



**HAL**  
open science

# Synthèse de dérivés coumariniques d'intérêts biologiques et antioxydants

Delel Dridi

► **To cite this version:**

Delel Dridi. Synthèse de dérivés coumariniques d'intérêts biologiques et antioxydants. Chimie. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0335 . tel-01754665

**HAL Id: tel-01754665**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754665>**

Submitted on 14 Jan 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Thèse cotutelle  
Présentée en vue de l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE ET DE L'UNIVERSITE DE  
CARTHAGE  
Mention : Chimie Organique  
Par

Dridi Delel

Synthèse de dérivés coumariniques d'intérêts  
biologiques et antioxydants

Le 15 Décembre 2015 devant la commission d'examen suivante

Rapporteurs :

Janos Sapi                      Professeur (Université de Reims)

Fakher Chabchoub        Professeur (Université de Sfax)

Membre de jury :

Patrick Chaimbault        Professeur (Université de Lorraine)                      Examineur

Rym Abidi                    Professeur (Faculté des Sciences de Bizerte)                      Examinatrice

Gilbert Kirsch              Professeur (Université de Lorraine)                      Directeur de thèse

Fauzi Meganem              Professeur (Faculté des Sciences de Bizerte)                      Co-directeur de thèse

# ***DEDICACES***

Je dédie ma thèse ;

*A mes chers parents* : pour leur amour, leur protection, leur encouragement et leur présence auprès de moi dans tous mes pas au cours de la préparation de ma thèse et tout mon cursus éducatif.

*A mes chers sœurs* : pour leur enthousiasme qui m'ont trop aidé à achever cette thèse.

*A mes proches ami(e)s.*

Cette thèse ce n'est pas seulement le fruit de mes efforts, mais aussi c'est le fruit de votre patience, votre inquiétude et l'amour qu'on partage entre nous.

J'espère être à la hauteur de votre confiance que vous m'avez donnée.

je vous aime trop.

# ***REMERCIEMENTS***

Le travail de la présente thèse de Doctorat en co-tutelle est le fruit de la collaboration entre le laboratoire SRSMC (équipe Hécrin) et le laboratoire de synthèse organique de la Faculté des Sciences de Bizerte (Université de Carthage- Tunisie).

J'adresse, tout d'abord, mes plus vifs remerciements à Monsieur Gilbert Kirsch qui m'a accepté dans son équipe de recherche. Je le remercie pour sa confiance qu'il m'a accordée, et son encadrement remarquable. De même je tiens à remercier mon Professeur Tunisien Monsieur Faouzi Meganem de m'avoir proposé cette thèse, pour sa patience, son écoute et à qui je dois ma formation de base de chimie organique et je remercie Monsieur Abdessalem Ben Haj Amara le doyen de la Faculté des Sciences de Bizerte pour son aide administrative. Aussi je tiens à remercier Stephanie Hess Maitre de conférences HDR pour son aide pédagogique et ses conseils. Toute ma gratitude va également aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux responsables des démarches administratifs au Rectorat Carthage et au Ministère Tunisienne de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique qui m'ont permis cette opportunité de faire une thèse co-tutelle avec la France. Je remercie aussi l'équipe administrative de notre école doctorale SESAMES à l'Université de Lorraine surtout Monsieur Assfeld Xavier et Madame Severine Bonnenberger pour leurs écoutes.

J'associe à ces remerciements mes collègues au cours de ces années pour l'excellente ambiance dans laquelle j'ai évolué tout au long de mon doctorat :

Je remercie Frederic Nana et Ana Arande pour leurs compréhensions, leurs conseils techniques et leurs soutiens moraux.

Je remercie Ahmed Mahmoud Bakr pour tout ce qu'il a fait pour moi dès son arrivée au laboratoire aussi que Chamseddine Derabli.

Je remercie Charlène Gadais ,Zanjie Xu, Wafaa Chaouni, Clemens Zwergel, Kaled...et mes anciens collègues du laboratoire SRSMC-équipe Hécrin pour tout leur soutien, je leur souhaite une bonne continuation dans les domaines qu'ils ont choisi.

Je remercie, Emilie Bana pour le temps qu'elle a consacré pour moi afin que je puisse comprendre les principales bases de la biologie en relation avec mon travail et pour les tests enzymatique qu'elle a fait. Aussi Tzvetomira Tzanova et son équipe pour les tests anti-oxydants.

Je remercie Monsieur Patrick Chaimbault, pour son aide fondamentale et les analyses du MALDI-TOF-MS, que d'après lui j'ai appris une nouvelle méthode analytique.

Je remercie, Véronique Vaillant, Sandrine Rup et Céline Desvignes pour les analyses RMN et leurs conseils techniques ; aussi Monsieur Moinier Didier pour son travail.

Je remercie les stagiaires avec qui j'ai eu l'occasion de travailler: Marine Messmer et Rowane Lyons ; aussi tous les autres stagiaires qui sont passés par notre laboratoire pour effectuer leurs stages de Master ou de licence. On a bien profité de notre temps ensemble.

Je remercie Yannick en tant qu'ancien stagiaire au sein de notre laboratoire aussi en tant que collègue pour ces idées et l'ambiance qu'il l'a amené au laboratoire.

Je remercie mes chers collègues et amis italiens : Adèle Piroli, Guiseppe, Simone, et le Professeur Rino Ragno de l'Université Sapienza qui m'ont fait découvrir de nouveaux logiciels et des programmes de docking ainsi que le 3DQSAR pour étudier virtuellement l'interaction des molécules avec les enzymes.

Enfin, je remercie la famille Ben Djmia, l'association Aigle de Carthage Metz-Nancy et tout(e)s mes ami(e)s que je les ai connues pendant ma période de thèse en France.

## *Résumé*

### **Synthèse de nouvelles chalcones dérivées de coumarines et d'intérêt biologique potentiel.**

Dans le cadre des travaux développés sur les coumarines et autres flavonoïdes au laboratoire (aurones inhibitrices de NFkB, polycycles chromaniques inhibiteurs de CDC25), le travail de la thèse a consisté à poursuivre dans ce domaine en construisant de nouvelles chalcones à partir de dérivés acétylés de coumarines par condensation avec des aldéhydes cinnamiques préparées suivant différentes méthodes.

Les chalcones ainsi préparées ont été étudiées pour les effets antioxydants en utilisant la spectrophotométrie ainsi que pour l'inhibition des phosphatases CDC25.

## *Abstract*

### **Synthesis of new chalcones derived from coumarines of potential biological interest.**

As part of the work developed on coumarin and other flavonoids in our laboratory (aurones as potential NFK-B inhibitors, chromanic polycycles as CDC25 phosphatases inhibitors), the aim of this thesis was to pursue the research in this area by synthesizing new chalcones from acetylated coumarines derivatives by condensation with cynamic aldehydes prepared by different methods.

The prepared chalcones were studied for their antioxidant activity using spectrophotometry and for their inhibition of CDC25 phosphatases.

## *Resumé de la thèse en arabe*

### **تخليق شالكونات جديدة مشتقة من الكومارين ذات أهمية بيولوجية فعالة**

كجزء من تطوير الأبحاث على الكومارين والفلافونيدات في مختبرنا) الأورون كمثبط لإنزيم إن إف كى - بي والكومارينات متعددة الحلقات كمثبطات لإنزيم سى دى سى 25 فوسفاتيز (، فإن هدف هذه الأطروحة هو تخليق شالكونات جديدة من مشتقات الأستيل كومارين عن طريق تكتيفها مع السيناميك ألدهيد المحضر بطرق عديدة. هذه المشتقات تم

اختبارها حيويًا لبيان فاعليتها كمضادات للأكسدة بقياسات الطيف ، وكذلك فعاليتها كمثبطات لإنزيم سي دي سي 25 فوسفاتيز.



## *Liste des figures*

Figure 1: Numérotation des cycles du squelette chalcone

Figure 2: structures des chalcones glycosylées ou alkylées

Figure 3: Aperçu schématique de la voie des flavonoïdes majeur dans les plantes

Figure 4: Structure de 6'-dioxychalcone isoliquiritigénine et la 5'-deoxyflavanone liquiritigenin

Figure 5: Plantes qui peuvent avoir l'accumulation des chalcones

Figure 6: Schéma de l'équation de la réaction de la synthèse des chalcones

Figure 7: Exemples de réactions de synthèse des nouvelles chalcones et leurs valorisations dans la synthèse d'autres molécules hétéro-aromatiques

Figure 8: Quelques nouveaux dérivés de chalcones hétérocycliques

Figure 9: Structure de Licochalcone A et isoliquiritigénine

Figure 10 : 3-geranyl-2, 3', 4, 4'-tetrahydroxychalcone inhibiteur de 5- $\alpha$  reductase

Figure 11 : Mécanisme d'intervention des chalcones (I) et (II) dans l'inhibition de la VEGF.

Figure 12 : Interruptions du complexe p53-MDM2 par les chalcones

Figure 13: le 3, 2, 3', 4-tetrahydroxychalcone

Figure 14: Structures de la coumarine et la chalcone points de départ d'une nouvelle chalcone-coumarine inhibitrice du cancer de cerveau

Figure 15: Structure générale des chalcones vinyliques

Figure 16 : Structure du composé 1A et du composé 5A

Figure 17 : Spectre de proton du composé 1A

Figure 18 : Agrandissement de la zone aromatique du spectre de composé 1A

Figure 19 : Spectre de proton du composé 5A

Figure 20: Agrandissement de la zone aromatique du spectre de composé 5A

Figure 21 : Structures générale des bases de Schiff à partir des dérivés d'isatine avec trimetoprim et sulfodoxine

Figure 22: Structure générale de *N*-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide

Figure 23: Structure chimique de (Z)-2-ethyl-N'-(2-oxo-1-((4-(3-(trifluoromethyl) phenyl) piperazin-1-yl) methyl)indolin-3-ylidene)butanethiohydrazide.

Figure 24: Structure du composé 1D

Figure 25: Spectre <sup>1</sup>HRMN du composé 1D

Figure 26: Structure générale de 3-formylchromone

Figure 27: Superposition de la boucle du site actif de CDC25B (1qb0) avec un groupe d'autres PTP. Les résidus cystéine des sites actifs sont présentés dans l'hélice avec l'épine dorsale de la boucle de HCX5R. Les cinq premiers résidus de l'hélice qui suit immédiatement la boucle du site actif sont indiqués dans le dessin avec des couleurs différentes pour chaque phosphatase.

Figure 28: Structure des CDC25 (A et B) présentant leurs sites actifs

Figure 29: Structure cristalline du domaine catalytique de Cdc25B montrant la phosphatase dans le site

Figure 30: Swimming pool et site actif

Figure 31: Surexpression de la protéine CDC25 dans les cancers humains

Figure 32: Structure de l'anhydride 1i

Figure 33: Structure du sester-terpenoïde n°25

Figure 34: Structure du diallyl-tétrasilfide et Structure du dipropyl-tétrasilfide

Figure 35: Structures des composés bis-thiazolone

Figure 36: Structure du composé IRC-083864

Figure 37: structure du flavone

Figure 38: Chalcone-coumarine inhibiteur de CDC25B et son  $CI_{50}$ .

Figure 39: Pourcentage d'inhibition de p-méthyl-2,4-dihydroxychalcone et de p-diméthylamine-2,4-dihydroxychalcone

Figure 40: Structure des chalcones inhibitrices de CDC25B

Figure 41: 2,4-dichloro-2',4',6'-trihydroxychalcon

Figure 42 : Résultats du docking pour les produits de la première série

Figure 43: Résultats du docking pour des molécules de la deuxième série

Figure 44: Résultats du docking de la troisième série

Figure 45: Résultats du docking pour les produits de la quatrième série par leurs énantiomères.

Figure 46: Résultats du docking pour la deuxième série

Figure 47: Composition de site actif et de swimming pool du Cdc25B

Figure 48: Déphosphorylation de 3-OMFP en 3-OMF

Figure 49: Pourcentage d'activité inhibitrice des produits synthétisés avec le CDC25 A et B à une concentration de 20 $\mu$ M par rapport au DMSO control.

Figure 50: Principe de MALDI-TOF-MS

Figure 51 : Spectres MS des composés après criblage

## *Liste des tableaux*

Tableau n° 1: Exemples des chalcones synthétisées inhibitrices des radicaux libres

Tableau n°2: Activité antibactériennes de quelques nouvelles chalcones de synthèse

Tableau n°3: Activité anti-cancéreuse des nouvelles chalcones synthétisées en référent au 5FU

Tableau n°4: Cibles anticancéreuses et anti-inflammatoires de quelques chalcones naturelles et synthétiques

Tableau n°5: Rendement de la réaction de synthèse des dérivés coumarinique et leurs P<sub>f</sub>

Tableau n°6: Comparaison des rendements des méthodes de la synthèse des dérivés de cinnamaldéhydes

Tableau n°7: Optimisation de la synthèse des produits par 3 méthodes

Tableau n°8: Optimisation de la réaction de la synthèse du composé 2B

Tableau n°9 : <sup>1</sup>Het <sup>13</sup>C RMN des cinnamaldehydes synthétisées

Tableau n°10 : Structures des molécules sélectionnées pour le test *in-silico* avec CDC25A

Tableau n°11 : Structures des composés de la deuxième série des chalcones

Tableau n°12 : Structures des énantiomères des molécules de la troisième série

Tableau n°13 : Structures des énantiomères des composés de la dernière série

Tableau n° 14 : Résultats du docking des molécules de la première série

Tableau n°15 : Structure des composés de la deuxième série

Tableau n°16 : Structures des énantiomères des molécules de la troisième série

Tableau n°17 : Résultats du docking des molécules de la troisième série

Tableau n° 18 : Structures des énantiomères des composés de la dernière série

Tableau n° 19 : Résultats du docking des molécules de la dernière série

Tableau n° 20: Nombre de LH et leurs longueurs entre les molécules et CDC25A et B, et énergie de pénétration des molécules dans les sites

Tableau n° 21: Les isotopes observé en MS

Tableau n° 22: comparaison de l'activité anti-oxydante des cinq premières chalcones (1A-5A) avec celle des dérivés de 3-acétylcoumarine (1a-5e)

# Abréviations

PAL: Phénylalanine ammonia-lyase,

C4H : Cinnamate 4-hydroxylase,

4CL: 4 coumarate-CoA ligase ;

C4H: Cinnamate-4-hydroxylase

CHI: Chalcone isomérase

CHR: Chalcone réductase

CHS: Chalcone synthase

4CL: 4-coumaroyl:CoA-ligase

DFR: Dihydroflavonol 4-reductase

DMID: 7,2'-dihydroxy, 4'-methoxyisoflavanol déshydratase

F3H: Flavanone 3-hydroxylase

FSI et FSII: flavone synthase

F3'H: Flavonoïde 3' hydroxylase

F3'5'H: Flavonoïde 3'5' hydroxylase

IOMT: Isoflavone O-méthyltransferase

IFR: Isoflavone réductase

I2'H: Isoflavone 2'-hydroxylase

IFS: Isoflavone synthase

LDOX: Leucoanthocyanidin dioxygenase

LCR: Leucoanthocyanidin reductase

OMT: O-methyltransferase

PAL: Phe ammonia-lyase

RT: Rhamnosyl transferase

STS: Stilbene synthase

UFGT: UDPG-flavonoid glucosyl transferase

VR: Vestitone reductase

DCM: Dichlorométhane

ETOH : Ethanol

MeOH : Méthanol

THF : Tétrahydrofurane

OMe : Groupement Méthoxy

tBuOH: tertio-butanol

EtOH: Ethanol

DMF : N, N-diméthylformamide

CDCl<sub>3</sub> : Chloroforme deutérié

Et<sub>3</sub>N : Triéthyl-amine

Me : Méthyl

DMSO: Diméthylsulfoxyde

Rdt: Rendement

P<sub>f</sub> : Point de fusion

T° : Température

T°<sub>amb</sub> : Température ambiante

éq : Equivalent

μwave: Micro-onde

Hz : Hertz

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

MS : Spectroscopie de Mass

CCM : Chromatographie sur couche mince

UV : Ultra-Violet

<sup>1</sup>H RMN : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

<sup>13</sup>C RMN : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13

*J* : Constante de couplage

CDC25 : Cell Division Cycle 25

PTP : Protéines tyrosine phosphatases

CDK: Cyclin Dependant Kinases

LH : Liaison hydrogène

CI<sub>50</sub> : concentration inhibitrice médiane

MAO: Monoamine oxydase

CoA : Coenzyme-A

ADN : acide désoxyribonucléique

Arg : Arginine

Lys: Lysine

Ser: Sérine

Tyr: Tyrosine

Glu: Acide Glutamique

Pro: Proline

$\mu\text{M}$ : Micromole

Da: Dalton

KDa: Kilo Dalton

$\text{A}^\circ$ : Angström



# Sommaire

Dédicace.....	i
Remerciement.....	ii
Résumé de la thèse.....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Abréviation.....	x
Sommaire.....	xiv
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Les Chalcones.....</b>	<b>4</b>
I.    Les Chalcones .....	5
II.   Méthodes de synthèses des chalcones.....	6
II.1. Biosynthèse des chalcones.....	6
II.1.1. Transformation des chalcones.....	7
II.1.2. Effets des chalcones et intérêts des enzymes.....	8
II.2. Synthèse chimique des chalcones.....	10
II.2.1. Transformations chimiques.....	11
III.  Rôles et activités des chalcones.....	12
III.1. Activités Anti-oxydantes et antibactériennes des nouvelles chalcones.....	13
III.1.1. Activités anti-oxydantes.....	13
III.1.2. Activités antibactériennes.....	14
III.2. Activités anticancéreuse et anti-inflammatoire des chalcones.....	15
III.2.1. Activité anticancéreuse.....	15
III.2.2. Activité anti-inflammatoire.....	22
<b>Chapitre II : Résultats et Discussions Chimique.....</b>	<b>24</b>
I.    Synthèse des analogues de chalcones.....	26
I.1. Préparation des produits de départ .....	26

I.1.1. Synthèse des dérivés de 3-acétylcoumarine.....	26
I.1.2. Synthèse des dérivés de cinnamaldehyde.....	28
I.2. Aldolisation pour l'obtention de la première série des chalcones.....	33
I.3. Condensation des coumarines avec l'isatine.....	37
II. Action des dérivés azotés sur les chalcones de la première série.....	41
II.1. Réactivité des composés de la première série vis-à-vis d'hydrazine....	41
II.2. Réactivité des composés de la première série vis-à-vis d'urée .....	42
III. Essai de synthèse des formyles thiéno-chromones.....	44
III.1. Synthèse des thiophènes.....	45
III.2. Application de la réaction de Vilsmeier-Hack-Arnold sur les thiophènes synthétisés.....	47
<b>Chapitre III: Partie Expérimentale .....</b>	<b>48</b>
I. Introduction générale .....	50
II. Synthèse des chalcones.....	51
II.1. Préparation des réactifs.....	51
II.1.1. Synthèse des 3-acétylcoumarines.....	51
II.1.2. Synthèse des dérivés de cinnamaldehydes.....	53
II.2. Synthèse des chalcones.....	59
II.2.1. Condensation des 3-acétylcoumarines et des cinnamaldehydes.....	59
II.2.2. Condensation des 3-acétylcoumarines et d'isatine .....	68
III. Action des dérivés azotés sur les chalcones de la première série.....	71
III .1. Chalcones synthétisées vis-à-vis l'hydrazine .....	71
III.2. Chalcones synthétisées vis-à-vis l'urée.....	75
IV. Synthèse des thiophènes.....	78
<b>Chapitre IV: Tests Biologiques.....</b>	<b>82</b>
I. Les phosphatases CDC25.....	84
I.1. La structure.....	84
I.2. CDC25B.....	86

I.2.1. Domaine catalytique.....	86
II. Inhibiteurs de CDC25.....	88
II.1. Les mimes de groupement phosphate.....	89
II.2. Les composés poly-soufrés.....	89
II.3. Dérivés thiophéniques.....	90
II.4. Dérivés à base de quinone.....	91
II.5. A la recherche de nouveau inhibiteurs de CDC25.....	91
III. Evaluation de l'activité des composés synthétisés.....	94
III.1. Criblage virtuel par docking.....	94
III.1.1. Principe .....	94
III.1.2. Détermination du site actif.....	95
III.1.3. Les interactions entre le ligand et le récepteur .....	96
III.1.4. Résultats du docking.....	96
III.1.4.1. Résultats du docking des molécules synthétisées avec CDC25A...96	
III.1.4.2. Résultats du docking des molécules synthétisées avec CDC25B.101	
III.2. Criblage par tests biologiques.....	111
III.2.1. Méthode Fluorimétrique.....	111
III.2.1.1. Principe.....	111
III.2.1.2. Mode opératoire.....	112
III.2.1.3. Résultats.....	113
III.2.2. Criblage physico-chimique par MALDI-TOF-MS.....	115
III.2.2.1. Présentation.....	115
III.2.2.2. Principe de fonctionnement.....	117
III.2.2.3. Principe de criblage.....	118
III.2.2.4. Résultats.....	119
III.3. Test antioxydant.....	121
III.3.1. Principe de test DPPH.....	121
III.3.2. Résultats du test.....	122

<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>125</b>
<b>Références.....</b>	<b>128</b>
<b>Participations scientifiques et publications.....</b>	<b>146</b>

# **INTRODUCTION GENERALE**

## I. Introduction générale

De nos jours, les recherches ont prouvé qu'il existe, dans la nature, plusieurs substances naturelles qui ont des propriétés thérapeutiques importantes. Parmi ces substances connues par leurs d'intérêts pharmacologiques on note les molécules suivantes : les polyphénols, les molécules azotées, les terpènes et les flavonoïdes. Ces derniers comprennent différents sous-groupes à l'instar des aurones et des chalcones. Différentes études ont été effectuées pour statuer sur leurs activités biologiques.<sup>1</sup> L'équipe dans laquelle j'ai mené mes travaux de thèse a une longue expérience dans la synthèse des molécules hétérocycliques telles que : thiénoquinole<sup>2</sup>, thiénothiophène<sup>3</sup>, thiénothiazole<sup>4</sup>, furocoumarine<sup>5</sup>, et les coumarines<sup>6</sup>...etc. Ce travail est donc une suite logique des travaux précédents ; elle se focalise sur les chalcones.

