DL α -phénylgylicine). Le mélange est ensuite irradié par micro-ondes à une puissance de 350W et cela dans un four domestique. La réaction est suivie par CCM ce qui a permis d'estimer le temps de réaction à 30minutes pour la réaction qui utilise la sarcosine et la phénylgylicine et 25 minutes pour celle qui utilise la L-Proline. Après achèvement de la réaction, le contenu du tube à essai est laissé pour se refroidir puis il est dissout dans 10ml d'éthanol. Le procédé 1 a été retenu pour la filtration et le traitement du produit récupéré.

IV. 4. Caractérisation des produits synthétisés :

Produit : 3a : 3'-benzoyl-1'-methyl-4'-phenylspiro[indoline-3,2'-pyrrolidin]-2-one



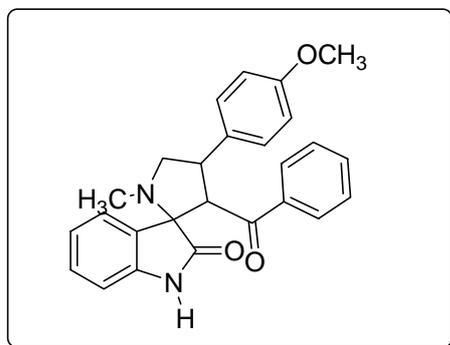
| Type de procédé | Rendement (%) | Point de fusion (°C) | Aspect physique |
|------------------------|---------------|----------------------|-----------------|
| Procédé 1 (Δ) | 67 | 212 – 214 | Solide |
| Procédé 2 (U.S) | 72 | | blanc |
| Procédé 3 (M.O) | 58 | | |

Données spectroscopiques

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) ; δ (ppm) : 2.47 (s, 3H), 2.60 (s, 1H), 2.85 (dd, $J = 12.5, 8.6\text{Hz}$, 1H), 3.64 (q, $J = 8.7\text{Hz}$, 1H), 4.15 (d, $J = 9.0\text{Hz}$, 1H), 7.18 – 7.13 (m, 2H), 7.46 – 7.23 (m, 10H), 7.82 – 7.70 (m, 2H), 8.16 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) ; δ (ppm) : 38.20, 46.32, 51.54, 71.66, 112.06, 122.18, 125.43, 126.01, 126.83, 127.07, 128.38, 128.57, 128.72, 128.80, 132.36, 136.73, 140.42, 142.21, 180.81, 198.06.

Produit : 3b : 3'benzoyl-4'-(4-méthoxyphenyl)-1'-méthylspiro[indoline-3,2'-pyrrolidin]-2-one



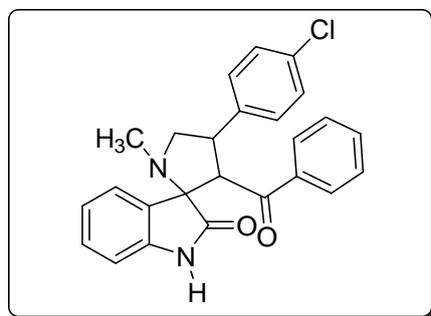
| Type de procédé | Rendement (%) | Point de fusion (°C) | Aspect physique |
|------------------------|---------------|----------------------|-----------------|
| Procédé 1 (Δ) | 54 | 188 – 190 | Solide |
| Procédé 2 (U.S) | 70 | | blanc |
| Procédé 3 (M.O) | 65 | | |

Données spectroscopiques

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3); δ (ppm) : 2.22 (s, 3H, NCH_3), 3.53 – 3.38 (m, 1H), 3.72 – 3.54 (m, 1H), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 4.59 – 4.44 (m, 2H), 6.56 – 6.42 (m, 1H_{arm}), 7.61 – 7.76 (m, 12H_{arm}), 8.21 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3); δ (ppm) : 34.99, 43.79, 60.32, 62.91, 73.61, 109.44, 123.03, 126.71, 126.76, 127.66, 128.12, 128.78, 129.23, 129.57, 132.58, 132.83, 137.03, 140.15, 140.51, 180.23, 197.26.