Dans ce cadre, j'ai étudié différents procédés de synthèse visant à modifier la structure naturelle des chalcones pour synthétiser de nouvelles structures analogues. Celles-ci portent des substituants différents (des groupements méthoxylées, des thiophènes, du brome.....) en y ajoutant des liaisons doubles afin de tester leurs activités biologiques.

Les tests sont effectués soit :

- *in-silico* (en appliquant des logiciels spécialisés) ou

---

<sup>1</sup> H. Abidi, J.S. Mojarrad, H. Asghaloo, G. Zarrini; Synthesis, *in-vitro* antimicrobial and antioxidant activities of chalcones and flavone derivatives having allylic substitutions; **Medicinal Chemistry Research**; 2011; 20(8),1318-1324.

<sup>2</sup> S. Deprerts, G. Kirsch; Synthesis of 5-Methylbenzo[b]thieno[2,3-c]isoquinolines and 5-Methylbenzo[b]seleno[2,3-c]isoquinolines; **European Journal of Organic Chemistry**; 2000; 7, 1353-1357.

<sup>3</sup> G. Sommen, A. Comel, G. Kirsch; "A Convenient Synthesis of 2,3,4,5-Functionalised thieno[2,3-b]thiophenes.", **Synthesis**, 2003;5,735-741.

<sup>4</sup> G. Revelant, S. Hesse, G. Kirsch; Synthesis of novel 2-aminothieno[3,2-d]thiazoles and selenolo[3,2-d]thiazole, **Tetrahedron**., 2011; 67,9352-9357.

<sup>5</sup> S. Hesse, G. Kirsch; Synthesis of new furocoumarin analogues via cross-coupling reaction of triflate; **Tetrahedron Letter**; 2003; 44, 97-99.

<sup>6</sup> Valente.S, Bana.E, Viry.E, Bagrel.D, Kirsch.G; Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases; **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**; 2010; 20; 5827-5830.

- *in-vitro* (à la recherche surtout d'une activité anti-oxydante) ou aussi pour identifier leurs réactivités avec différentes cellules cancéreuses.

Ce travail est réparti en deux grandes parties :

1. La synthèse : où je présente les différentes molécules synthétisées avec leurs principaux modes opératoires tout en s'appuyant sur les différentes techniques d'analyses mises en œuvre.
2. L'activité biologique des composés synthétisés : où j'ai regroupé les résultats des tests biologiques effectués sur certains des produits obtenus.

# **Chapitre I : Les Chalcones**



## I. Les Chalcones

Les chalcones (figure1), ou 1,3-diaryl-2-propen-1-ones sont présentées sous forme de deux cycles benzéniques (A) et (B) liés entre eux par un chaînon tricarboné, cétonique  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturé. Ces derniers sont équivalents aux cycles (A) et (B) des autres flavonoïdes, sauf que leurs numérotations sont inversées. Ces composés sont rarement substitués sur le cycle B. De manière équivalente aux autres flavonoïdes, les positions 2', 4' et 6' du cycle A peuvent être hydroxylées ou méthoxylées.

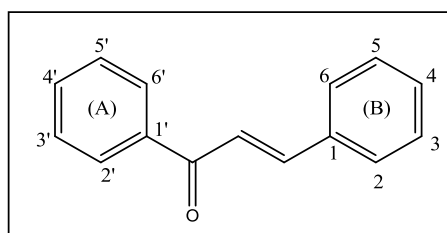


Figure1 : Numérotation des cycles du squelette chalcone

Des dérivés glycosylés existent (figure2) mais essentiellement O-glycosylés (une seule chalcone C-glycosylée qui est la 3'-glucosylisoliquiritigénine était isolée de *Cladrastis platycarpa* (Fabaceae)<sup>7</sup>).

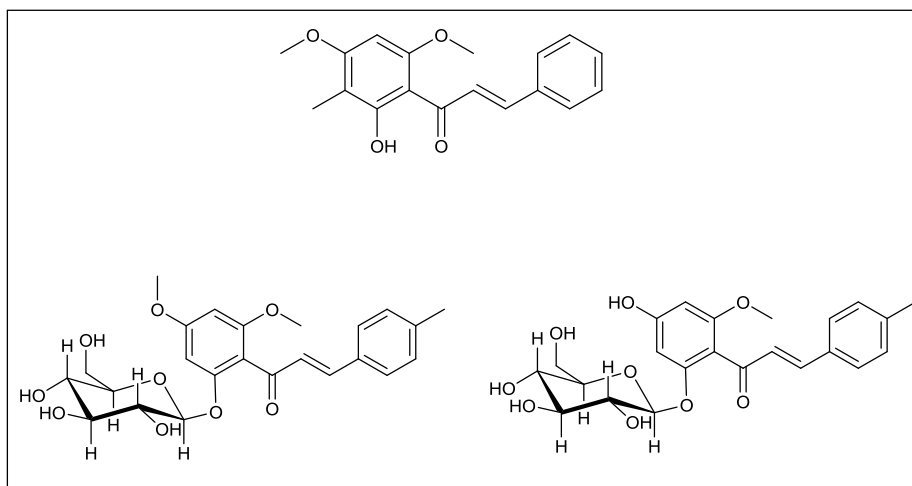


Figure2: structures des chalcones glycosylées ou alkylées

La présence d'une double liaison conjuguée confère aux chalcones une couleur jaune. La configuration de la double liaison est généralement E dans les chalcones naturelles.<sup>8</sup>

<sup>7</sup> Ohashi.Het al, *Cladrastis Platycarpa* constit, struct, **Phytochemistry**, 1977, 16, 1106-1107

Il existe aussi des hydrochalcones qui se sont privées de la double liaison au niveau de la petite chaîne carbonée. La plus connue et la plus étudiée est la phloridizine et son aglycone qui est la phlorétine (2,4,4',6-tetrahydroxychalcone)<sup>9,10</sup>

## II. Méthodes de synthèse des chalcones

Les chalcones présentent un groupe très intéressant parmi les produits naturels. Elles forment les intermédiaires essentiels dans la biosynthèse des autres flavonoïdes.

Les chalcones peuvent aussi être obtenues suite à une synthèse chimique en appliquant la réaction de condensation aldolique<sup>11</sup> des acétophénonnes et des benzaldéhydes substitués, pour avoir des variétés de chalcones par la diversité des substituants sur les molécules mises en jeu selon le schéma réactionnel cité dans la figure 6.

### II.1 Biosynthèse des chalcones

La chalcone est naturellement synthétisée par un grand nombre de plantes suivant la voie métabolique des phénylpropanoïdes. La phénylalanine est d'abord transformée en acide cinnamique, lui-même transformé en acide paracoumarique qui forme alors un thioester avec le coenzyme A, le 4-coumaroyl-CoA<sup>12</sup>. Ce dernier réagit alors avec 3 molécules de malonyl-coenzyme A qui finissent par se cycliser et former un second groupe phényle, formant ainsi le 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone<sup>13,14</sup>.

---

<sup>8</sup> Harborne and Baxter, *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive compounds from plants*; Taylor and Francis, London 1993.

<sup>9</sup> J M Henderson and M H Kutner, An analysis of survival and treatment failure following abdominoperineal and sphincter-saving resection in Duke's B and C rectal carcinoma. A report of the NSABP clinical trials, *Annals Surgery*; 1987;206, (2), 224–226.

<sup>10</sup> Silfen, J.; Yanai, P.; Cabantchik, Z. I. Bioflavonoid effect on in vitro cultures of plasmodium falciparum. Inhibition of permeation pathways in the host cell membrane by the intraerythrocytic parasite. *Biochemical Pharmacology*; 1988, 37; 4269-4276.

<sup>11</sup> Charles-Adolphe Wurtz;;Ueber einen Aldehyd-Alkohol ; *J. Prakt. Chemie*, 1872; 5(1) ;457-464

<sup>12</sup> P.C.M. Jansen, D.Cardon ; *Ressources végétales de l'Afrique tropicale 3 Colorants et tanins*, Fondation Porta/Backhuys Publishers/CTA Wageningen, Pays-Bas, 2005, page 95

<sup>13</sup> Yoshikazu Tanaka, Shinzo Tsuda and Takaaki Kusumi, Metabolic Engineering to Modify Flower Color, *Plant Cell Physiology*, 1998, 39 (11); page 1119-1126

La chalcone peut ensuite être transformée par cyclisation interne en flavonoïde.

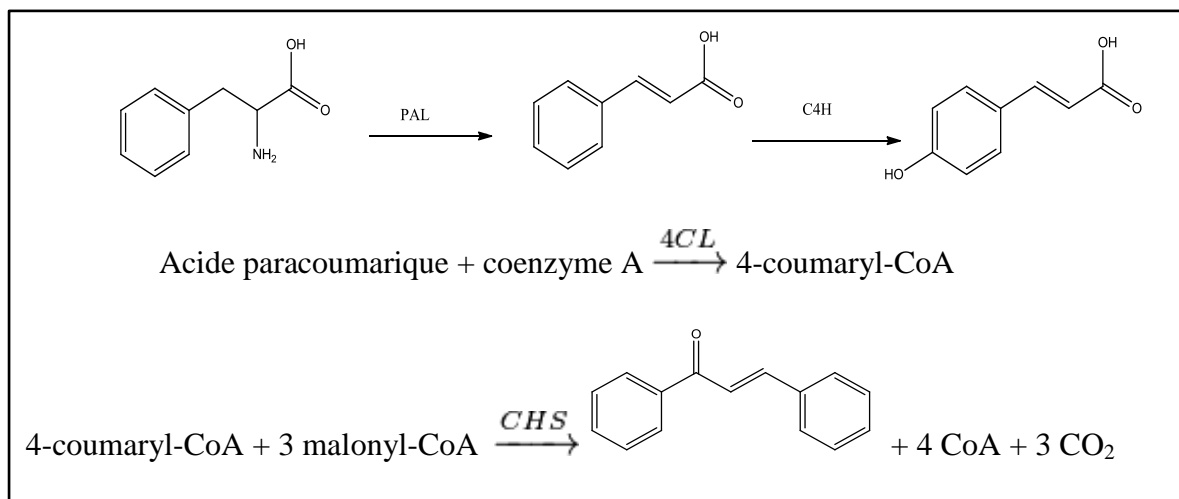


Schéma 1 : schéma de la biosynthèse des chalcones <sup>7,8</sup>

### II.1.1. Transformations des chalcones dans les plantes

La plupart des plantes n'accumulent pas les chalcones après leurs formations, mais elles s'isomérisent suite à l'intervention d'un enzyme. Elles s'isomérisent rapidement grâce à l'intervention de l'enzyme CHI (Chalcone Isomérase) pour former les flavanones correspondants. Comme par exemple la naringénine chalcone qui s'isomérise par l'intermédiaire du CHI pour former la naringénine flavanone.<sup>8</sup>

Seules quelques exceptions des plantes peuvent accumuler leurs chalcones; comme les mutants CHI d'asters (Aster de Chine) et l'œillet (*Dianthus cayophyllus*) semblait avoir des pétales de fleurs jaunâtres; un mutant d'*Arabidopsis* CHI contient une couleur de tégument modifié<sup>15</sup>. C'est ainsi que la peau du fruit de la tomate où s'accumule la chalcone naringénine couleur jaune.<sup>16</sup>

<sup>14</sup> TA Holton and EC Cornish, Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis, *Plant Cell*, 1995 ; 7(7), 1071–1083.

<sup>15</sup> Stefan Martens and Gert Forkman, Cloning and expression of flavone synthase II from Gerbera hybrids, *The plant Journal*, 1999; 20 (5); 611-618.

<sup>16</sup> Elio G.W.M. Schijlen , C.H. Ric de Vos , Arjen J. van Tunen , Arnaud G. Bovy; Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants ; *Phytochemistry*; 2004; 65; 2631–2648

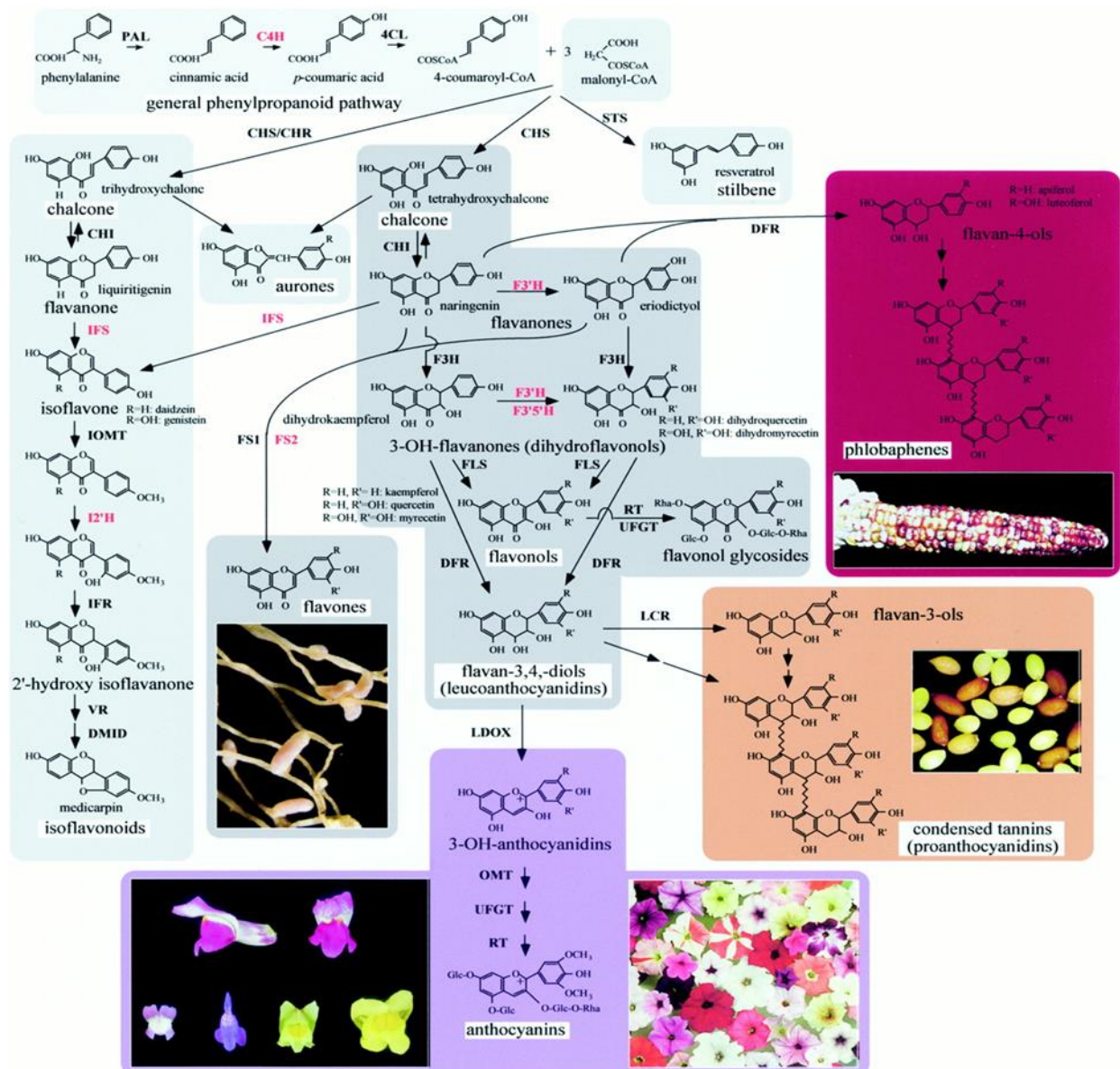


Figure 3 : Aperçu schématique de la voie des flavonoïdes majeur dans les plantes.<sup>17</sup>

### II.1.2. Effets des chalcones et intérêts des enzymes

L'enzyme chalcone synthase (CHS) a été une cible très intéressante pour l'ingénierie génétique et il y'a eu de nombreux exemples de co-suppression ou régulation à la base de ce gène afin de modifier la couleur des fleurs à l'égard de pur blanc en raison de l'absence totale de flavonoïdes. Le génome et la séquence d'ADN complémentaire codant la CHS sont isolés et caractérisés à partir des différentes espèces de plante. Donc l'expression du gène endogène du SHC a été étudiée en détail par la suite.<sup>11</sup>

<sup>17</sup> Cathie Martin, Francesca Quattrocchio , Erich Grotewold and Yimei Lin and Ann Hirsch ; Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology, *Plant Physiology*; 2001;126

D'autre part, théoriquement chaque chalcone possède son enzyme isomérase CHI. Or il y'a eu une exception. En effet on pensait que le premier type d'enzyme CHI était limité seulement pour les légumineuses. Il a récemment été rapporté que CHI du tabac est capable ainsi d'isomériser la 6'-dioxychalcone isoliquiritigénine et donner la 5'-deoxyflavanone liquiritigenin<sup>18</sup>.

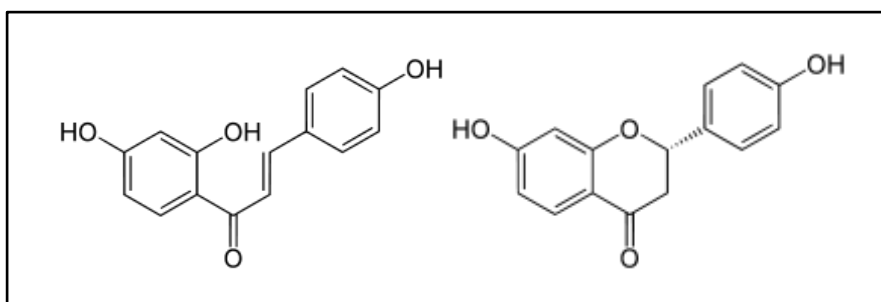


Figure 4: Structure de 6'-dioxychalcone isoliquiritigénine (à gauche) et la 5'-deoxyflavanone liquiritigenin (à droite)

Bien que les chalcones soient connues par leurs activités chimiques et thérapeutiques mais ça ne donne pas l'autorisation au blocage de la voie des flavonoïdes qui peut également conduire à des effets pléiotropies tels que la stérilité chez les mâles.<sup>19,20,21,22,23</sup>

<sup>18</sup> Jeffrey E. Young, Janet S. Klosko, and Marjorie E. Weishaar, *Schema Therapy: A Practitioner's Guide*, Guilford Press, New York: 2003, pp436, DOI: 10.1017/S1352465804211869, ISBN: 1-57230-838-9

<sup>19</sup> Napoli CA, Fahy D, Wang HY, Taylor LP, White anther: a petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility and is complemented by a chalcone synthase transgene, *Plant Physiol*; 1999; 120; 615-622

<sup>20</sup> Van der Meer IM, Stam ME, Van Tunen AJ, Mol JNM, Stuitjie AR; Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility; *Plant Cell*, 1992, 4, pages 253-262

<sup>21</sup> Ylstra B, Busscher J, Franken J, Hollman PCH, Mol JNM, Van Tunen AJ; Flavonols and fertilization in *Petunia hybrida*: localization and mode of action during pollen tube growth, *Plant Journal*, 1994, 6, 201-212

<sup>22</sup> Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA; Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences; *Plant Molecular Biology*, 1996, 5, 957-73.

<sup>23</sup> Deroles, S., Bradley, J.M., Schwinn, K.E., Markham, K.R., Bloor, S., Manson, D.G. and Davies K.M., An antisense chalcone synthase cDNA leads to novel colour patterns in *lisianthus (Eustoma grandiflorum)* flower; *Molecular Breeding*, 1998; 4; 59-66.



(a)

(b)

(c)

Figure 5 : Plantes qui peuvent accumuler des chalcones : (a)œillet (*Dianthus cayophyllus*);

(b) Aster de chine ;(c) Arabidopsis

## II.2. Synthèse chimique des chalcones

De nos jours et malgré les recherches d'autres alternatives, il n'existe qu'un seul mode de synthèse des chalcones. Ce mode consiste à appliquer la réaction de crotonisation (condensation aldolique) des benzaldéhydes avec des acétophénones substituées en utilisant une base forte comme catalyseur.

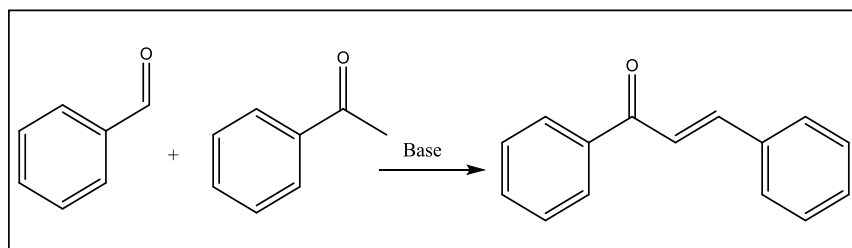


Figure 6 : Schéma général de la réaction de la synthèse des chalcones

Cette réaction entre un benzaldéhyde et l'acétophénone substitué a servi de modèle dans le cadre de la chimie verte d'une part, et d'autre part elle s'est révélée évoluer également sans solvant, c'est-à-dire une réaction en phase solide<sup>24,25</sup>.

<sup>24</sup> Palleros, D. R., Solvent-Free Synthesis of Chalcones; *Journal of Chemical Education*, 2004; 81, 1345

<sup>25</sup> Toda, F., et al., Aldol condensations in the absence of solvent: acceleration of the reaction and enhancement of the stereoselectivity; *Journal of the Chemical Society. Perkin Trans. I*, 1990, 3207.

## II.2.1. Transformations chimiques

A partir de ce principe de la synthèse, il y a eu pas mal de modifications effectuées sur le squelette des chalcones en leur apportant d'autres fonctions ou d'autres groupes, dans le but d'étudier leurs activités biologiques et avoir une nouvelle variété structurale dans la bibliothèque chimique.

En effet, il y a eu des différentes recherches qui ont été faites dans le but d'utiliser des dérivés d'acétophénones et de les condenser avec d'autres molécules aromatiques qui portent la fonction aldéhyde (Figure 7)

En généralisant, toutes les condensations entre aldéhydes et méthyl cétone aromatique ou des hétéroaromatiques conduisent à des composés pouvant être appelés chalcones. (Figure 8)

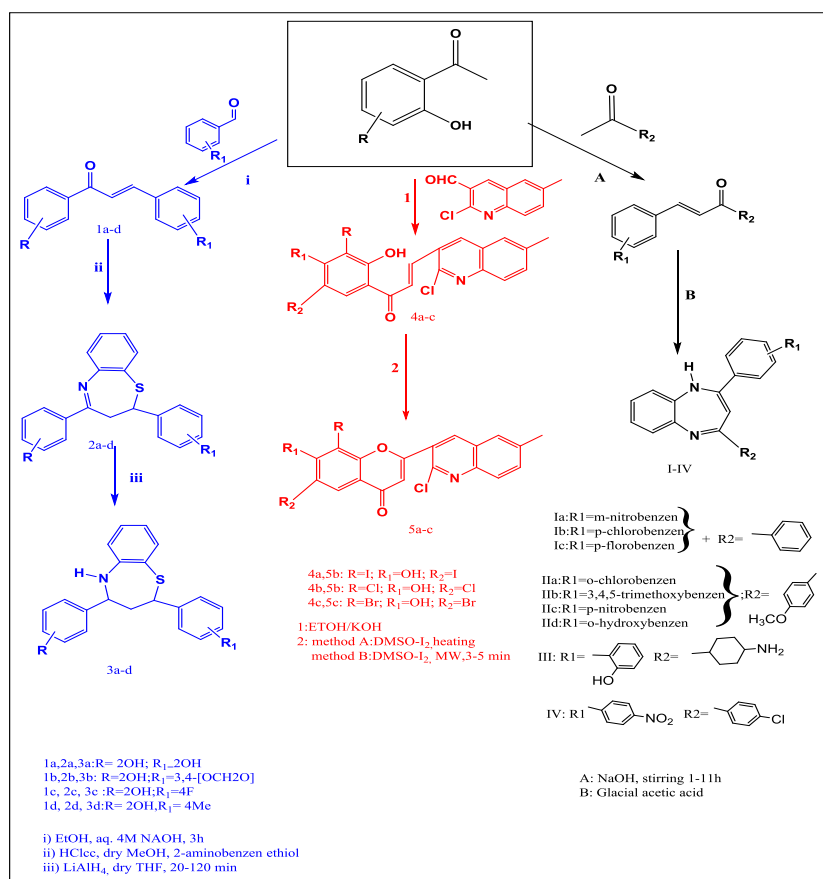


Figure 7: Exemples de réactions de synthèse des nouvelles chalcones et leurs valorisations dans la synthèse d'autres molécules hétéro-aromatiques.<sup>26,27</sup>, 28

<sup>26</sup> F.L.Ansari, S. Umbreen, L.Hussain, T.Makhmoor, S.A. Nawaz, M.A.Lodhi, S.N. Khan, F.Shaheen, M.I. Chhoudhary, A.Rahman ; Synthesis and biological activities of chalcone and 1,5-Benzothiazepine

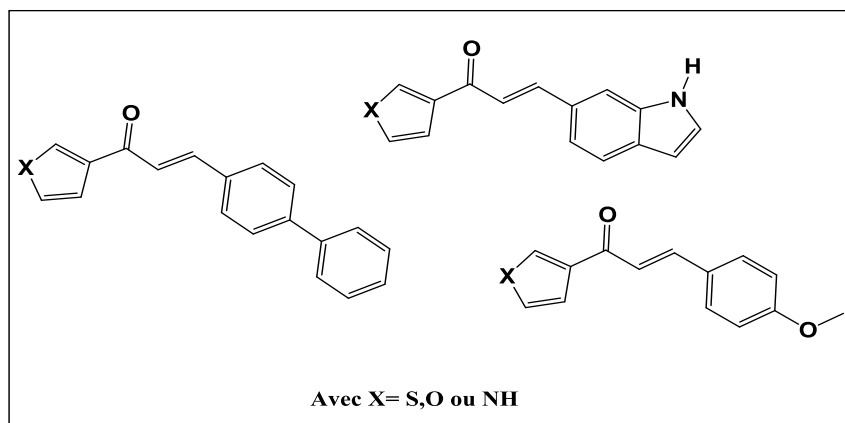


Figure 8 : Quelques nouveaux dérivés de chalcones hétérocycliques <sup>29</sup>

### III. Rôles et activités des chalcones

Les chalcones et les dihydrochalcones ont été étudiées pour leurs activités anticancéreuses<sup>30,31</sup>, anti-inflammatoires<sup>25,32</sup>, antioxydantes<sup>25</sup>, antimicrobiennes<sup>26</sup> et antiparasitaire <sup>26</sup>.

De plus leurs activités immunomodulatoire et immunosuppressives, aussi l'activité antiprotozoaire incluant trypanocidal, et antimalarial ont été le sujet de plusieurs recherches.<sup>14,32</sup>

---

derivatives :Promissing new free-radical scavengers, and Esterase, Urease, and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors; *Journal Of Chemistry and Biodiversity*, 2005; 2,487-496.

<sup>27</sup> S.S.Mokele, Y.B.Vibhute; Synthesis of some new biologically active chalcones and flavones; *Der Pharma Chemica*; 2009; 1 (2), 145-152.

<sup>28</sup> R.Singh, N.Kumar, M.Yadav, D.Pathak; Microwave-Assisted ,solvent free and parallel synthesis of some newer 2,4-disubstituted 1,5-Benzodiazepines of biological interest; *International Journal of Pharmaceutical Science and Drug Research*; 2013; 5 (3), 88-95.

<sup>29</sup> C. G. Darshan Raj , B. K. Sarojini , S. Hegde , S. Sreenivasa , Y. S. Ravikumar , V. Bhanuprakash , Y. Revanaiah , R. Ragavendra; In vitro biological activities of new heterocyclic chalcones derivatives; *Medicinal Chemistry Research*; 2013; 22; 2079–2087

<sup>30</sup> Anto. R, Sukumaran. K, Kunter.G, Rao.M, Subbaraju. V, and Kuttan. R; Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds, *Cancer Letters*, 1995; 97, 33-37

<sup>31</sup> M.L. Go, X. Wu, X.L. Liu; Chalcones: an update on cytotoxicand chemoprotective properties, *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12 (4), 481-499

<sup>32</sup> Nowakowska Z; A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones; *Eur J Med Chem.*; 2007, 42 (2);125-37.



Parmi les chalcones naturelles antipaludiques on note la licochalcone A qui est la plus célèbre pour cette activité. Isolée de la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*), elle est particulièrement active *in-vitro* avec une  $CI_{50} = 0.5 \mu\text{g/ml}$  sur les deux souches chloroquino-sensible (3D7) et résistante (Dd2) de *P.falciparum*<sup>33</sup>. De plus une étude *in-vivo* sur des souris infectées par *P.yoeii* montre que 100% d'inhibition de la parasitémie est obtenue après 3 à 6 jours de traitement<sup>34</sup>. L'isoliquiritigénine issue de la réglisse (figure 9) est actuellement testée comme traitement contre le cancer, ainsi que pour lutter contre la dépendance à la cocaïne. C'est un composé activateur des sirtuines.

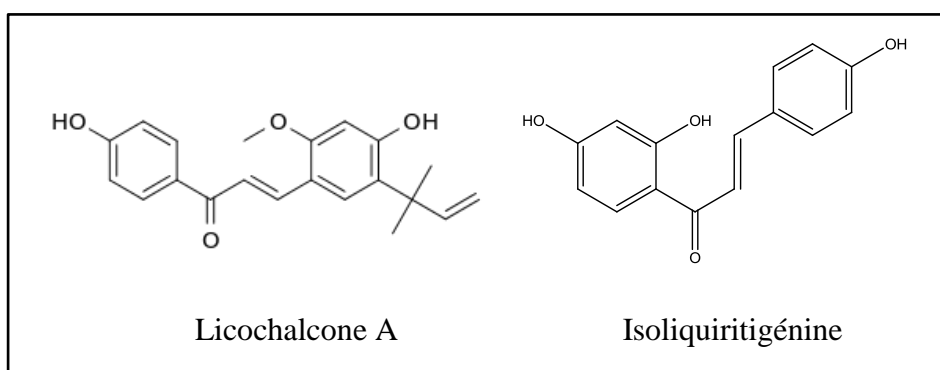


Figure 9 : Structure de Licochalcone A et isoliquiritigénine

Au niveau des laboratoires, il y'a beaucoup de recherches qui évaluent les propriétés thérapeutiques et biologiques des chalcones naturelles et de synthèse. Ces dernières ont des modifications au niveau des substitutions différentes à celles trouvant dans la nature.

### III. 1 Activités anti-oxydantes et antibactériennes des nouvelles chalcones

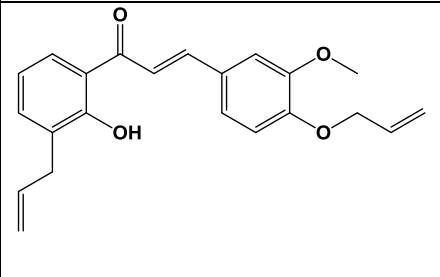
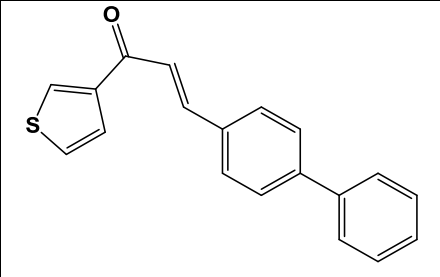
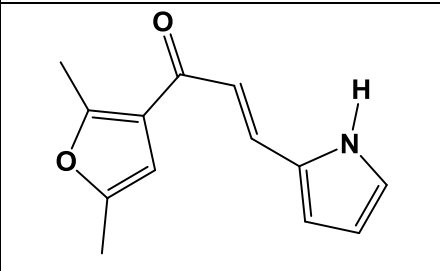
#### III.1.1 Activités anti-oxydantes

D'après C. G. Darshan Raj.et al<sup>19</sup>, et H.Abidi et al<sup>1</sup>, il a été remarqué que les chalcones synthétisés avec des dérivés du thiophénique ou furanique ou celles qui comprennent des substituants allylique présentent une très bonne activité vis-à-vis des radicaux libres.

<sup>33</sup> Ming Chen, Thor G. Theander, Soren Brogger Christensen, Lars Hviid, Lin Zhai, And Arsalan Kharazmil, Licochalcone A, A New Antimalarial Agent, Inhibits In Vitro Growth Of The Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum And Protects Mice From P. Yoelii Infection, *Antimicroblal Agents And Chemotherapy*, 1994, 1470-1475

<sup>34</sup> Kharazmi, A., M. Chen, T. Theander, and S. B. Christensen. Discovery of oxygenated chalcones as novel antimalarial agents. *Ann. Trop. Med. Parasitol*; 1997; 91; S91-S95.

Tableau n°1: Exemples de chalcones synthétisées inhibitrices des radicaux libres

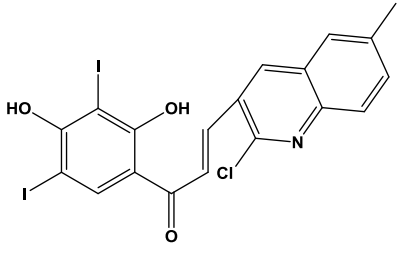
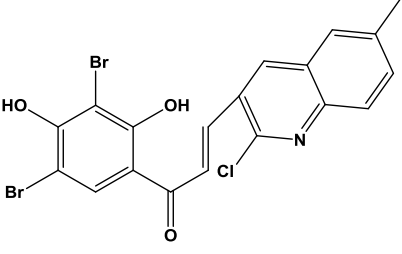
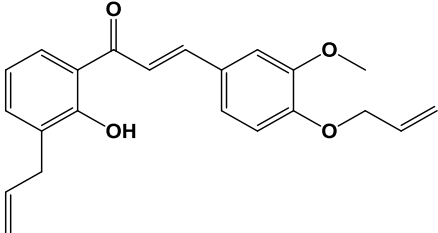
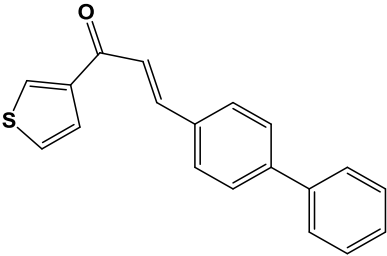
Composés	CI <sub>50</sub> [μM]	référence
	85	Trolox (CI <sub>50</sub> =36 μM)
	43.75	Quer (CI <sub>50</sub> =75μM)
	56	Quer (CI <sub>50</sub> =75μM)

### III.1.2 Activités antibactériennes

Il faut noter aussi que ces nouvelles chalcones synthétisées possèdent aussi une activité antibactérienne très intéressante vis-à-vis des espèces pathogènes suivantes: *B.subtillis*, *E.coli*, *X.citri*, *E.carotovora*, *S.aureus*, *P.aeruginasa*, *S.typphy*, *A.niger*, anti-*T.cruzi* et d'espèces de levure comme la *C.albicans*,<sup>(17,18, 19, 26,35)</sup>

<sup>35</sup> J.C. Aponte, M. Varestegui, E.Malaga, M.Zinic, M.Quiliano, A.J.Vaisberg, R.H. Gilman, G.B. Hammoud; Synthesis, cytotoxicity, and anti-*trypanosoma cruzi* activity of new chalcones; *J.Med.Chem*; 2008; 51,6230-6234

Tableau n°2: Activité antibactérienne de quelques nouvelles chalcones de synthèse

Chalcones	Activités antibactériennes	Zone d'inhibition (nm)
	E.coli	25
	X.citri	23
	E.carotovora	24
	B.subtilis	25
	E.coli	512
	B.subtilis	18
	S.aureus	17
	S.typhy	15

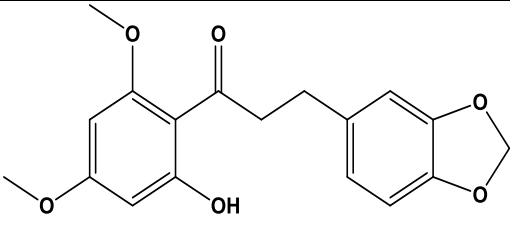
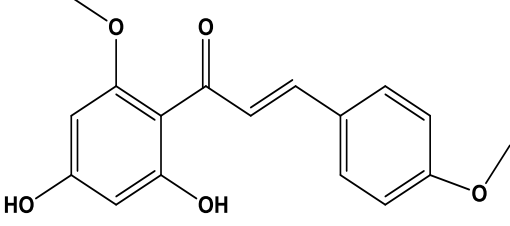
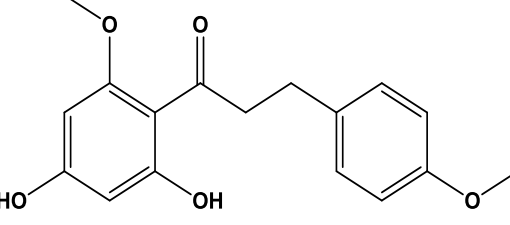
## III.2. Activités anticancéreuse et antiinflammatoire des chalcones

### III.2.1. Activités anticancéreuses

En 1995, Anto. R et al ont montré que certaines chalcones et hydrochalcones possédait une activité anticancéreuse envers des divers cellules cancérigènes étudiées.<sup>30</sup>

Le tableau suivant montre quelques exemples de ces composés étudiés et les cellules cancérigènes cibles.<sup>36</sup>

Tableau n°3 : Activité anti-cancéreuse des nouvelles chalcones synthétisées en réfèrent au 5FU

	Nom du cancer	Cellules	CI <sub>50</sub> (μM)
	Cancer du colon	H460	>197
	Cancer de la prostate	DU145	>197
	Cancer du sang (Leukeumia)	3T3	5.1
	Cancer du colon	HT-29	20.7
	Cancer du sein	MCF-7	10.9
	Cancer de la prostate	PC3	9.6
	Cancer du sang (Leukeumia)	K562	12.2

Après, différentes recherches ont été évalué pour évaluer de plus l'activité anticancéreuse des chalcones et leurs mécanismes avec des différentes tumeurs existantes. Dans ce qui suit, on a cité quelques exemples de ces mécanismes d'intervention des différentes chalcones naturelles ou synthétisés dans des exemples de tumeurs cancérigènes.

#### ➤ Chalcones et le cancer de la prostate

En 2000, Shimizu et al. ont montré que le 3-geranyl-2, 3', 4, 4'-tetrahydroxychalcone bloque efficacement le 5 $\alpha$ -réductase intracellulaire, qui est l'enzyme responsable de la transformation de la testostérone en 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone (DHT) intracellulaire et il agit comme un

<sup>36</sup> J.C. Aponte, M. Varestegui, E.Malaga, M.Zinic, M.Quiliano, A.J.Vaisberg, R.H. Gilman, G.B. Hammoud; Synthesis, cytotoxicity, and anti-*trypanosoma cruzi* activity of new chalcones; *Journal of Medicinal Chemistry*; 2008; 51,6230-6234.

important facteur de croissance et de développement de la glande prostatique<sup>37</sup>, ce qui empêche la prolifération de cancer de la prostate par l'arrêt de la biosynthèse des androgènes mâle<sup>38</sup> (figure 10)<sup>39</sup>.

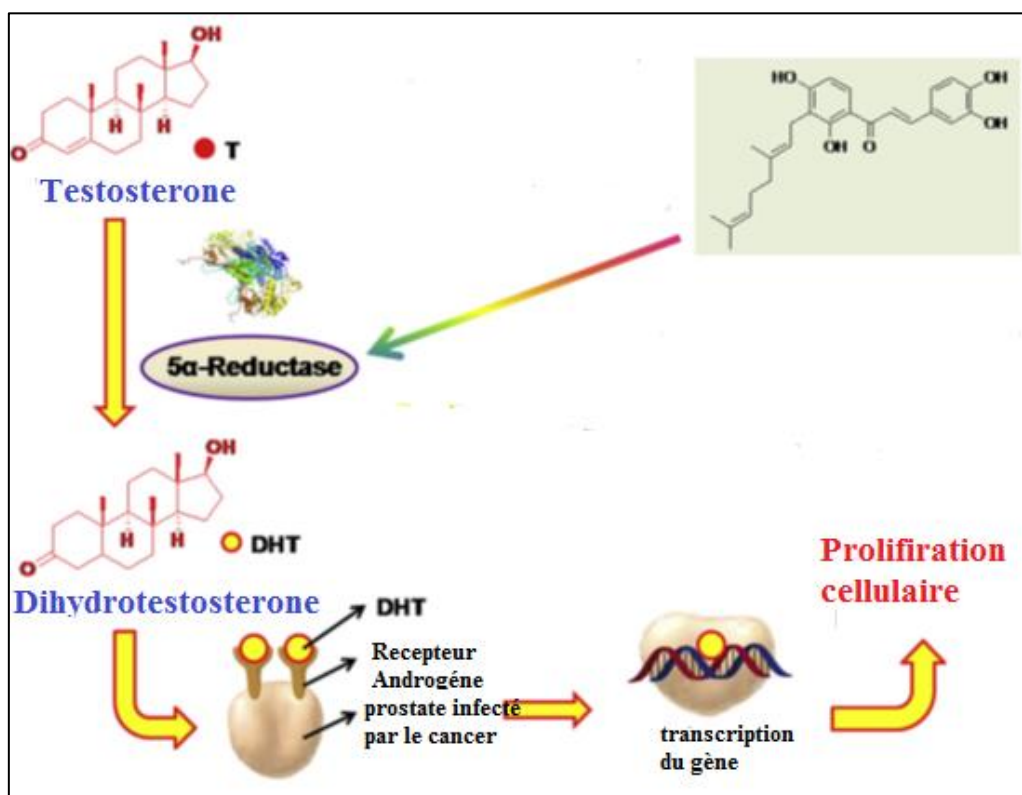


Figure 10 : 3-geranyl-2, 3', 4, 4'-tetrahydroxychalcone inhibiteur de 5- $\alpha$  reductase

### ➤ Chalcones et l'angiogénèse

En 2005, Zhu et al ont montré que le 2,4-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylchalcone (**I**) isolée de la fleur *Cleistocalyxoper-culatus* est un inhibiteur de VEGF (Vascular endothelial growth factor)<sup>40, 41, 42, 43</sup>.