Produit : 3c : 3'-benzoyl-4'-(4-chlorophenyl)-1'-methylspiro[indoline-3,2'-pyrrolidin]-2-one



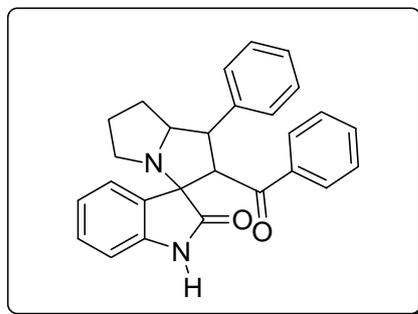
| Type de procédé | Rendement (%) | Point de fusion (°C) | Aspect physique |
|-----------------|---------------|----------------------|-----------------|
| Procédé 1 (Δ) | 43 | 218 – 220 | Solide blanc |
| Procédé 2 (U.S) | 68 | | |
| Procédé 3 (M.O) | 55 | | |

Données spectroscopiques

RMN ¹H (200MHz, CDCl₃); δ (ppm): 2.22 (s, 3H), 3.75 – 3.37 (m, 2H), 4.62 – 4.42 (m, 2H), 6.56 – 6.42 (m, 1H), 7.54 – 6.85 (m, 12H), 8.14 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 38.40, 46.62, 51.25, 71.63, 112.10, 122.68, 124.70, 126.83, 127.07, 128.38, 128.57, 128.94, 130.22, 132.36, 132.79, 136.73, 138.37, 142.21, 180.81, 201.06.

Produit : 4a 2'-benzoyl-1'-phenyl-1',2',5',6',7',7a'-hexahydrospiro[indoline-3,3'-pyrrolizin]-2-one



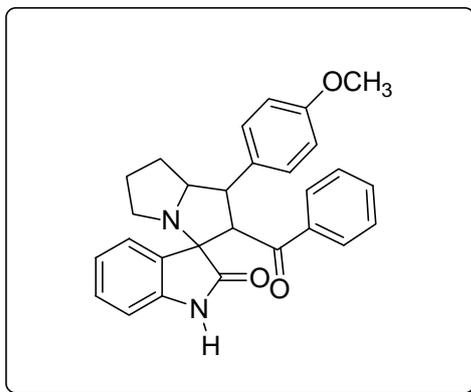
| Type de procédé | Rendement (%) | Point de fusion (°C) | Aspect physique |
|-----------------|---------------|----------------------|-----------------|
| Procédé 1 (Δ) | 76 | 188 – 190 | Solide blanc |
| Procédé 2 (U.S) | 87 | | |
| Procédé 3 (M.O) | 80 | | |

Données spectroscopiques

RMN ^1H (200MHz, Chloroforme – d) ; δ (ppm) : 1.82 – 1.47 (m, 2H), 2.03 – 1.86 (m, 2H), 2.66 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 3.91 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 4.23 (s, 1H), 4.95 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.79 – 6.81 (m, 13H), 8.03 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, , CDCl_3) ; δ (ppm) : 22.59, 34.33, 48.73, 49.23, 73.65, 74.92, 113.02, 122.62, 125.02, 126.73, 127.52, 127.63, 128.84, 129.04, 129.65, 129.99, 132.76, 137.68, 141.58, 142.91, 181.79, 202.00.

Produit : 4b : 2'-benzoyl-1'-(4-methoxyphenyl)-1',2',5',6',7',7a'-hexahydrospiro[indolin-3,3'-pyrrolizin]-2-one



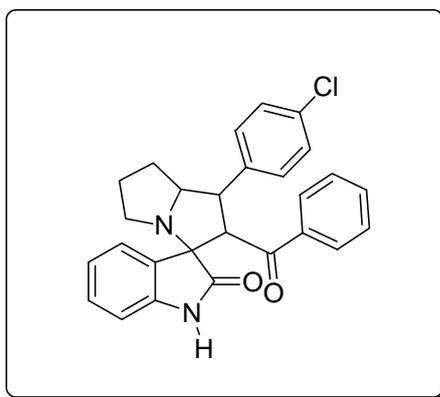
| Type de procédé | Rendement (%) | Point de fusion (°C) | Aspect physique |
|------------------------|---------------|----------------------|-----------------|
| Procédé 1 (Δ) | 62 | 200 – 202 | Solide blanc |
| Procédé 2 (U.S) | 86 | | |
| Procédé 3 (M.O) | 75 | | |