<sup>37</sup> F. Azzouni, A. Godoy, Y. Li, J. Mohler; The 5 alpha-reductase isoenzyme family: a review of basic biology and their role in human diseases, *Advances in Urology*; 2012; 530121; pages1-18.

<sup>38</sup> K. Shimizu, R. Kondo, K. Sakai, S. Buabarn, U. Dilokkunanant; A geranylated chalcone with 5 $\alpha$ -reductase inhibitory properties from *Artocarpus incisus*; *Phytochemistry*; 2000; 54; 737-739.

<sup>39</sup> Debarshi Kar Mahapatra, Sanjay Kumar Bharti, Vivek Asati ; Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives ; *European Journal of Medicinal Chemistry*; 2015; 98 ; 69-114

<sup>40</sup> N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress; *Endocrine Reviews* ; 2004; 25 (4); 581-611.

En 2006, Lee et al ont étudié l'activité biologique in-vivo et in-vitro de 2-hydroxy-4-methoxychalcone (II) et ils ont conclu que cette molécule possède une activité antiangiogénèse.<sup>44</sup>

La figure ci-dessous montre le mécanisme d'intervention de ces deux chalcones dans l'inhibition de la VEGF.

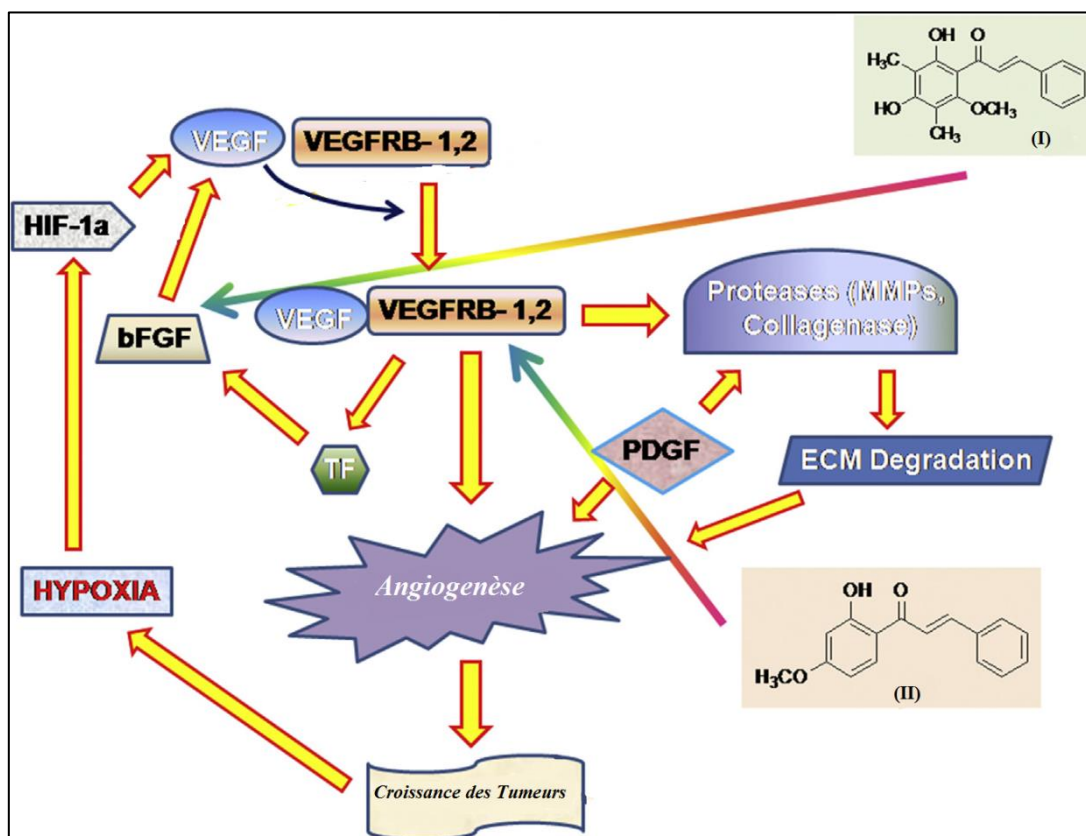


Figure 11 : Mécanisme d'intervention des chalcones (I) et (II) dans l'inhibition de la VEGF.

<sup>41</sup> A.M. Duffy, D.J. Bouchier-Hayes, J.H. Harmey, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF, in: Madame Curie Bioscience Database

<sup>42</sup> A. Hoeben, B. Landuyt, M.S. Highley, H. Wildiers, A.T. Van Oosterom, E.A. de Bruijn; Vascular endothelial growth factor and angiogenesis; *Pharmacological Reviews*; 2004; 56; 549-580.

<sup>43</sup> X. Zhu, B. Xie, J. Zhou, G. Feng, Z. Liu, X. Wei, F. Zhang, M. Liu, Y. Zeng; Blockade of vascular endothelial growth factor receptor signal pathway and antitumor activity of on-III (2',4'- dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone), a component from chinese herbal medicine; *Molecular Pharmacology*; 2005 ; 67 (5); 1444-1450.

<sup>44</sup> Y.S. Lee, S.S. Lim, K.H. Shin, Y.S. Kim, K. Ohuchi, S.H. Jung; Anti-angiogenic and anti-tumor activities of 2'-Hydroxy-4'-methoxychalcone; *Biological and Pharmaceutical Bulletin*; 2006; 29 (5); 1028-1031.

➤ **Chalcones et la dégradation de p53**

La protéine p53 joue un rôle important dans l'activité anticancéreuse et la médiation de la réparation de l'ADN, l'apoptose, l'inhibition de l'angiogenèse, la stabilité du génome et l'activation des gènes. La p53 est dégradé par divers composés comme MDM2, Sirtuin-1,...etc. L'inhibition de la dégradation de cette protéine est une stratégie importante pour la thérapie anti-cancer.<sup>45, 46</sup>

En 2001, Stoll et al ont synthétisé une série de chalcone et ont testé leurs activité inhibitrice de MDM2 et ils ont trouvé que le produit (III) (figure 12) possède la plus intéressante activité inhibitrice par rapport aux autre produits synthétisés<sup>47</sup>.

En 2003, le groupe de Kumar a continué la recherche des nouvelles chalcones inhibitrices de de MDM2 et ils ont synthétisé un chalcone boronique qui a prouvé cette activité cherché.<sup>48</sup>

En 2008, Kahyo et al ont montré que la chalcone (IV) (figure 13) possède une activité inhibitrice de l'acétylation du Sirtuin-1(SIRT1).

---

<sup>45</sup> J.T. Zilfou, S.W. Lowe; Tumor suppressive functions of p53, Cold Spring Harb; *Perspectives Biology* ; 2009; 1 (5); a001883.

<sup>46</sup> D.P. Lane, C.F. Cheok, S. Lain; p53-based Cancer Therapy, Cold Spring Harb. *Perspectives Biology* ; 2010; 2 (9) ; a001222.

<sup>47</sup> R. Stoll, C. Renner, S. Hansen, S. Palme, C. Klein, A. Belling, W. Zeslawski, M. Kamionka, T. Rehm, P. Muhlhahn, R. Schumacher, F. Hesse, B. Kaluza, W. Voelter, R.A. Engh, T.A. Holak; Chalcone derivatives antagonize nteractions between the human oncoprotein MDM2 and p53; *Biochemistry*; 2001 ; 40; 336-344.

<sup>48</sup> S.K. Kumar, E. Hager, C. Pettit, H. Gurulingappa, N.E. Davidson, S.R. Khan; Design, synthesis, and evaluation of novel boronic-chalcone derivatives as antitumor agents, *Journal of Medicinal Chemistry*; 2003; 46; 2813-2815.

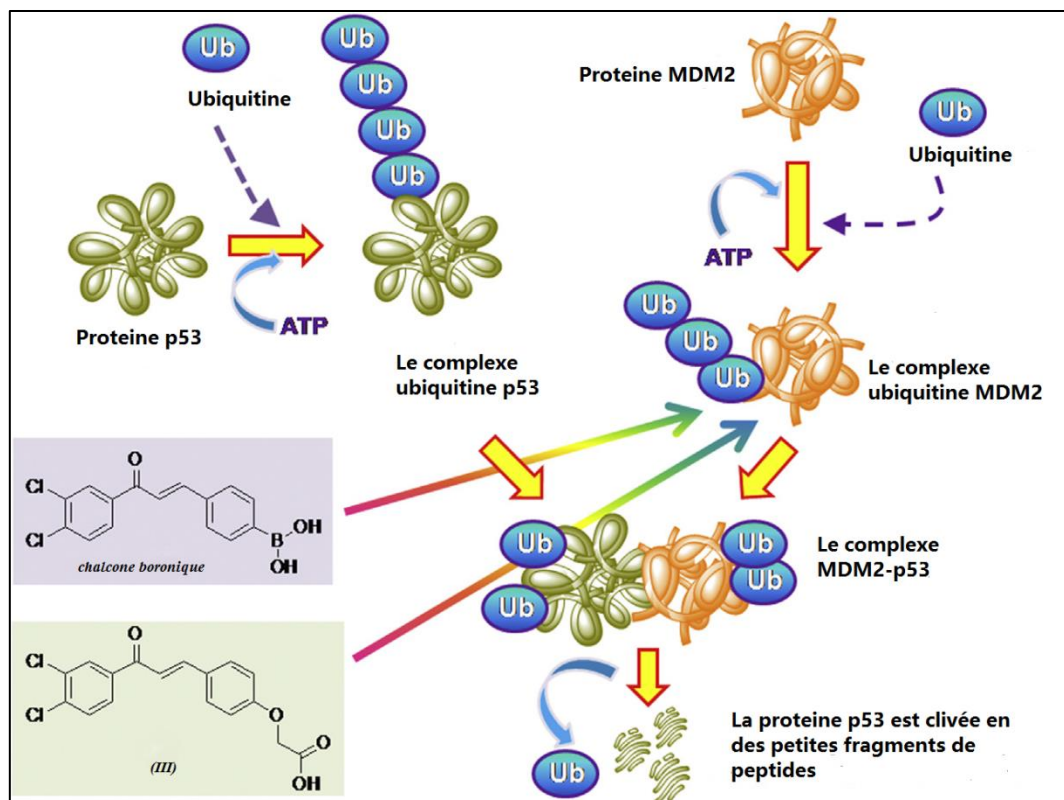


Figure 12 : Interruption du complexe p53-MDM2 par les chalcones

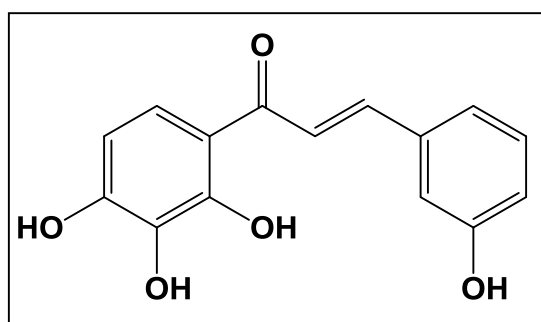


Figure 13: le 3, 2, 3',4-tetrahydrochalcone (produit IV)

#### ➤ Chalcone et le cancer du col de l'utérus

En 2012, Sashidhara et al. ont testé l'activité anticancéreuse d'un nouveau produit (V) résultant de l'union de la coumarine (VI) la chalcone (VII) sur les cellules C33A (figure 14). Alors c'est montré que ce nouveau produit possède une excellente activité anticancéreuse *in-vivo* sur des xénogreffes de tumeurs humaines chez des souris SCID portant les cellules cancéreuses humaines HeLa par rapport au composé de référence adriamycine.<sup>49</sup>

<sup>49</sup> K.V. Sashidhara, A. Kumar, M. Kumar, J. Sarkar, S.K. Sinha; WO017454A1; 2012; Coumarin-chalcones as anticancer agents; 1



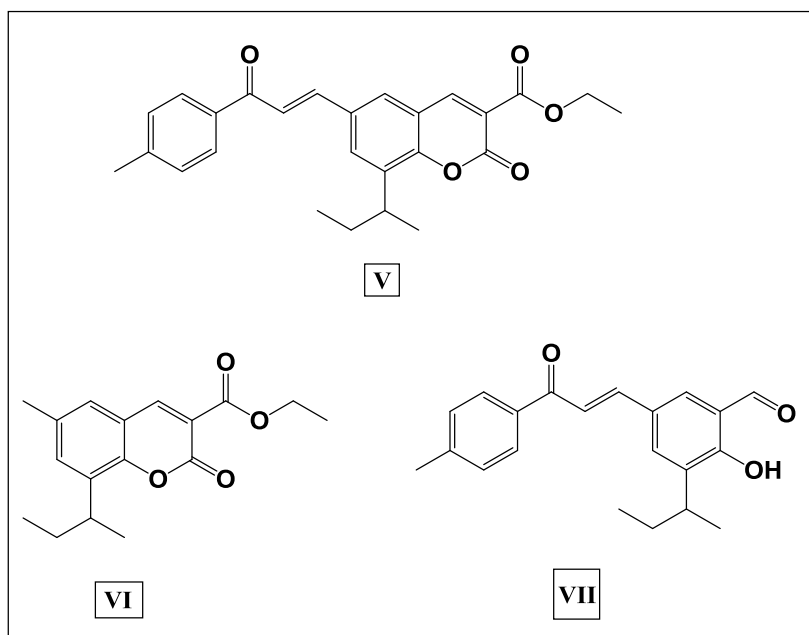


Figure 14: Structures de la coumarine (VI) et la chalcone (VII) points de départ d'une nouvelle chalcone-coumarine inhibitrice du cancer de col de l'utérus (V)

#### ➤ Chalcones et d'autres intérêts anticancéreux

En 2012, et dans le brevet WO2012013725 A1 on note une invention concernant les dérivés vinyliques des chalcones (figure 15) et leurs utilisations dans le traitement ou la prévention du cancer, particulièrement dans leucémie.<sup>50</sup>

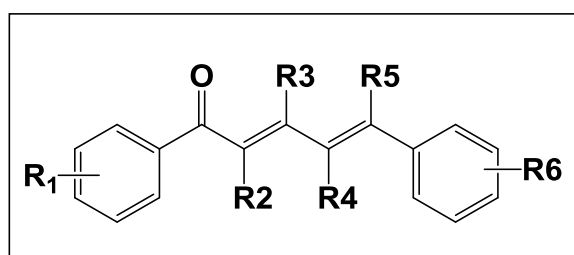


Figure 15: Structure générale des chalcones vinyliques

<sup>50</sup> Medizinische Universite at Wien assignee; Patent WO2012013725 A1; 2012;.Vinylogous chalcone derivatives and their medical use;

### III.2.2. Activité anti-inflammatoire

#### ➤ Chalcone comme inhibiteur de NFκ-B

Le cancer est régulé par un certain nombre de gènes, qui sont à leur tour régulés par des facteurs de transcription. Parmi ces facteurs, on note le NFκ-B qui règle plus que 400 gènes impliqués dans l'inflammation des cellules survivantes, la prolifération cellulaire, l'invasion, l'angiogenèse, l'apoptose, le cycle cellulaire et la métastase. Ce qui implique qu'une régulation incorrecte de ce dernier peut provoquer une maladie inflammatoire, infection virale et le cancer.<sup>51</sup>

En 2011, Yadav et al. ont montré que certaines chalcones naturelles et synthétiques sont des inhibiteurs de l'activation de NFκ-B comme : 2',5'-dihydroxy-4-chloro-dihydrochalcone; Brousochalcone A; 3, 4, 5-triméthoxy-4'-fluorochalcone, Xanthoangelol D; 4-Hydroxylonchocarpin; Flavokawain A, B; 2'-hydroxychalcone; Cardamomin; Isoliquiritigenin; 2'-hydroxy-3-bromo-6'-méthoxychalcone; 2'-méthoxy-3,4-dichlorochalcone; Butein; Cardamonin; Hydroxysafflor yellow A; 2',4',6'-tris(méthoxyméthoxy) chalcone; 3-hydroxy-4,3',4',5'tetraméthoxychalcone; Xanthohumol; et l'Isoliquiritigenin 2'-méthyl éther.<sup>46</sup>

En 2014, R. Arianingrum a regroupé les cibles anticancéreuses et anti-inflammatoires de quelques chalcones naturelles et synthétiques dans le tableau ci-dessous qui résume tout ce qui est cité dans le paragraphe précédent.<sup>52</sup>

---

<sup>51</sup> Vivek R. Yadav, Sahdeo Prasad, Bokyoung Sung, and Bharat B. Aggarwal; The Role of Chalcones in Suppression of NF-κB-Mediated Inflammation and Cancer; *International Immunopharmacology*; 2011; 11 (3); 295–309.

<sup>52</sup> Retno Arianingrum ; Chalcones: The Promising Compounds To Provide New Ways For Cancer Treatment; *Proceeding Of International Conference On Research, Implementation And Education Of Mathematics And Sciences, Yogyakarta State University*, 18-20 may 2014

Tableau n°4: cibles anticancéreuses et anti-inflammatoires de quelques chalcones naturelles et synthétiques

chalcones	cibles
2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone	NF-κB, KDR tyrosine kinase, Bim, Bcl-2, caspase-3, erbB-2 receptor, PARP, TNF-α, IL-6, IL-1β, iNOS
4-Hydroxylonchocarpine	NF-κB, MMP-2, iNOS
Brousochalcone A	NF-κB, iNOS, PKC, NADPH oxidase
Butei	NF-κB IAP2, Bcl-2, Bcl-xL, cyclin D1, c-Myc, COX-2, MMP-9, DR5, STAT3, ICAM-1, Bax, caspase-3, EGFR, TIMP-1, E-selectin, iNOS, JNK, IL-8, MMP-7, Mcl-1, hTERT, ATM, Chk1/2, cdc25C, Cdc2, Sp-1, VEGF, CXCR4
Cardamomine	NF-κB, TNF-α, COX-2, Akt, DR4/5, Bcl-xL, CHOP
Cardamonine	NF-κB, COX-1/2, TNF-α, iNOS, mTOR, P70S6K, 4EBP1
Flavokawaine A	NF-κB, Bax, Bcl-xL, XIAP, survivin, p27, p27, CDK1/2, Myt1, Wee1, cyclin B1, cdc25C
Flavokawaine B	NF-κB, DR5, Bim, Puma, survivin, GADD153, PARP, Bid, caspase-8, Bak, cytochrome C, Bcl-2, iNOS, COX-2, TNF-α, caspase-3/9, Bax, XIAP
Hydroxysafflor jaune A	NF-κB, TNF-α, ICAM-1, IL-1β, IL-6, IL-10, VEGF, p53, Bcl-2/ Bax ratio, HIF-1α, VHL, ET-1, iNOS
Isobavachalcone	caspases -3/9, Bax, A
Isoliquiritigenine	LOX-5/12, caspase-3/8/9, p53, p21, Fas/APO-1 receptor, FasL, Bax, NOXA, NF-κB, Bcl-xL, cIAP-1/2, COX-2, iNOS, cytochrome C, PARP, quinone reductase, GADD153 ICAM-1, VCAM-1, Bcl-2, MMP-2, ATM, Chk2, topoisomerase II, HO-1, IL-1β, TNF-α, cyclin B1/D1/E, CDK4, p27, cdc25c, IRF3, IP-10, RANTES, Nrf2, mTOR, VEGF, TLR4, uPA, MMP-9, TIMP-1
Kanzonol C	MMP-2
Licochalcone A	NF-κB, COX-1/2, Bax, Bcl-2, STAT3, CD31, Ki-67, VEGFR2, iNOS, CCL2/MCP-1, CXCL1/KC, mTOR, TNFα, topoisomerase-1, cyclin B1/D1/E, Rb, cdc2, CDK4/6
Naringenin chalcone	IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, INF-γ, TNF-α, MCP-1, p38 MAPK
Xanthoangelol	NF-κB, caspases -3/9, VEGF, thromboxane B2, ET-1
Xanthohumol	NF-κB, Bax, p53, Akt, survivin, Bcl-xL, XIAP, cIAP1/2, cyclin D1, c-myc, VEGF, PARP, caspase-3/7/8/9, Bcl-2, Keap1, E-cadherin, TLR4, MD2, STAT1α, IRF-1, IL-1β, p21, p53, Bcr- Abl, IL-2, IFN-γ, MCP-1, GRP78, Hsp70, PERK, ATF6, CHOP, Mcl-1, XBP-1, IL-8, IL-12

Dans le cadre de ma thèse, nous sommes plus intéressés par l'activité antioxydante et anticancéreuse des nouvelles chalcones.

## **Chapitre II: Résultats Et Discussion Chimique**

## I. Synthèse des analogues de chalcones

Comme décrit dans le chapitre précédent, la structure chimique des chalcones, en général, est formée de deux noyaux aromatiques liés entre eux par une chaîne carbonée (schéma 2). Notre but est de synthétiser des analogues de ces composés en remplaçant le noyau aromatique (A) par une coumarine liée à un benzène (B) par une chaîne carbonée plus longue contenant deux doubles liaisons tout en substituant les deux parties aromatiques de la molécule.

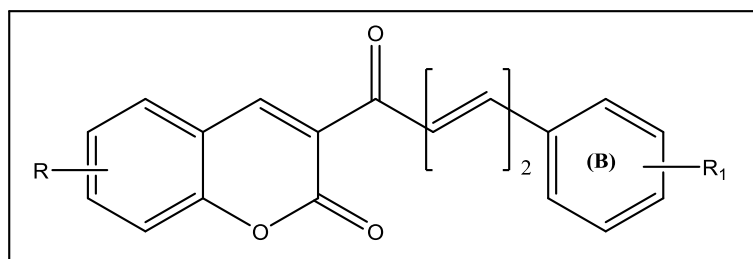


Schéma2 : Structure générale des produits synthétisés

### I.1. Préparation des produits de départ

#### I.1.1. Synthèse des dérivés de 3-acétyl coumarine

La synthèse des dérivés coumariniques a présenté un intérêt dans le laboratoire notamment en vue de l'activité biologique qui y est liée.<sup>6,53,54</sup>

En fait, il a été montré que les coumarines ont diverses activités biologiques comme : inhibiteur de monoamine oxidase A et B (hMAO-A et h-MAO-B)<sup>55</sup>, inhibiteur de tyrosinase<sup>56</sup>; antioxydant<sup>57</sup>.....

<sup>53</sup> Bana, E., Sibille, E., Valente, S., Cerella, C., Chaimbault, P., Kirsch, G., Dicato, M., Diederich, M., Bagrel, D.; A novel coumarin-quinone derivative SV37 inhibits CDC25 phosphatases, impairs proliferation, and induces cell death; *Molecular Carcinogenesis*; 2015; doi:10.1002/mc.22094

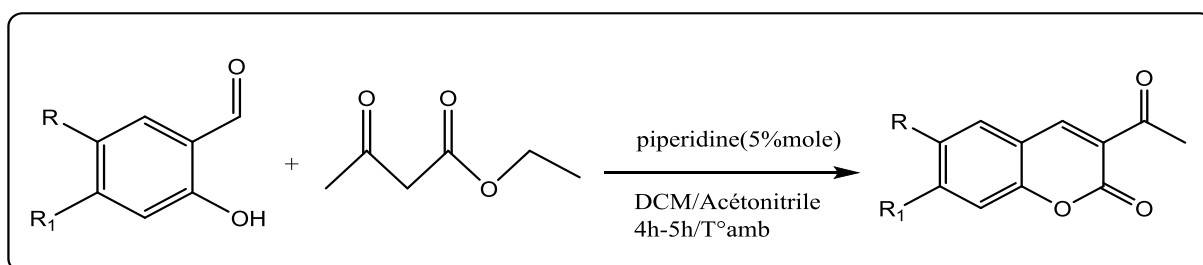
<sup>54</sup> Valente, S., Xu, Z., Bana, E., Zwergel, C., Mai, A., Jacob, C., Meiser, P., Bagrel, D., Silva, A.M.S., Kirsch, G., Reactivity of 4-Vinyl-2 H -1-benzopyran-2-ones in Diels-Alder Cycloaddition Reactions: Access to Coumarin-Based Polycycles with Cdc25 Phosphatase-Inhibiting Activity; *European Journal of Organic Chemistry*; 2013, 2869–2877. doi:10.1002/ejoc.201201736.

<sup>55</sup> Daniela Secci, Simone Carradori, Adriana Bolasco, Paola Chimenti, Matilde Yáñez Francesco Ortuso, Stefano Alcaro; Synthesis and selective human monoamine oxidase inhibition of 3-carbonyl,3-acyl, and 3-carboxyhydrazido coumarin derivatives; *European Journal of Medicinal Chemistry*; 2011; 46; 4846-4852.

<sup>56</sup> Jinbing Liu, Fengyan Wu, Lingjuan Chen, Liangzhong Zhao, Zibing Zhao, Min Wang, Sulan Lei; Biological evaluation of coumarin derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors; *Food Chemistry*; 2012; 135; 2872–2878.

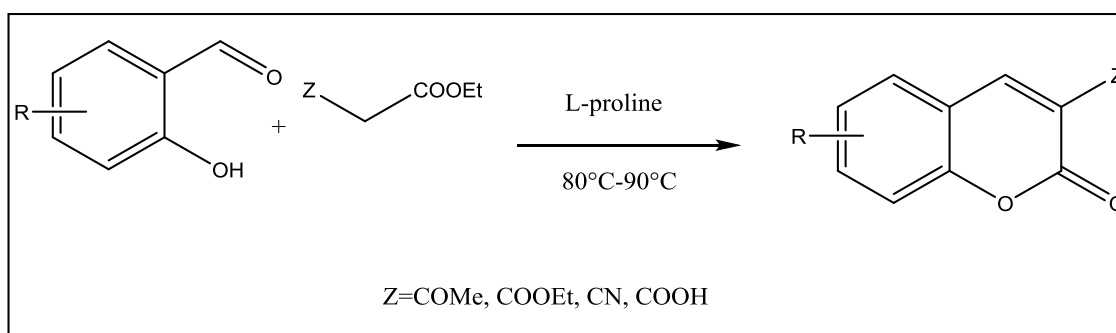
Pour cela ; des méthodes de synthèses ont été développées dans le but d'obtenir de nouvelles molécules coumariniques substitués.

Pour la synthèse de coumarine, la réaction de Knoevenagel<sup>58</sup> reste la plus utilisée par les chimistes. Cette réaction qui était découverte par Knoevenagel en 1894, qui permet l'accès à l'acétyl-3-coumarine par condensation de l'aldéhyde salicylique avec l'acétoacétate d'éthyle (Schéma 3).



**Schéma 3 : Synthèse des dérivés de 3-acétyl coumarines à partir du 2-hydroxybenzaldéhyde**

En 2007, un groupe chinois a essayé de catalyser la réaction de synthèse de coumarine en utilisant le L-Proline comme un catalyseur de réaction et sans solvant de réaction<sup>59</sup>.



**Schéma 4 : Réaction de synthèse des dérivés de coumarine avec le L-proline en absence du solvant**

La synthèse des 3-acétylcoumarines se fait souvent par l'application de la réaction de Knoevenagel. En 2012, une nouvelle approche est fait par Wong *et al* afin d'appliquer la

<sup>57</sup> Wafaa S. Hamama, Maged A. Berghot, Eman A. Baz, and Moustafa A. Gouda; Synthesis and Antioxidant Evaluation of Some New 3-Substituted Coumarins; *Archive Der Pharmazie Chemistry in Life Sciences*; 2011; 344 ; 710–718.

<sup>58</sup> Emil Knoevenagel ; Condensation von Malonsäure mit Aromatiashen Aldehyden durch Ammoniak und Amine ; *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* ; 1898; 31(3); 2596–2619.*doi:10.1002/cber.18980310308*.

<sup>59</sup> Karade, Nandkishor.N; Gampawar,Sumit.V; Shinde,Sandeep.V, Jadhav,Wamanrao.N; 16Proline Catalyzed Solvent-Free Knoevenagel Condensation for synthesis of 3-substituted coumarins; *Chinese Journal of Chemistry*; 2007; 25; 1686-1689.

réaction de Pechmann<sup>60</sup> pour aboutir au 3-acétylcoumarines. Cependant, les résultats obtenus ont confirmé que ces composés ne peuvent se faire qu'avec la réaction de Knoevenagel<sup>61</sup>, par ailleurs la réaction de Pechmann mène aux dérivés 7-hydroxycoumarines<sup>11</sup>.

Nous avons utilisé dans notre cas cette méthode de synthèse pour former les 3-acétylcoumarines substitués.

Dans le cas des travaux de cette thèse, on a utilisé cinq dérivés d'aldéhydes salicyliques, afin d'avoir cinq dérivés de 3-acétylcoumarines différentes.

Le tableau ci-dessous regroupe les rendements de leurs réactions de synthèse ainsi leurs points de fusion.

Tableau n°5 : Rendement de la réaction de synthèse des dérivés coumarinique et leurs P<sub>f</sub>

	1a	1b	1c	1d	1e
R	H	OMe	Br	Cl	H
R1	H	H	H	H	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>
%Rdt	52%	34%	47%	22%	62%
P <sub>f</sub> (C)	117-119	180-183	223	207-208.1	154

### I.1.2. Synthèse des dérivés de cinnamaldehydes

Les cinnamaldehydes sont des substances étudiées depuis longtemps. De nombreuses cinnamaldehydes sont accessibles commercialement par contre d'autres sont accessibles à partir des acides cinnamiques par réduction ou bien par oxydation des alcools correspondants.

Dans ce contexte, des diverses méthodes ont été développées.

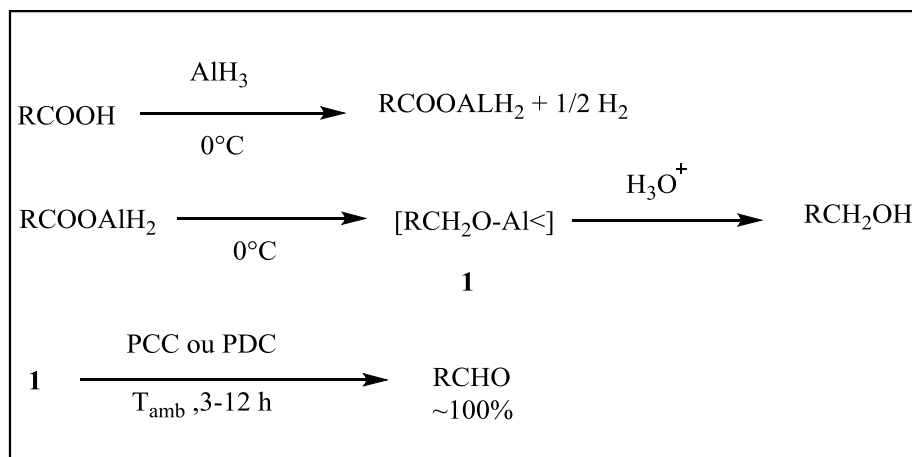
En 1987, il y'a eu la synthèse les aldéhydes par oxydation sélective des alcools primaire de même nature<sup>62</sup>.

<sup>60</sup> H. v. Pechmann ; Neue Bildungsweise der Cumarine. Synthese des Daphnetins ; *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* ; 1884 ; 17 (1); 929–936.doi:10.1002/cber.188401701248.

<sup>61</sup> Kok Tong Wong& Norazah Basar; Coumarins via Knoevenagel condensation reaction (KCR) and Pechmann Condensation reaction; *Journal Teknologi*, 2012; 57 ; suppl1; 83-98.

<sup>62</sup> Pier Lucio Anelli, Carlo Biffi, Fernando Montanari, and Silvio Quici ; Fast and Selective Oxidation of Primary Alcohols to Aldehydes or to Carboxylic Acids and of Secondary Alcohols to Ketones Mediated by Oxoammonium Salts under Two-Phase Conditions; *Journal of Organic Chemistry*.; 1987 ; 52 (12), 2559-2562

En 1998, des études chimiques ont été faites sur la réaction d'oxydation de l'intermédiaire alkoxyalumium (schéma 5) avec le chlorochromate pyridinium ou le pyridinium dichromate dans le but d'obtenir l'aldéhyde à partir d'acide carboxylique.<sup>63</sup>



**Schéma 5 : Oxydation de l'intermédiaire alkoxyalumium avec le chlorochromate pyridinium ou le pyridinium dichromate**

L'étude de la réaction d'oxydation des alcools est ensuite devenue un sujet intéressant pour les chimistes. En fait, en 2003 et 2005 deux groupes de chimistes différents ont étudié l'oxydation des alcools conjugués en utilisant  $\text{KMnO}_4$  ou  $\text{MnO}_2$  pour obtenir les aldéhydes correspondants.<sup>64,65</sup>

En 2014, il y'a eu une innovation dans la méthode d'oxydation des alcools par deux groupes différents.

En fait, Parlett et *al*, ont utilisé l'alumine greffée sur SB-15 comme un support de haute performance de palladium comme un catalyseur sélectif dans la réaction des alcools

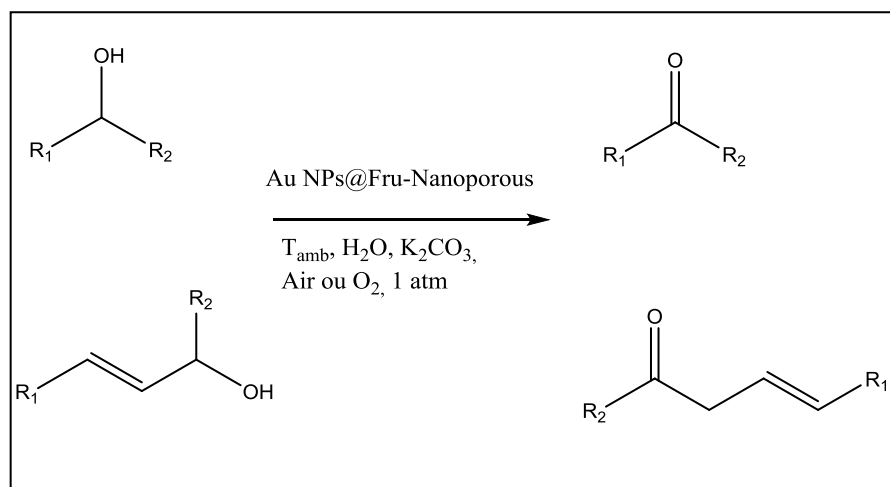
<sup>63</sup> Jin Soon Cha, Jong Mi Kim, Joong Hyun Chun, Oh Oun Kwon and Jae Cheol Lee; Conversion of carboxylic acids into aldehydes by oxidation of alkoxyalumium intermediate with pyridinium chloromate or pyridinium dichromate; *Bulletin of Korean Chemical Society*; 1998; 19 (7); 730-732

<sup>64</sup> Ji-Dong Lou, Miao Wang 1, Li-Yun Zhu, Zhi-Gang Fang; Solvent free oxidation of alcohols catalyzed by  $\text{KMnO}_4$  adsorbed on Kieselguhr; *Catalysis Communications*; 2003; 4; 647-649.

<sup>65</sup> Tapan.K.Lai, Julie Banerji, Asima Chatterjee and Bidyut Basak; Dielectric activation of  $\text{MnO}_2$ : Part1-Oxydation of conjugated unsaturated alcohols; *Indian Journal of chemistry*; 2005; 44B; 1309-1311.



cinnamique.<sup>66</sup> D'autre part, Mahyari *et al* ont étudié la sélectivité des nanoparticules d'or dans la synthèse des aldéhydes cinnamiques selon le schéma réactionnel suivant<sup>67</sup> :



**Schéma 6: Oxydation sélective des alcools avec NPs@Fru-Nps**

D'autres équipes de chercheurs ont étudié, en parallèle, la réaction de réduction des chlorures d'acides en aldéhyde par Sm(0)/Bu<sub>3</sub>P en aldéhyde correspondant qui a pu donner un rendement de 94% d'aldéhyde cinnamique.<sup>68</sup>

La réduction des esters α,β-insaturé par un l'injection de flux du DIBAL-H dans le milieu réactionnel<sup>69</sup> a permis la synthèse des cinnamaldehydes.

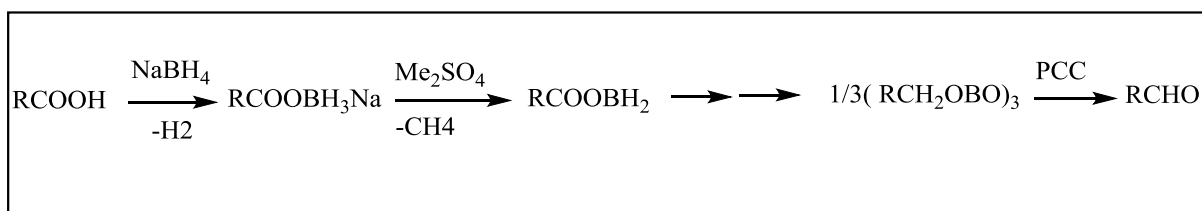
En 1999, Jin Soon Cha *et al* ont étudié la réduction des acides carboxyliques avec le NaBH<sub>4</sub> et le chlorochromate de pyridinium (PCC) dans une séquence réduction-oxydation.<sup>70</sup>

<sup>66</sup> Christopher M.A. Parletta, Lee J. Durndella, Andreia Machadoa, Giannantonio Cibinc, Duncan W. Bruceb, Nicole S. Hondowd, Karen Wilsonc, Adam F. Leea,f; Alumina-grafted SBA-15 as a high performance support for Pd-catalysed cinnamyl alcohol selective oxidation; *Catalysis Today*; 2014; 229 ; 46–55

<sup>67</sup> Mojtaba Mahyari, Ahmad Shaabani, Mohammad Behbahani and Akbar Bagheri; Thiol-functionalized fructose-derived nanoporous carbon as a support for gold nanoparticles and its application for aerobic oxidation of alcohols in water; *Applied Organometallic Chemistry*, 2014; 28; 576–583.

<sup>68</sup> Xueshun Jia,a, Xiaotao Liu,a Jian Li,a Peichao Zhaoa and Yongmin Zhangb,c; A general and efficient reduction of acyl chlorides to aldehydes by Sm(0)/Bu<sub>3</sub>P; *Tetrahedron Letters* ; 2007 ; 48 ; 971–974.

<sup>69</sup> Masahito Yoshida, Hiroyuki Otaka and Takayuki; An Efficient Partial Reduction of α,β-Unsaturated Esters Using DIBAL-H in Flow ; *European Journal of Organic Chemistry*; 2014 ; 6010–6016



**Schéma 7: Réaction de réduction des acides carboxyliques par NaBH<sub>4</sub> et PCC**

On note que toutes ces méthodes de réactions étudiées n'ont pas fait un changement dans les rendements des cinnamaldehydes qui était toujours  $\leq 94\%$ .

Dans notre cas, nous avons retenu deux autres méthodes de synthèse : la première méthode consiste à appliquer la réaction de Wittig<sup>71</sup>. Dans ce cas, le réactif de Wittig est préparé à partir du chloroacétaldehyde puis condensé sur le benzaldéhyde<sup>72</sup> (Schéma 8). La seconde consiste à appliquer la réaction de réduction d'un acide cinnamique synthétisé à partir d'un benzaldéhyde convenable<sup>73</sup>.

<sup>70</sup> Jin Soon Cha, Dae Yon Lee And Jong Mi Kim; Reductive Oxidation Of Carboxylic Acids To Aldehydes With Sodium Borohydride And Pyridinium Chlorochromate ; *Organic Preparations And Procedures International* ; 1999; 31 (6); 694-697.