Données spectroscopiques

RMN ^1H (200MHz, Chloroforme – d) ; δ (ppm) : 2.13 – 1.54 (m, 4H), 2.77 – 2.53 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.86(dd, J = 11.1, 10.2 Hz, 1H), 4.22(dt, J = 10.0, 6.0Hz, 1H), 4.88(d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.88(d, J = 11.5 Hz, 1H), 6.56(dd, J = 7.3, 0.6 Hz, 1H), 6.85(d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.51 – 6.93 (m, 10H), 7.96 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, , CDCl_3) ; δ (ppm) : 24.19, 33.78, 49.77, 52.59, 54.04, 72.31, 74.92, 112.74, 113.2, 121.74, 123.46, 126.08, 126.53, 126.38, 126.58, 126.73, 128.67, 129.05, 132.36, 133.36, 136.38, 142.22, 157.15, 183.75, 200.06.

Produit : 4c : 2'-benzoyl-1'-(4-chlorophenyl)-1',2',5',6',7',7a'-hexahydrospiro[indoline-3,3'-pyrrolizin]-2-one



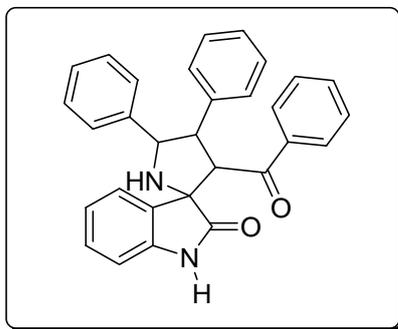
| Type de procédé | Rendement (%) | Point de fusion (°C) | Aspect physique |
|------------------------|---------------|----------------------|-----------------|
| Procédé 1 (Δ) | 69 | 198 – 200 | Solide blanc |
| Procédé 2 (U.S) | 75 | | |
| Procédé 3 (M.O) | 78 | | |

Données spectroscopiques

RMN ^1H (200MHz, Chloroforme – d) ; δ (ppm) : 1.72 (dd, $J = 12.2, 5.4\text{Hz}$, 1H), 2.17 – 1.82 (m, 3H), 2.81 – 2.51(m, 2H), 3.89(dd, $J = 11.3, 10.1\text{Hz}$, 1H), 3.89(dd, $J = 11.3, 10.1\text{ Hz}$, 1H), 4.21(dt, $J = 9.8, 6.0\text{ Hz}$, 1H), 4.86(d, $J = 11.4\text{ Hz}$, 1H), 6.57(dd, $J = 7.6, 0.7\text{ Hz}$, 1Har), 7.53 – 6.92 (m, 12H_{ar}), 8.06 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (75 MHz, , CDCl_3) ; δ (ppm) : 24.32, 33.73, 49.57, 50.79, 71.21, 74.92, 111.84, 122.84, 124.86, 125.23, 128.06, 129.57, 129.60, 130.64, 131.66, 131.99, 133.06, 136.35, 137.78, 142.69, 180.42, 200.76.

Produit : 5a : 3'-benzoyl-4',5'-diphenylspiro[indoline-3,2'-pyrrolidin]-2-one



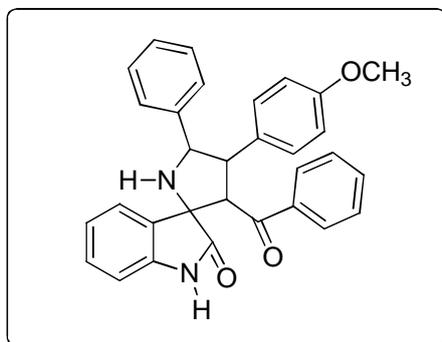
| Type de procédé | Rendement (%) | Point de fusion (°C) | Aspect physique |
|------------------------|---------------|----------------------|-----------------|
| Procédé 1 (Δ) | 75 | ≥ 262 | Solide blanc |
| Procédé 2 (U.S) | 84 | | |
| Procédé 3 (M.O) | 75 | | |