<sup>71</sup> Wittig, G., Schollkopf, U., Über Triphenyl-phosphinmethylene als olefinbildende Reagenzien (I. Mitteil.); *Chemische Berichte*; 1954. 87, 1318–1330. doi:10.1002/cber.19540870919

<sup>72</sup> Abraham A. Wubea, Antje Hüfner, Christina Thomaschitz, Martina Blunder, Manfred Kollroser, Rudolf Bauer, Franz Bucar ; Design, synthesis and antimycobacterial activities of 1-methyl-2-alkenyl-4(1H)-quinolones ; *Bioorganic and Medicinal Chemistry*; 2011; 19 ; 567–579

<sup>73</sup> Vedernikov, A.I., Gromov, S.P., Convenient Method for the Preparation of Crown Ether Cinnamaldehydes; *Synthesis (Stuttg)*; 2001; 0889–0892. doi:10.1055/s-2001-13417

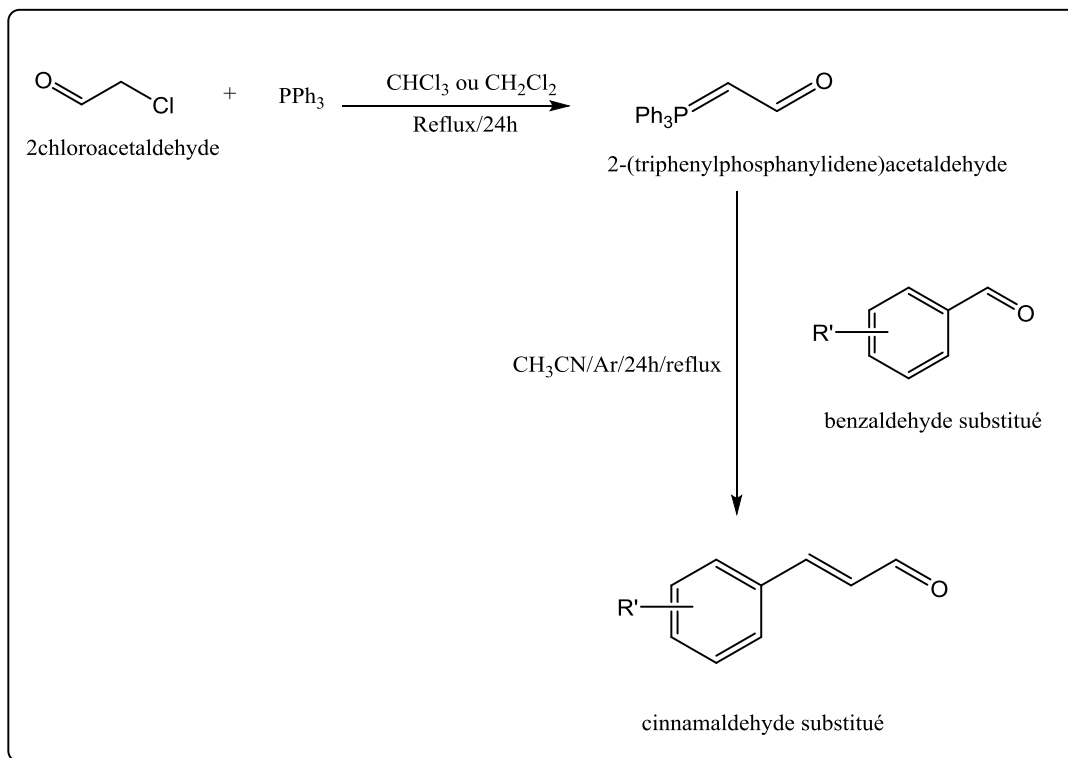
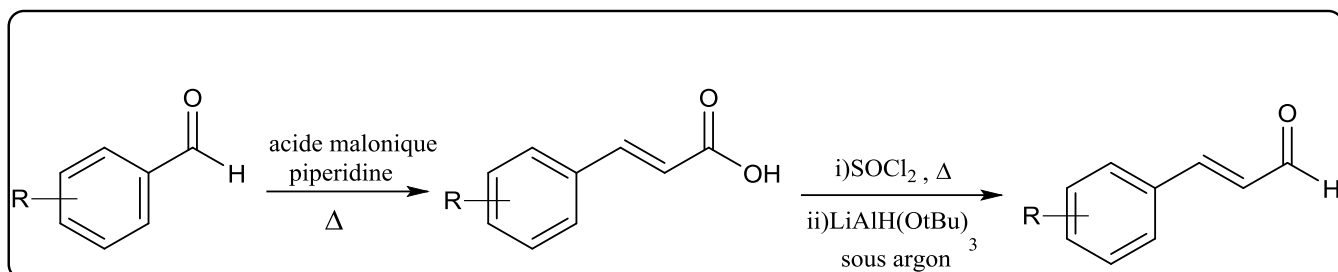
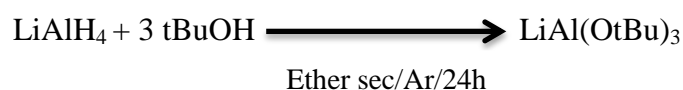
Première mode de synthèseSchéma 8: Réaction de synthèse des dérivés de cinnamaldehydes par la réaction de Wittig<sup>26</sup>➤ Deuxième mode de synthèseSchéma 9 : Réaction de synthèse des dérivés de cinnamaldehyde par réduction de leurs analogues acides<sup>24</sup>

Tableau n°6 : Comparaison des rendements des méthodes de la synthèse des dérivés de cynamaldéhydes

Produits	R	Aspect physique	P <sub>f</sub> (°C)	Rendement Méthode 1 (Réaction de Wittig)	Rendement Méthode 2 (Réaction de réduction)
cin1	4-OMe	Liquide rouge	-	10%	3%
cin2	3-OMe	liquide jaune	-	12%	2%
cin3	4-Cl	solide jaune orangé	62	8%	6%
cin4	2,4-Me	Solide crème	-	5%	2%
cin5	2,4-OMe	Solide jaune orangé	64	75%	80%
cin6	4-F	solide crème	-	6%	3%
cin7	2,5-OMe	Liquide jaune	-	10%	4%
cin8	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Solide jaune	58	11%	13%

Selon, ces résultats, il apparait que certains dérivés synthétisés par la première méthode de synthèse ont donnés un meilleur rendement par rapport à ceux synthétisés par la deuxième méthode. Ce ci qui est peut être dû à la qualité du réducteur utilisé dans la réaction. Ce réactif a été synthétisé au laboratoire:



## I. 2 Aldolisation pour l'obtention des chalcones

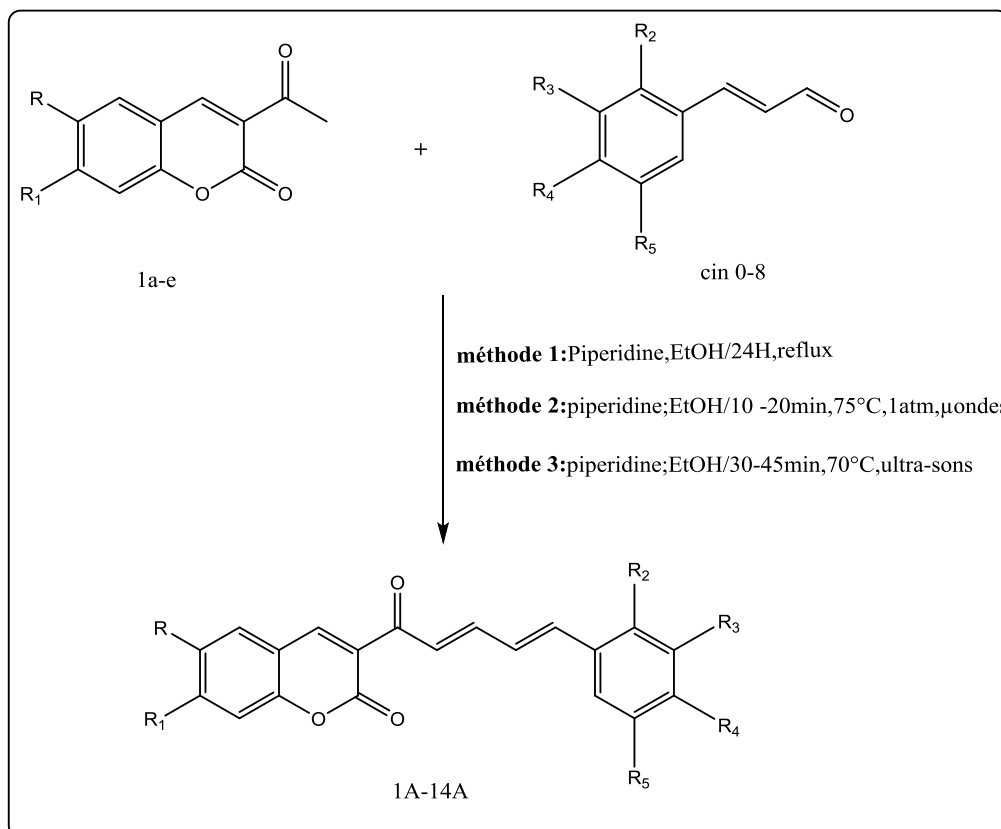
L'aldolisation est une réaction classiquement employée en chimie organique et de nombreux ouvrages lui ont été concernés<sup>74, 75, 76</sup>.

<sup>74</sup> Wade, L. G.; Upper Saddle River, Prentice Hall, *Organic Chemistry*; 2005 ; 1056-1066

<sup>75</sup> Smith, M. B.; March, J., ; *Advanced Organic Chemistry*; John wiley and sons; USA 2001; 1218–1223

<sup>76</sup> Mahrwald, R.; *Modern Aldol Reactions*; Volumes 1 et 2, 2004, pages : 1218–1223

Cette réaction peut être réalisée en milieu acide ou en milieu basique suivant par une crotonisation (élimination d'une molécule d'eau) elle mène aux dérivés C=O,  $\alpha,\beta$ -insaturés. On a appliqué cette réaction de synthèse sur nos 3-acétylcoumarines et cinnamaldehydes substitués pour arriver aux chalcones désirés selon le schéma 10.



**Schéma 10: Réaction de synthèse des analogues de chalcones par 3 méthodes différentes**

La synthèse des dérivés de la série des analogues de chalcones a été réalisée par trois méthodes différentes dans le but de savoir laquelle nous mène à des rendements importants dans un temps plus court que les autres.

On a fait la synthèse classique en réagissant les deux réactifs avec la pipéridine et sous reflux pendant 24h. On a refait la même réaction avec les mêmes quantités mais sous irradiation micro-ondes. Un dernier essai s'est fait sous irradiation par ultra-sons mais à température plus élevée.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau n°7 : Optimisation de la synthèse des produits par 3 méthodes

			Classique (reflux)		Micro-ondes (reflux)		Ultrasons		
	R	R <sub>1</sub>	Temps	Rdt%	Temps	Rdt%	Temps	T° (°C)	Rdt%
1A	H	H	24h	52	90 min	49	30 min	70	56
2A	OMe	H	24h	24	95 min	37	45 min	45	68
3A	Br	H	24h	54	90 min	73	30 min	30	78
4A	Cl	H	24h	70	92 min	72	30 min	30	73
5A	H	N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )	24h	33	90 min	36	30 min	30	38

En analysant ces résultats, on remarque bien que les meilleurs rendements obtenus ainsi les temps les plus courtes ont été obtenus avec les méthodes de synthèse par ultrasons et celle par micro-ondes.

Par contre, dans notre cas, on a gardé la méthode de synthèse classique vu que dans les autres méthodes on est limité par les quantités de réactifs utilisés.

On a noté aussi que les produits synthétisés n'ont pas la même configuration de la double liaison. En effet, le produit 1A et le produit 5A ont comme configuration Z pour les deux doubles liaisons (figure 16) par contre les autres ont une configuration E pour les deux doubles liaisons.

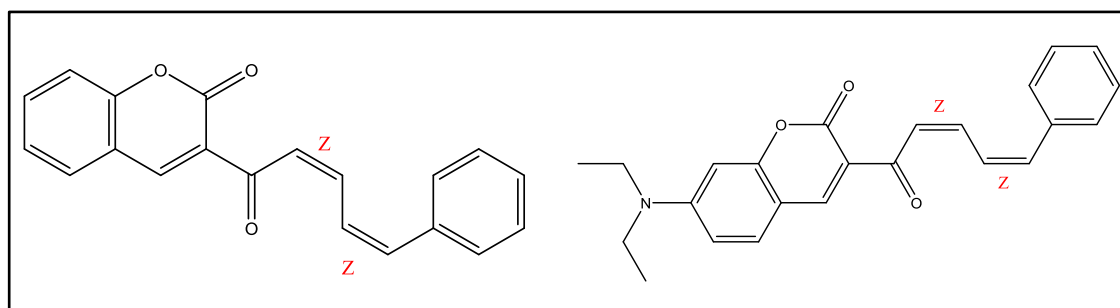


Figure16 : Structure du composé 1A (à gauche) et du composé 5A (à droite)

Ces résultats sont confirmés par la constante de couplage «*J*» des hydrogènes éthyléniques dans les spectres de proton des composés:  $8\text{Hz} \leq J \leq 10\text{Hz}$  pour les composé 1 A et 5A ;  $12\text{Hz} \leq J \leq 16\text{Hz}$  pour le reste des analogues de chalcones synthétisés.

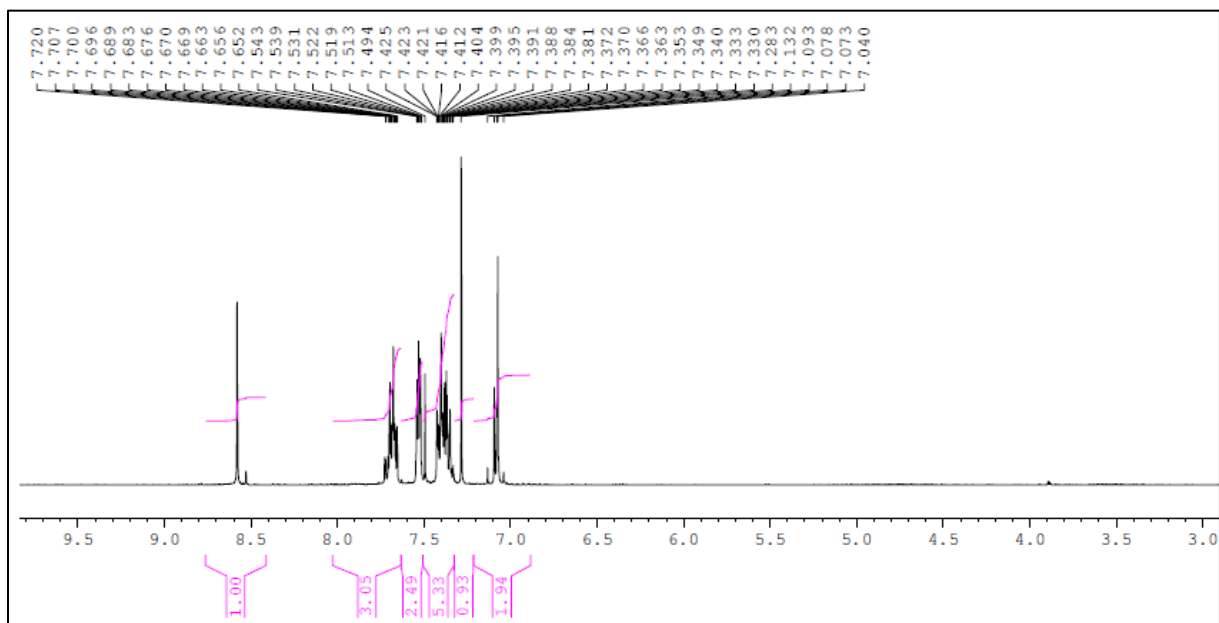


Figure 17 : Spectre de proton du composé 1A

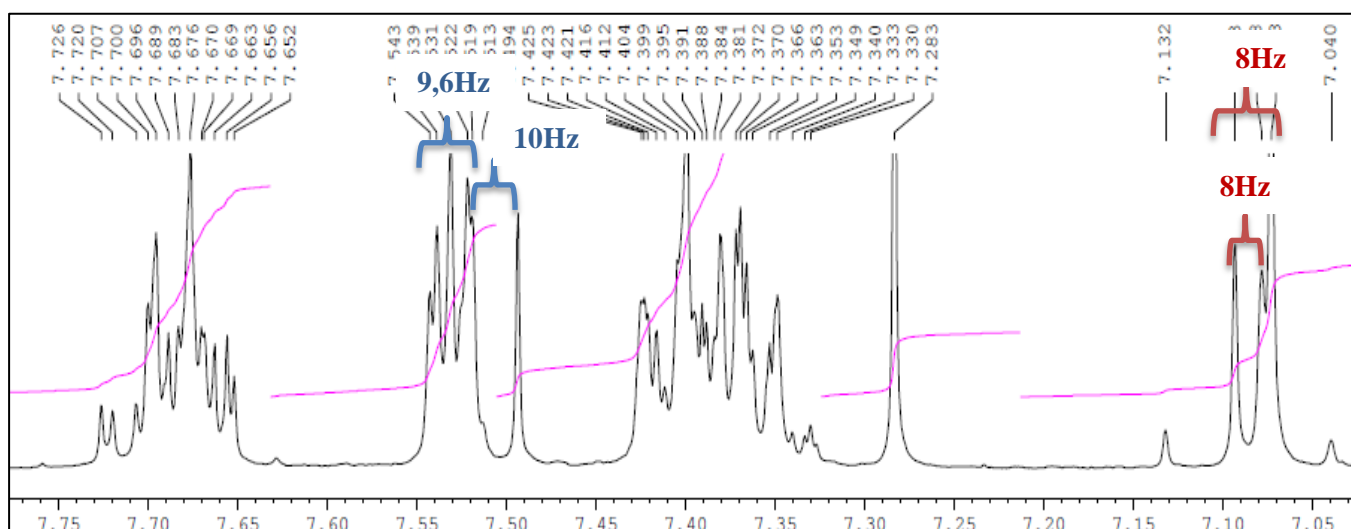


Figure 18 : Agrandissement de la zone aromatique du spectre de composé 1A

On note d'après les figures 17 et 18, que les constantes de couplage des protons éthyléniques de composé 1A correspondent à celle d'une double liaison de configuration Z.

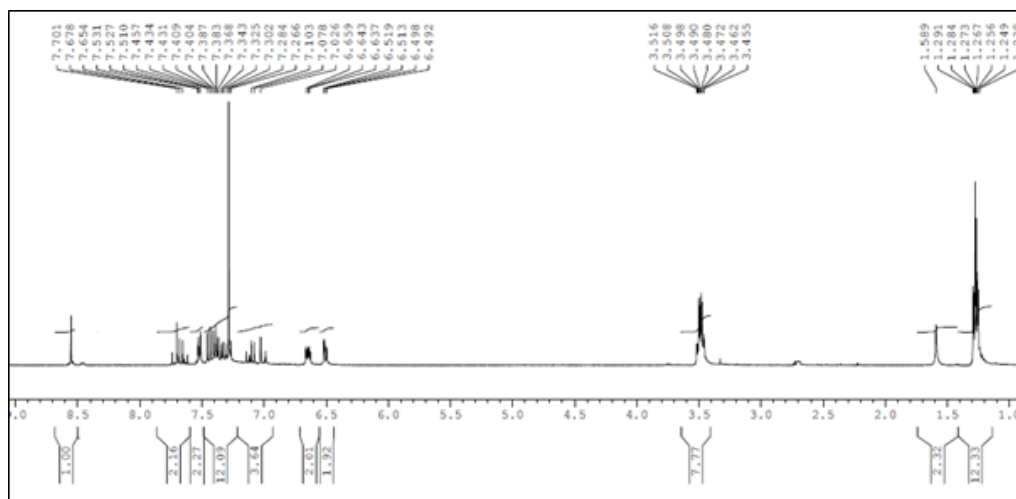


Figure 19 : Spectre de proton du composé 5A

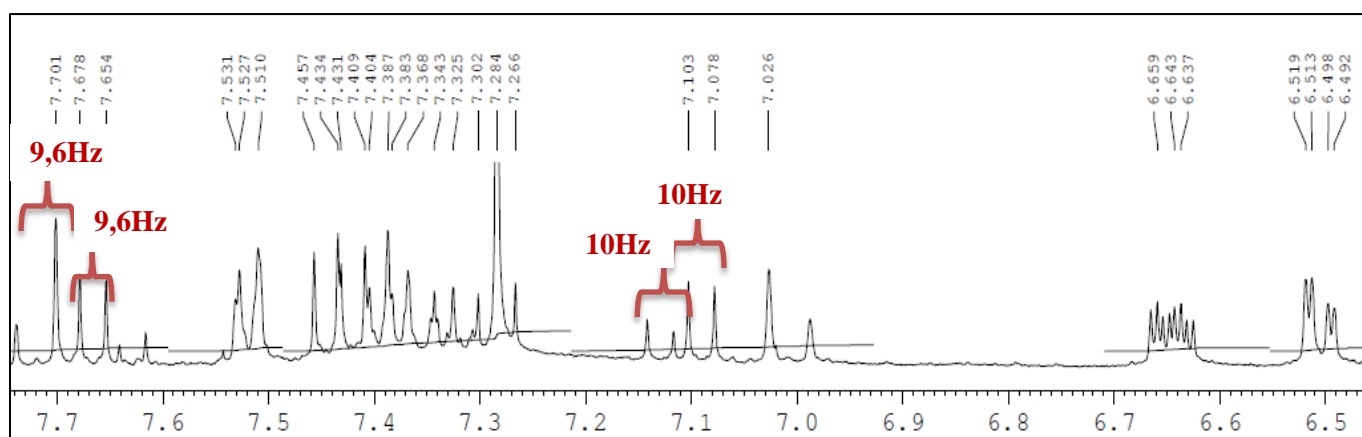


Figure 20: Agrandissement de la zone aromatique du spectre de composé 5A

De même pour le composé 5A, les constantes de couplages indiquent que les doubles liaisons dans notre molécule ont la configuration Z et non pas E.

### I.3. Condensation des coumarines avec l'isatine

En 1988, V.Glover et *al.* ont montré que l'isatine et ses dérivés possèdent des activités antioxydants et était un inhibiteur de monoamine oxydase (IMAO)<sup>77</sup>.

En 1998, Pandeya et *al.* ont montré que la base de Schiff synthétisée à partir d'isatine et de trimethoprim ainsi que leurs bases N-Mannich (figure 21) possèdent une excellente activité

<sup>77</sup> V. Glover, J. M. Halket, P. J. Watkins, A. Clow, B. L. Goddwin and M. J. Sandler; Isatin-identity with the purified endogenous monoamine oxidase inhibitor tribulin; *Neurochemistry*; 1988; 51; 656–659.



vis-à-vis de : *Vibrio cholerae*, *Shigella boydii*, *Enterobacter faecalis* et *Edwardsiella Tarda* avec une concentration minimum d'inhibition (MIC) variant entre de 10–25  $\mu\text{g}^* \text{mL}^{-1}$ .<sup>78</sup>

De même ils ont découverts que certains produits avaient une activité biologique vis-à-vis de *Salmonella typhi* et de *Vibrio cholerae*0139 et que deux composés inhibent le HIV-1 (IIIB).

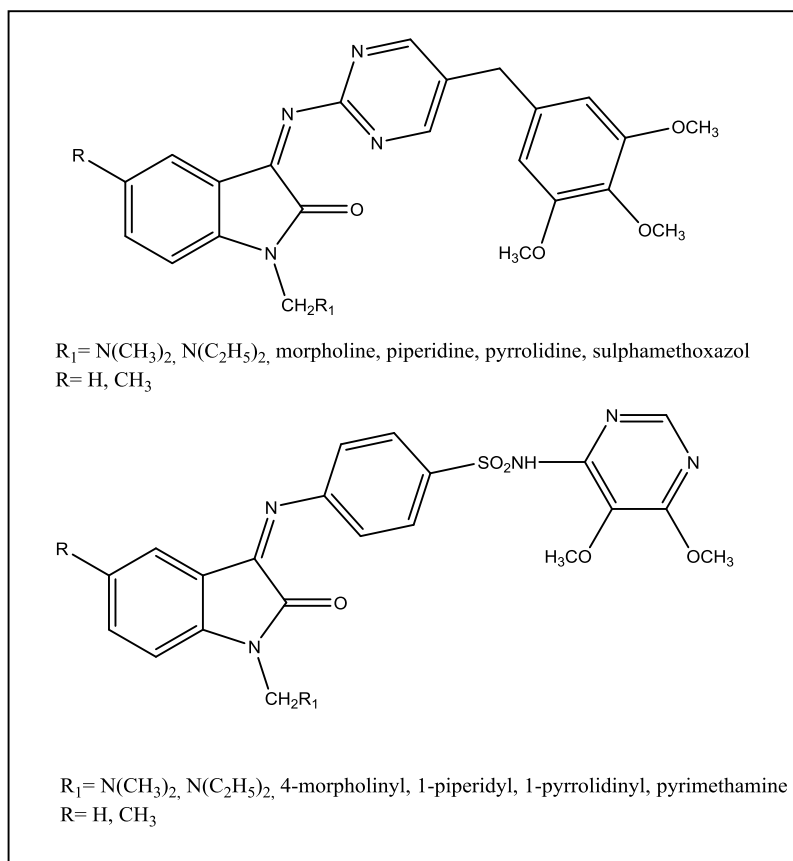


Figure 21 : Structures générale des bases de Schiff à partir des dérivés d'isatine avec trimetoprim et sulfadoxine

En 1999, le même groupe ont trouvé que le composé 1-[*N,N* diméthylaminométhyl]-5-bromoisatin-3-{1'-[4''-(*p*-chlorophenyl)thiazol-2''-yl]thiosemicarbazone} (figure 22) possède une activité antimicrobienne importante vis-à-vis de 28 bactéries pathogéniques et 8 fongicides pathogéniques ainsi que l'activité anti-HIV avec le HIV-1 (IIIB) dans les cellules MT-4.<sup>79</sup>

<sup>78</sup> S. N. Pandeya and D. Sriram; Synthesis and screening of antibacterial activity of Schiff and Mannich bases of isatin derivatives, *Acta. Pharm. Turc*; 1998; 40; 33–36.

<sup>79</sup> 47. S. N. Pandeya, D. Sriram, G. Nath and E. De Clercq; Synthesis, antibacterial antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derivatives from isatin derivatives and N-[4-(4'-

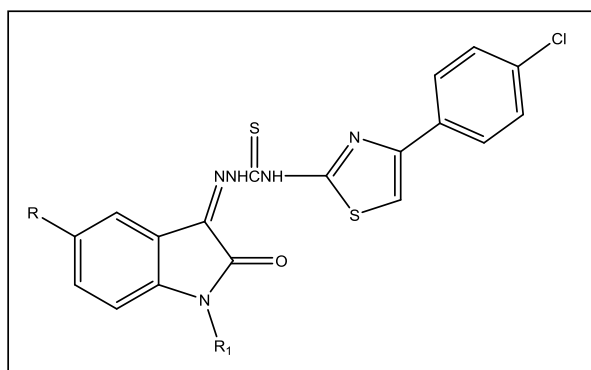


Figure 22: Structure générale de *N*-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide<sup>19</sup>

En 2005, Bal *et al.* ont étudié l'activité inhibitrice de quelques dérivés d'isatin  $\beta$ -thiosemicarbazone vis-à-vis de HIV dans le HTLV-IIIB trouvant dans la souche cellulaire CEM. Ils ont constaté que le composé (Z)-2-ethyl-N'-(2-oxo-1-((4-(3-(trifluorométhyl) phenyl) piperazin-1-yl) méthyl)indolin-3-ylidène)butanethiohydrazide (figure 23) est le plus actif avec un index de sélectivité égale à 17,41.<sup>80</sup>

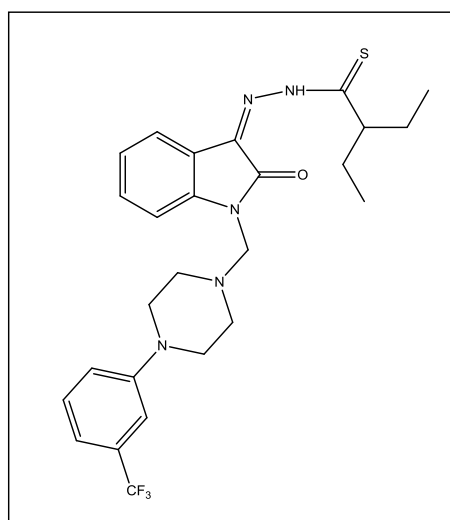


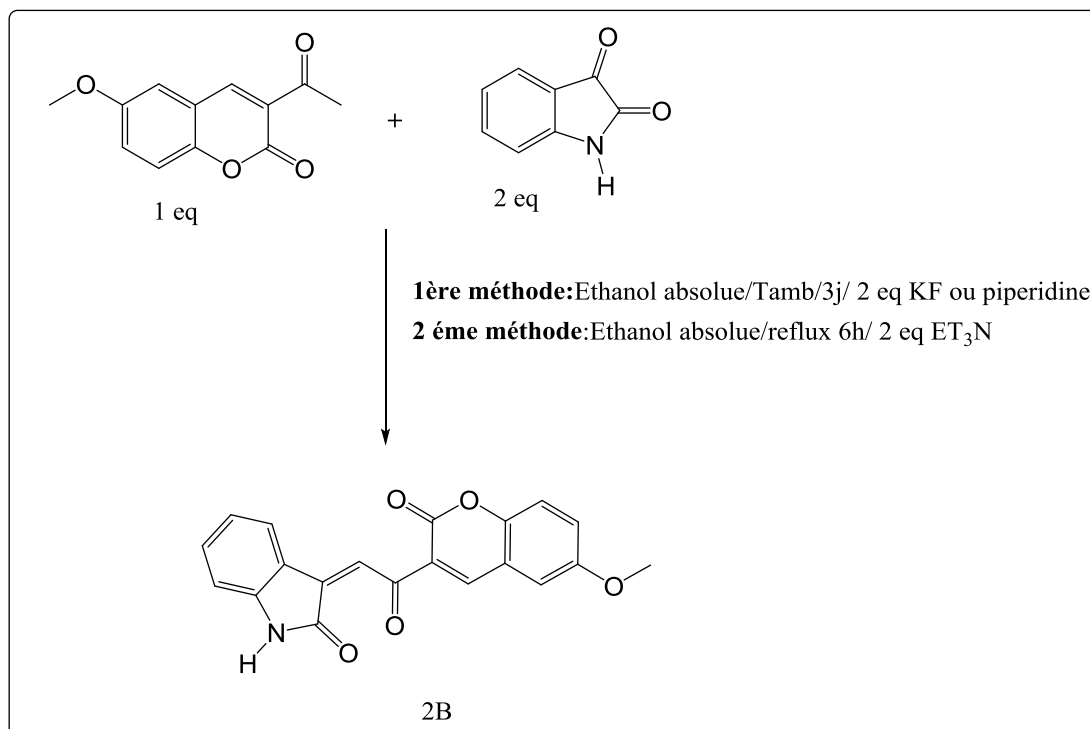
Figure 23: Structure chimique de (Z)-2-ethyl-N'-(2-oxo-1-((4-(3-(trifluorométhyl) phenyl) piperazin-1-yl)méthyl)indolin-3-ylidène)butanethiohydrazide.<sup>20</sup>

chlorophenyl) thiazol-2-yl] thiosemicarbazides; *European Journal Pharmaceutical Sciences*; 1999; 9 ; 25–31.

<sup>80</sup> Tanushree Ratan Bal, Balasubramani Anand, Perumal Yogeewari & Dharmarajan Sriram ; Synthesis and evaluation of anti-HIV activity of isatin  $\beta$ -thiosemicarbazone derivatives ; *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*; 2005; 15; 4451–4455

Ces diverses activités biologiques intéressantes de l'isatine et ses dérivés, nous ont fait penser à condenser cette molécule avec le 3-acétylcoumarine dans le but de tester l'activité biologique des nouveaux composés obtenus.

On a utilisé 3 différentes bases pour tester leurs réactivités dans la condensation de deux cétones (coumarine et isatine) pour la synthèse du composé 2B. Et après, on a réalisé la réaction de la synthèse de la deuxième série (1B-4B).



*Schéma 11 : Réaction de synthèse de 2B par deux méthodes*

Tableau n°8 : Optimisation de la réaction de la synthèse du composé 2B

	KF		Pipéridine		$\text{Et}_3\text{N}$	
	Temps	Rdt%	temps	Rdt%	Temps	Rdt%
2B	5j	52	3j	60	5j	44

D'après les résultats du tableau, on a conservé la pipéridine comme base catalytique pour cette réaction car elle nous a donné un bon rendement dans un temps raisonnable par rapport aux autres candidats.

Ceci représente un premier essai d'une réaction à exemplifier pour préparer une série de produits à intérêts biologiques.

## II. Action des dérivés azotés sur les chalcones de la première série

Le système C=O  $\alpha,\beta$ -insaturé est équivalent au dicétone 1,3 qui sont souvent servis comme matière première pour la synthèse d'hétérocycle à 5 chaînons par réaction avec des di-nucléophiles.<sup>81,82</sup>

Etant en présence d'un analogue de ce système, il était intéressant de voir si cette vinylogie permettant de voir si on pouvait aller vers des hétérocycles de plus grande taille.

On a appliqué ce concept sur les quatre premiers produits de la série des analogues de chalcones avec l'urée et l'hydrazine.

### II.1. Réactivité des composés de la première série vis-à-vis d'hydrazine

Le fait de réagir ce motif de chalcones-like avec l'hydrazine, il y a eu naissance d'un nouveau cycle (dihydropyrazole) intermédiaire entre les deux parties de la molécule et la formation d'un carbone asymétrique.

En analysant les spectres RMN du proton des molécules 1C-4C, on a remarqué que la double liaison restante a changé sa configuration de Z en E avec le composé 1C ; et de E en Z avec les autres.

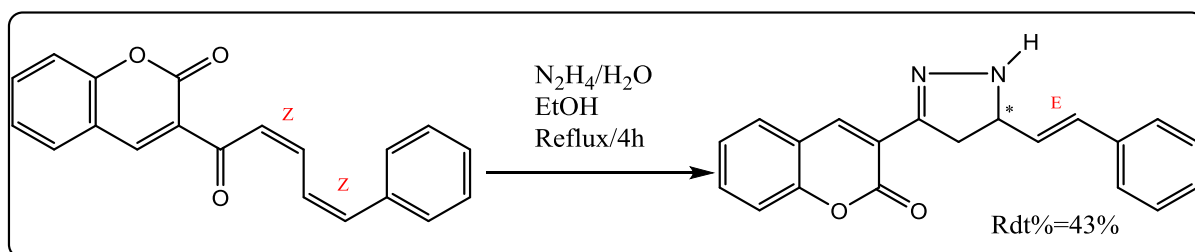


Schéma 12 : Réaction de synthèse du produit 1C

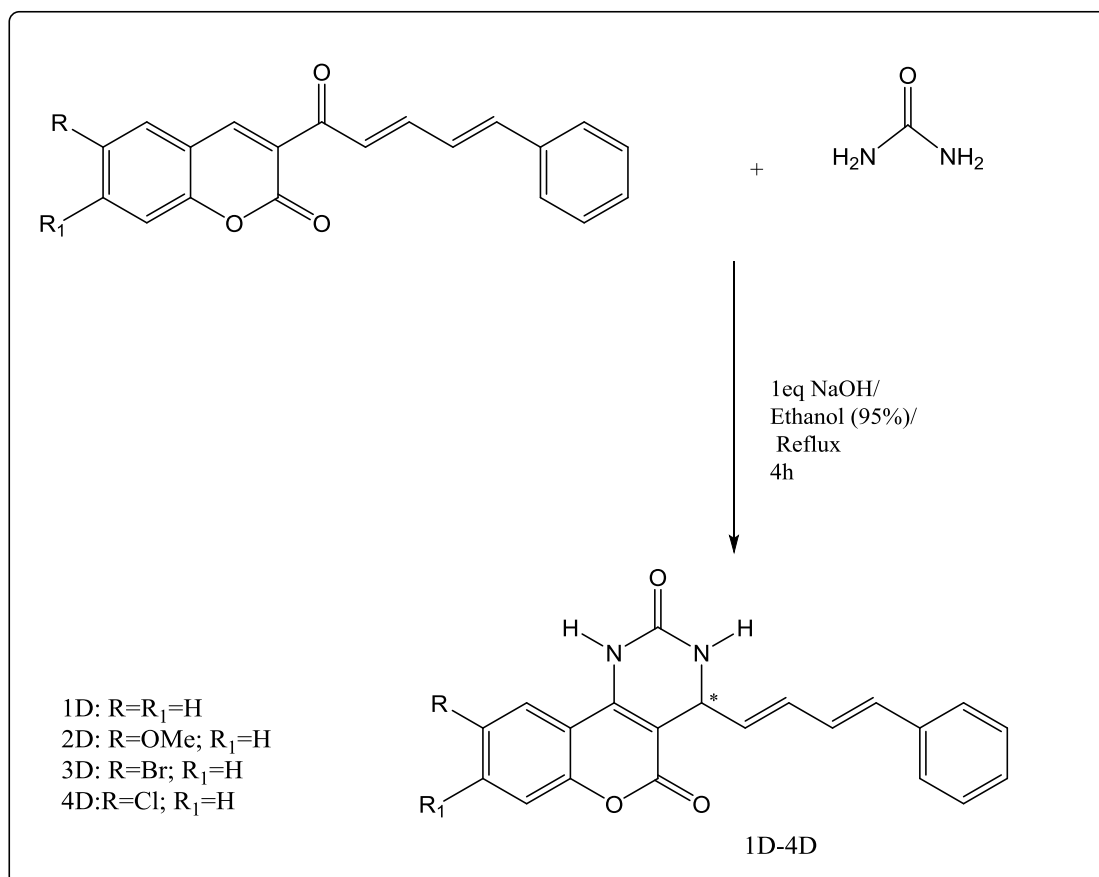
<sup>81</sup> F.L.Ansari, S. Umbreen, L.Hussain, T.Makhmoor, S.A. Nawaz, M.A.Lodhi, S.N. Khan, F.Shaheen, M.I. Chhoudhary, A.Rahman; Synthesis and biological activities of chalcone and 1,25-Benzothiazepine derivatives :Promising new free-radical scavengers, and Esterase, Urease, and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors; *Journal Of Chemistry and Biodiversity*, 2005; 2,487-496.

<sup>82</sup> S.S.Mokele, Y.B.Vibhute; Synthesis of some new biologically active chalcones and flavones; *Der Pharma Chemica*; 2009; 1 (2), 145-152.

Pour le changement de la configuration de la double liaison, on suppose que lors de l'attaque d'hydrazine à la molécule il y a eu délocalisation de la première double liaison ce qui favorise la rotation de la molécule et facilite l'attaque du doublet d'azote.

## II.2. Réactivité des composés de la première série vis-à-vis d'urée

Suite à la réaction des hydrazines avec les chalcones-like, on a réagi ces derniers avec l'urée.



*Schéma13 : Réaction de synthèse des produits 1D-4D*

Alors cette fois ci il y'a eu la formation du tétrahydro-pyrimidin-2-one collé à la partie coumarine de la molécule. Ce résultat signifie que l'urée et l'hydrazine n'agissent pas de même manière avec notre système C=O  $\alpha,\beta$ -insaturée.

De plus, on note que la configuration des doubles liaisons du produit 1D est transformée de Z en E, ce qui n'est pas le cas avec les autres produits qui ont gardé leurs configurations E pour les deux doubles liaisons.

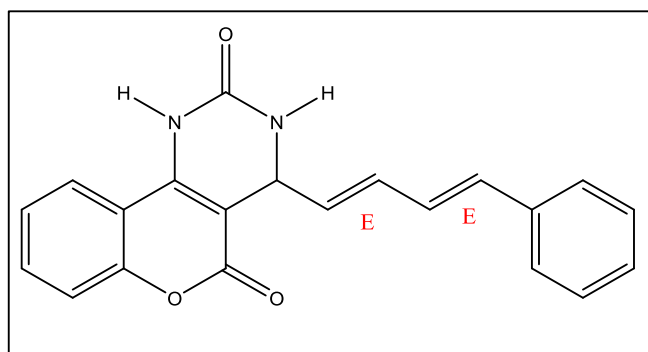
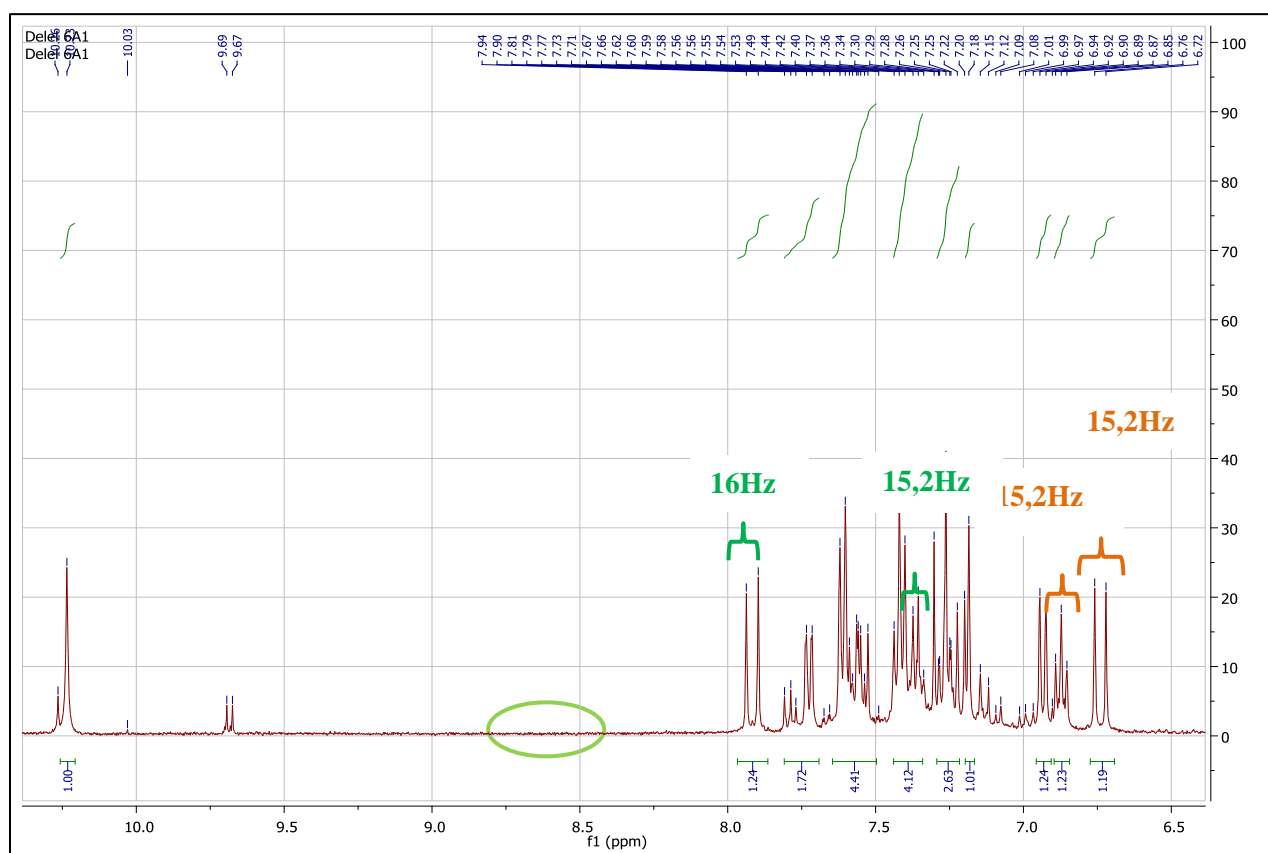


Figure 24: Structure du composé 1D

Figure 25: Spectre  $^1\text{H}$ RMN du composé 1D

En comparant le spectre RMN du proton de composé 1D (figure 25) avec celui du réactif de départ (composé 1A : figure 17), on note la disparition du pic caractéristique du noyau coumarinique qui est à  $\delta = 8,51\text{ ppm}$  aussi que les constantes de couplage des doubles liaisons sont différentes de celle trouvant dans le spectre du réactif :  $15\text{ Hz} \leq J \leq 16\text{ Hz}$ .

### III. Essai de synthèse des formyles thiéno-chromones

Etant donné que les 3-formylchromones (Figure 26) sont connus pour leurs activités antiinflammatoire<sup>83</sup> et inhibitrice de tyrosine phosphatase 1B<sup>84</sup>.

Il a été montré que les chalcones issue de ces 3-formylchromones ont des activités antibactériennes et antifongiques.<sup>85</sup>

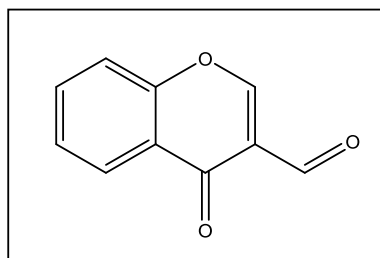


Figure 26: Structure générale de 3-formylchromone

Dans ce contexte, on a eu l'idée de synthétiser une autre série de chalcones originale, en remplaçant les cinnamaldehydes par des dérivés de formyle thiéno-chromone.

La synthèse des 3-formylchromone peut se faire à partir d'o-hydroxy acétophénone en utilisant la réaction de Vilsmeier-Hack-Arnold<sup>86</sup> (Schéma 14).