Données spectroscopiques

RMN ^1H (200 MHz, Chloroforme - d) ; δ (ppm) : 2.25 (s, 1H), 3.78 (dd, $J = 12.0, 7.6$ Hz, 1H), 4.15 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.57 – 7.06 (m, 17H), 7.77 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 7.80 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, , CDCl_3) ; δ (ppm) : 51.03, 71.94, 74.04, 110.88, 123.21, 124.02, 125.84, 126.61, 127.09, 127.26, 127.30, 127.62, 127.82, 128.03, 128.05 , 128.11, 128.36, 128.55, 128.77, 132.60, 136.02, 138.37, 140.05, 143.38, 179.99, 197.22.

Produit : 5b : 3'-benzoyl-4'-(4-methoxyphenyl)-5'-phenylspiro[indolin-3',2'-pyrrolidin]-2-one



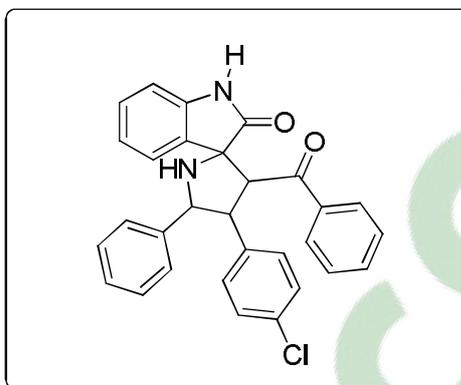
| Type de procédé | Rendement (%) | Point de fusion (°C) | Aspect physique |
|------------------------|---------------|----------------------|-----------------|
| Procédé 1 (Δ) | 69 | ≥ 262 | Solide blanc |
| Procédé 2 (U.S) | 71 | | |
| Procédé 3 (M.O) | 65 | | |

Données spectroscopiques

RMN ^1H (200MHz, Chloroforme - d) ; δ (ppm) : 3.72 (s, J = 16.6 Hz, 3H), 4.19(t, J = 10.7 Hz, 1H), 4.75 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 5.06 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 6.51 – 6.37 (m, 1H), 6.85 – 6.71 (m, 2H), 7.56 – 6.91 (m, 17H).

RMN ^{13}C (75 MHz, , CDCl_3) ; δ (ppm) : 52.74, 56.04, 71.76, 75.431, 117.94, 117.99, 119.27, 123.67, 124.28, 125.54, 126.91, 127.86, 127.99, 128.35, 128.40, 128.38, 128.38, 128.57, 128.57, 129.85, 129.85, 131.96, 134.31, 136.22, 138.93, 139.46, 155.85, 180.62, 196.37.

Produit : 5c : 3'-benzoyl-4'-(4-chlorophenyl)-5'-phenylspiro[indoline-3,2'-pyrrolidin]-2-one



| Type de procédé | Rendement (%) | Point de fusion (°C) | Aspect physique |
|------------------------|---------------|----------------------|-----------------|
| Procédé 1 (Δ) | 77 | ≥ 262 | Solide blanc |
| Procédé 2 (U.S) | 85 | | |
| Procédé 3 (M.O) | 90 | | |

Données spectroscopiques

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) ; δ (ppm) : 1.86 (s, 1H), 3.78 (t, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.15 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 7.64 – 7.14 (m, 16H), 7.81 – 7.65 (m, 2H), 7.98 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) ; δ (ppm) : 51.57, 71.70, 73.91, 111.05, 123.63, 123.88, 125.54, 126.91, 127.78, 127.80, 128.37, 128.38, 128.57, 129.06, 129.06, 130.31, 132.36, 132.78, 136.73, 138.89, 139.21, 141.90, 182.14, 199.48.

IV.5. Procédé d'évaluation de l'activité anti fongique

Cette étude est conduite « *in vitro* », par des tests de l'action des molécules spiro testées sur la croissance mycélienne. Dans un premier temps, nous avons préparé des solutions mères de chaque molécule comme suit : 0,2 gr de chaque produit est dissout dans 10 ml de DMSO pour atteindre une concentration de $2 \cdot 10^5$ ppm, ensuite des volumes de 1 μ l, 10 μ l et 50 μ l, 100 μ l et 150 μ l de la solution mère sont incorporés dans 20 ml du milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) solide séparément, pour obtenir des concentrations finales de 10, 100, 500, 1000 et 1500 ppm respectivement. Pour le témoin, nous avons ajouté les mêmes volumes de DMSO sans la molécule dans le milieu PDA.

Le test de l'influence des spiro-[onindole-pyrrolidines] sur la croissance mycélienne est réalisé sur *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*. L'opération est répétée pour chaque concentration. Les boîtes sontensemencées avec une rondelle de 5 mm de diamètre issue de la marge de la colonie âgée de 7 jours, sont incubées à 28°C à l'obscurité. Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions, sans la molécule. La croissance mycélienne est estimée lorsque le témoin a envahi la boîte de Pétri, en mesurant la moyenne des diamètres perpendiculaires les plus dissemblables de chaque colonie. Le pourcentage d'inhibition (PI) par rapport au témoin est calculé selon la formule suivante :

$$PI = \frac{V_t - V_f}{V_t} \times 100$$

V_t : vitesse de la croissance du champignon dans le milieu de culture sans molécule.

V_f : vitesse de la croissance du champignon dans le milieu de culture à une concentration [c] de la molécule.

De l'équation de régression linéaire entre les logarithmes népériens des concentrations (en abscisses) et les pourcentages d'inhibition de la croissance (en ordonnées) qui sont transformés en probits, on détermine les concentrations inhibitrices de 50 (IC_{50}) de la croissance mycélienne.

Les mesures des diamètres des colonies sont calculées quotidiennement pendant 7 jours. Grâce à ces résultats, nous avons pu calculer le Taux d'inhibition, puis nous les avons transformés en probits, et nous avons tracé des droites (probits en fonction log de concentration). A partir du point 5 (qui correspond à 50%) sur l'axe des abscisses, nous avons extrapolé sur l'axe de y les valeurs x_1 pour déterminer la IC_{50} .

| | Chalcone | MeO-Chalcone | Cl-Chalcone | Isatine |
|-------------------------|----------|--------------|-------------|---------|
| IC ₅₀ gr/ml | 0,162 | 0,142 | 0,236 | 0,0017 |
| IC ₅₀ mmol/l | 778,509 | 596,388 | 975,005 | 11,562 |

| | <u>3a</u> | <u>3b</u> | <u>3c</u> | <u>4a</u> | <u>4b</u> | <u>4c</u> | <u>5a</u> | <u>5b</u> | <u>5c</u> |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| IC ₅₀ gr/ml | 0,0022 | 0,0149 | 0,0007 | 0,1465 | 0,4070 | 0,1121 | 0,0169 | 0,0440 | 0,0127 |
| IC ₅₀ mol/l | 0,0058 | 0,0362 | 0,0017 | 0,3589 | 0,9288 | 0,2536 | 0,0380 | 0,0927 | 0,0265 |
| IC ₅₀ mmol/l | 5,8351 | 36,1929 | 1,6822 | 358,9103 | 928,8208 | 253,5848 | 37,9576 | 92,7055 | 26,4776 |

CONCLUSION GENERALE :

Au cours de ce travail, nous avons réalisé la synthèse d'une série de produits spiro[oxindoles-pyrrolidines] par le biais de la réaction de cycloaddition dipolaire-1,3 multicomposés en une seule étape ; en utilisant trois techniques d'activation à savoir le chauffage classique, les ultrasons et les micro-ondes. Les produits sont obtenus avec des bons rendements et cela à partir de réactifs simples, disponibles et bon marché.

Ce travail nous a également permis de confirmer que les techniques modernes répondant aux exigences de la chimie verte à savoir la technique des ultrasons et celle des micro-ondes ont montré une grande efficacité pour réaliser la synthèse de ces produits avec de bons rendements et une régiosélectivité totale et cela avec des laps de temps très courts comparés au chauffage classique ; la technique des micro-ondes nous a permis d'éliminer l'usage des solvants ce qui est de bonne augure pour l'environnement.

La réaction est totalement régiosélective puisqu'on a obtenu un seul des cycloadduits théoriquement attendus. La RMN 2D nous a beaucoup servi pour l'identification structurale des spiro-[oxindole-pyrrolidines] préparés notamment la HMBC.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons réalisé des tests biologiques pour évaluer l'activité antifongique de nos produits. Nous avons ainsi utilisé le "fusarium", un champignon responsable de la maladie du BAYOUD qui touche les palmiers dattiers causant des ravages au niveau de la production des dattes en particulier en Afrique du nord.

Les premiers résultats sont assez encourageants pour certaines molécules telles que la 3c qui présente une concentration d'inhibition à 50% (IC_{50}) de 0,7mg/ml.

En perspective, ces résultats préliminaires nous ont encouragés pour préparer d'autres spiro-[oxindole-pyrrolidines] diversement substitués afin d'améliorer les taux d'inhibition.

RESUME :

L'objectif de ce travail est la synthèse des produits spiro-[oxindole-pyrrolidines] par le biais de la réaction de cycloaddition dipolaire-1,3 en une seule étape ; par différentes techniques (reflux, ultrason et micro-ondes), ce qui nous a permis de synthétiser une série de dérivés de spiro-[oxindole-pyrrolidines], à partir de réactifs simples, avec un rendement élevé et une régiosélectivité bien contrôlée, déterminée par RMN ; de plus, ces molécules s'avèrent être dotées d'activités biologiques.

Ce travail nous a permis aussi de confirmer que les techniques modernes, répondant aux exigences de la chimie verte à savoir la méthode des ultrasons et celle des micro-ondes, ont montré une efficacité impeccable pour exécuter la synthèse de ces produits tout en assurant un bon rendement et une meilleur régiosélectivité et cela dans des conditions opératoires normales et durant un temps très court ; en plus de ça, la technique des micro-ondes nous a permis de réduire le taux de pollution et cela par l'élimination de l'usage des solvants.

Les résultats des tests biologiques pour évaluer l'activité antifongique de nos produits, vis à vis du "fusarium" un champignon responsable de la maladie du BAYOUD qui touche les palmiers dattiers, sont assez encourageants pour certaines molécules telles que la 3c qui présente une concentration d'inhibition à 50% (IC_{50}) de 0,7mg/ml.

Mots clés : cycloaddition dipolaire-1,3, oxindole, isatine, ylure d'azométhine, spiro-oxindole, chalcones, acides aminés.

RESUME

L'objectif de ce travail est la synthèse des produits spiro-[oxindole-pyrrolidines] par le biais de la réaction de cycloaddition dipolaire-1,3 en une seule étape ; par différentes techniques (reflux, ultrason et micro-ondes), ce qui nous a permis de synthétiser une série de dérivés de spiro-[oxindole-pyrrolidines], à partir de réactifs simples, avec un rendement élevé et une régiosélectivité bien contrôlée, déterminée par RMN ; de plus, ces molécules s'avèrent être dotées d'activités biologiques. Ce travail nous a permis aussi de confirmer que les techniques modernes, répondant aux exigences de la chimie verte à savoir la méthode des ultrasons et celle des micro-ondes, ont montré une efficacité impeccable pour exécuter la synthèse de ces produits tout en assurant un bon rendement et une meilleure régiosélectivité et cela dans des conditions opératoires normales et durant un temps très court ; en plus de ça, la technique des microondes nous a permis de réduire le taux de pollution et cela par l'élimination de l'usage des solvants. Les résultats des tests biologiques pour évaluer l'activité antifongique de nos produits, vis à vis du "fusarium" un champignon responsable de la maladie du BAYOUD qui touche les palmiers dattiers, sont assez encourageants pour certaines molécules telles que la **3c** qui présente une concentration d'inhibition à 50% (IC₅₀) de 0,7mg/ml.

Mots clés :

Cycloaddition Dipolaire-1,3; Oxindole; Isatine; Ylure D'azométhine; Spirooxindole; Chalcones; Acides Aminés; Ultrasons; Mico-Ondes; Fusarium.