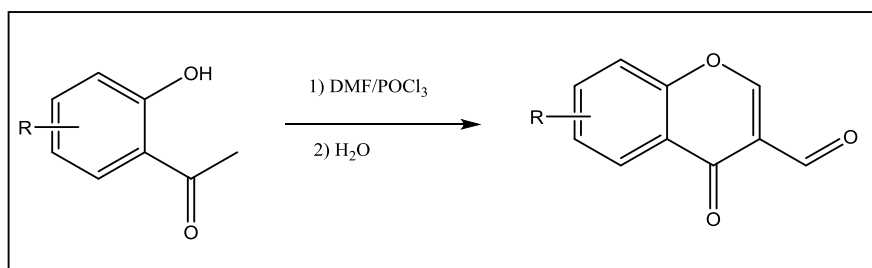


Schéma 14 : Synthèse de 3-formylchromone à partir d'o-hydroxy acétophénone<sup>87</sup>

<sup>83</sup> Khalid M. Khan, Nida Ambreen , Uzma Rasool Mughal , Saima Jalil , Shahnaz Perveen ,M. Iqbal Choudhary; 3-Formylchromones: Potential antiinflammatory agents; *European Journal of Medicinal Chemistry*; 2010; 45; 4058-4064;

<sup>84</sup> Yi Sup Shim, Ki Chul Kim, Dae Yoon Chi, Keun-Hyeung Lee and Hyeongjin Cho; Formylchromone Derivatives as a Novel Class of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors; *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*; 2003; 13; 2561–2563

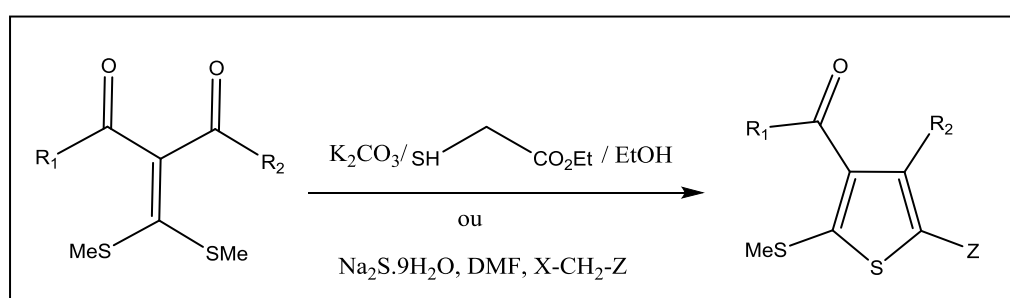
<sup>85</sup> Siddiqui ZN<sup>1</sup>, Praveen S, Musthafa TN, Ahmad A, Khan AU.; Thermal solvent-free synthesis of chromonyl chalcones, pyrazolines and their in vitro antibacterial, antifungal activities; *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* ; 2012; 27; 84-91.

<sup>86</sup> Anton Vilsmeier; Haack, A ; The Vilsmeier–Haack reaction ; *Chemische Berichte* . ; 1927 ; 60; 119.

Nous avons tenté d'étendre la synthèse à des o-hydroxy thiophénone en appliquant la réaction de Vilsmeier-Haak-Arnold aux 3-hydroxy-2-acétyl thiophènes substitués.

### III.1. Synthèse des thiophènes

Ces thiophènes substitués ayant déjà été préparés au laboratoire, par G. Sommen<sup>88</sup> à partir des cétones dithioacétals. Ces derniers sont capables de réagir facilement avec un thioglycolate d'alkyle ou le sulfure de sodium dans un premier temps avec un halogénure activé pour obtenir le thiophène désiré (schéma 15).



**Schéma 15 : Synthèse générale des thiophènes substitués et fonctionnalisés à partir de cétones<sup>89</sup>**

#### ➤ Synthèse des cétones dithioacétals

Dans cette étape, nous avons suivi le même protocole développé dans notre laboratoire<sup>32</sup>. On a fait réagir le malonate de diéthyle avec le sulfure de carbone en milieu basique suivie d'une addition d'iodure de méthyle.

Cette réaction est refaite aussi en remplaçant le malonate de diéthyle par le cyanoacétate (schéma 16).

<sup>87</sup> Akira Nohara, Tomonobu Umetani and Yasushi Sanno; A Facile Synthesis Of Chromone-3-carboxaldehyde, Chromone-3-carboxylic Acid And 3-Hydroxymethylchromone; *Tetrahedron Letters*; 1973; 22, 1995 - 1998

<sup>88</sup> Sommen.G ; Synthèse de thiophènes, sélénophènes, pyrroles et de leurs systèmes condensés à partir de cétones-S,S et N,S-acétals ; Thèse de doctorat ; UPVM ; 2007

<sup>89</sup> G. Sommen, A. Comel, G. Kirsch; "A Convenient Synthesis of 2,3,4,5-Functionalised thieno[2,3-b]thiophenes.", *Synthesis*; 2003; 5; 735-741.



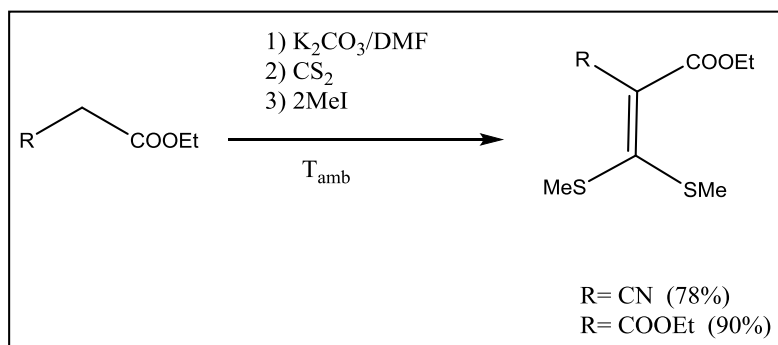


Schéma 16 : Synthèse des cétènes dithioacétals

➤ Synthèse des 5-méthylsulfanyl-2-acétyl-3-hydroxythiophènes

Après purification et isolement de ces cétènes, ils sont directement mis en réaction avec le sulfure de sodium suivie de la chloroacétone en présence de et de carbonate de potassium pour former les 2-acétyl-3-hydroxythiophènes substitués en position 4 et 5 (schéma 17).

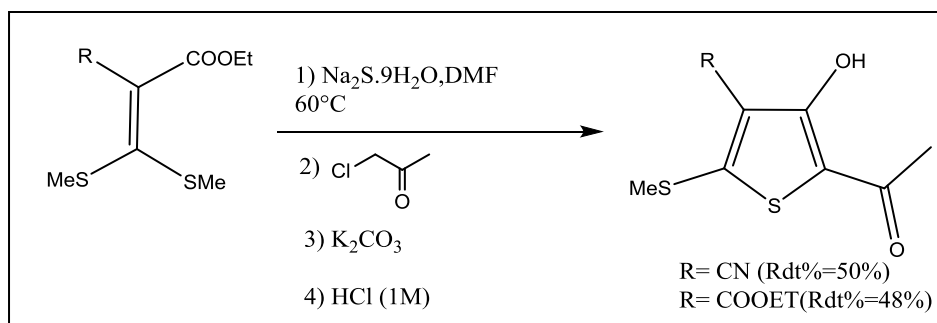
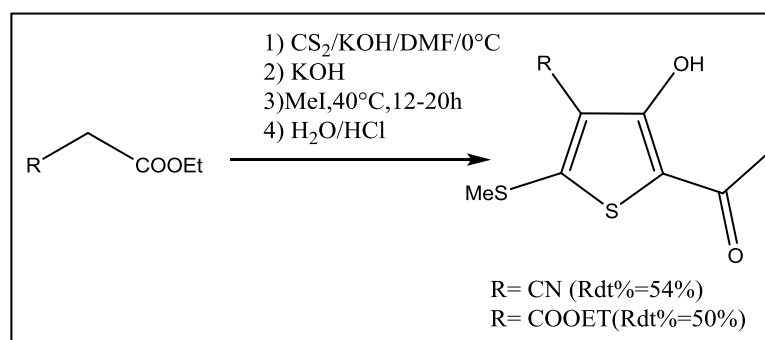


Schéma 17: Synthèse de deux dérivés de 5-méthylsulfanyl-2-acétyl-3-hydroxythiophènes

Parallèlement ; on a essayé une autre méthode directe pour la synthèse de ces deux composés en appliquant la méthode d'Augustin *et al.*<sup>90</sup> en partant du malonate de diéthyle ou de cyanoacétate d'éthyle et du disulfure de carbone (schéma 18).

<sup>90</sup> Augustin.M ; Rudorf. W. D , Schmidt.U ; Thiophene durch S-alkylierung ; *Tetrahedron* ; 1976 ; 32 (24); 3055-3061.

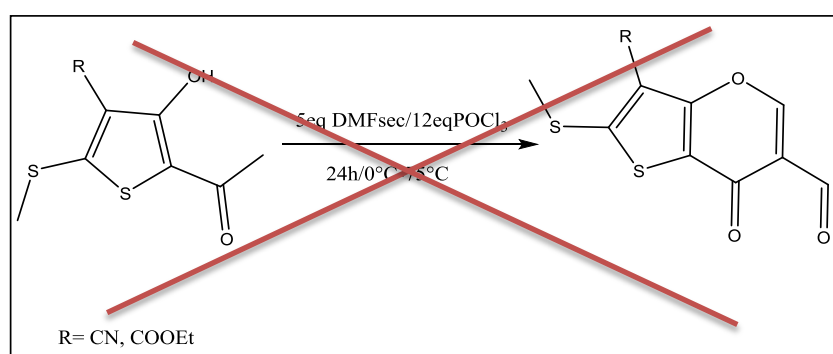


*Schéma 18: Synthèse directe de deux dérivés 3-hydroxythiophènes*

Après l'évaluation de ces deux modes de synthèses nous avons eu un rendement plus important avec la deuxième méthode en une seule étape et dans un temps plus court que la première ce qui nous a permis de la garder.

### III.2. Application de la réaction de Vilsmeier-Hack-Arnold sur les thiophènes synthétisés

Comme indiqué plus haut, en série aromatique, la réaction en utilisant le réactif de Vilsmeier-Hack-Arnold, conduit aux 3-formyl chromones. Nous avons tenté de l'appliquer aux 2-acétyl-3-hydroxythiophène (schéma 19).



*Schéma 19: Réaction de synthèse des 7-oxo-7H-thieno [3,2-b] pyran-6-carbaldéhyde*

Malgré des multiples essais effectués en variant la concentration du réactif, la température et le temps de la réaction nous n'avons pas réussi à obtenir les formyles thieno-chromones attendus.

## **Chapitre III : Partie Expérimentale**

## I. Introduction Générale

La nomenclature des composés synthétisés a été faite par le logiciel Chem Draw.

### Température de fusion

La température de fusion est exprimée en °C et elle est déterminée à l'aide du banc Koffler ou bien en utilisant l'appareil du Buchi 530.

### Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres respectifs du proton ( $^1\text{H}$  RMN) et celui du carbone ( $^{13}\text{C}$  RMN) sont déterminés à l'aide du spectromètre Bruker AC400, les solvants utilisés sont le  $\text{CDCl}_3$  ou le  $\text{DMSO-d}_6$ .

Les abréviations utilisés sont : s : singulier ; d : doublet ; t : triplet ; m : multiplet.

### Spectroscopie de Masse (MS)

Les spectres de la masse sont déterminés à l'aide du spectromètre de masse MicroTof-Q98 ou Fisons Trio 1000.

### Analyses élémentaires

La détermination de la composition des molécules en carbone, hydrogène, azote et oxygène est faite à l'aide du CHN microanalyses : Thermo Scientific Flash 2000.

Cette analyse est utilisée pour déterminer la pureté des composés synthétisés.

### Chromatographie

L'avancement de toutes les réactions de la synthèse est fait à l'aide de la CCM (chromatographie sur couche mince) et la révélation des taches avec la lampe UV.

La chromatographie sur colonne est utilisée pour séparer le produit final des impuretés en utilisant le gel de silice (LC 60A (70-200 micron)).

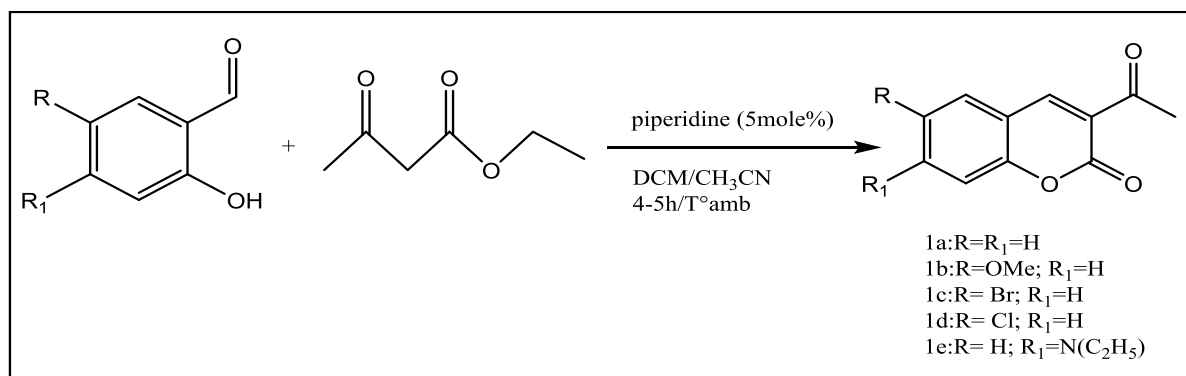
### Sources des réactifs et des solvants

Les solvants et les réactifs utilisés pour les synthèses sont achetés auprès d'Alfa Aesar (Germany), Acros Organics (France), Sigma Aldrich (France), Carlo Erba (Italie) et aussi du magasin de la chimie de l'Université de Lorraine (Nancy).

## II. Synthèse des chalcones

### II.1. Préparations des produits de départ

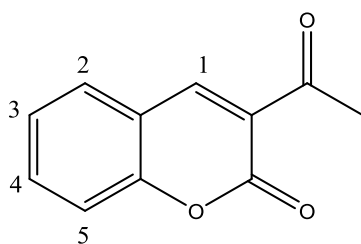
#### II.1.1. Synthèse des dérivés de 3-acétylcoumarine



#### Mode opératoire

Pour un mélange équimolaire d'une mmole d'aldéhyde salicylique substitué et d'éthyle acétylacétate dans un mélange de 50% de DCM/CH<sub>3</sub>CN on a ajouté 5 mole% de pipéridine; on laisse agiter pendant 4 ou 5 h à température ambiante. Quand la réaction est finie, on a évaporé le solvant et on a recristallisé avec le dichlorométhane ou l'acétonitrile/cyclohexane (3:2).

#### 3-Acétylcoumarine [1a]



l.

Masse molaire : 188,18 g.mol<sup>-1</sup>

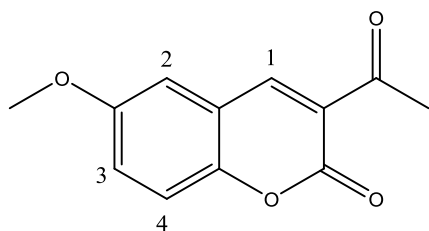
P<sub>f</sub>: 117-119°C

Aspect : poudre incolore

Rendement : 52%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2,75 (s, COCH<sub>3</sub>); 7,34-7,41 (dd, H<sub>2</sub> et H<sub>5</sub>, J=8Hz et J=2,4Hz); 7,66-7,69 (m, H<sub>3</sub> et H<sub>4</sub>); 8,5 (s, H<sub>1</sub>);

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm)= 30,5 ; 116,7 ; 118,3 ; 124,6 ; 125 ; 130,2 ; 134,3 ; 147,4 ; 155,4 ; 159,2 ; 195,4.

**6-Methoxy-3-Acétylcoumarine [1b]**

Masse molaire : 218,21 g.mol<sup>-1</sup>

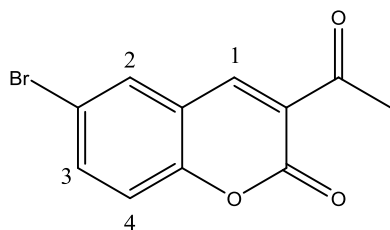
P<sub>f</sub> : 180-183°C

Aspect: cristaux jaunes

Rendement: 34%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm)= 2,75 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>); 3,88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 7,05 (s, H<sub>2</sub>); 7,24-7,26 (d, H<sub>3</sub>, J= 8,4Hz) et 7,31-7,34 (d, H<sub>4</sub>, J=9,2 Hz); 8,47 (s, H<sub>1</sub>)

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)= 30,5 ; 56 ; 111,2 ; 117,8 ; 118,6 ; 122,8 ; 124,8 ; 147,2 ; 150 ; 156,4 ; 159,4 ; 195,6.

**6-Bromo-3-Acétylcoumarine [1c]**

Masse molaire : 267,08 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub> : 223°C

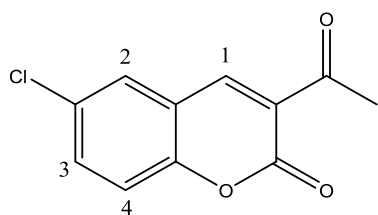
Aspect: poudre blanche

Rendement : 47%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2,75 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>); 7,28 (d, H<sub>4</sub>, J=8,8Hz); 7,74 (dd, H<sub>3</sub>, J=2,4Hz et J=8,8Hz) ; 7,8 (d, H<sub>2</sub>, J=2,4Hz); 8,42 (s, H<sub>1</sub>)

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm)= 30,4 ; 117,5 ; 118,4 ; 119,7 ; 125,5 ; 132,2 ; 137 ; 145,9 ; 154,1 ; 158,5 ; 194,9.

**6-Chloro-3-acétylcoumarine [1d]**



Masse molaire: 222,62 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 207-208,1°C

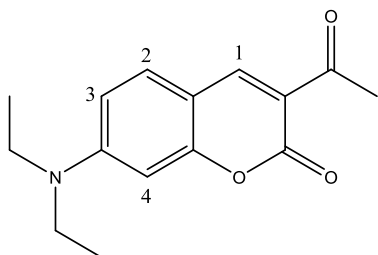
Aspect: poudre jaunâtre

Rendement : 22%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2,75 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>); 7,34-7,36 (d, H<sub>4</sub>, J=8,8Hz); 7,65 (d, H<sub>2</sub>, J=2,4Hz) ; 7,61 (dd, H<sub>3</sub>, J=8,8 Hz et J=2,8 Hz) ; 8,42 (s, H<sub>1</sub>)

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm)= 30,4 ; 118,2 ; 119,2 ; 125,6 ; 129 ; 130,3 ; 134,2 ; 146 ; 153,6 ; 158,6 ; 195.

### 7-N,N-diéthylamino-3-acétylcoumarine [1e]



Masse molaire: 259,30 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 154°C

Aspect: cristaux jaune verdâtre

Rendement: 62%

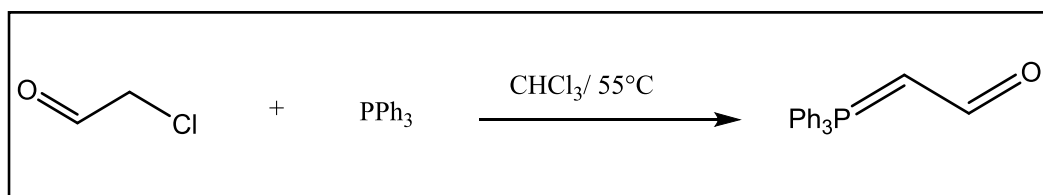
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 1,27 (t, 6H, 2CH<sub>3</sub>) ; 2,7 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>) ; 3,48 (q, 4H, 2CH<sub>2</sub>) ; δ= 6,5 (d, H<sub>4</sub>, J= 2,4 Hz) ; 6,65 (dd, H<sub>3</sub>, J<sub>1</sub>=9,2Hz et J<sub>2</sub>=2,4 Hz) ; 7,42 (d, H<sub>2</sub>, J= 9Hz) ; 8,45 (s, H<sub>1</sub>) ;

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm)= 12,4 ; 30,5 ; 45,2 ; 96,8 ; 108,3 ; 109,9 ; 116,4 ; 131,8 ; 147,8 ; 152,9 ; 158,8 ; 160,8 ; 195,7

## II.1.2. Synthèse des dérivés de cinnamaldehydes

### Première mode de synthèse

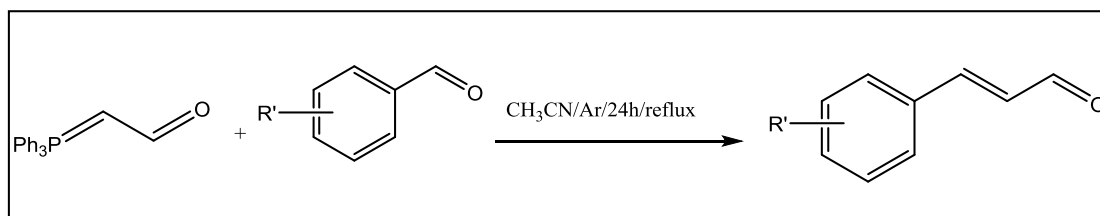
Cette synthèse a été faite en deux étapes :

1<sup>ère</sup> étape : synthèse du réactif de Wittig

Dans un ballon de 500 ml, muni d'un montage de Dean-Stark, on a distillé 15,7g (0,2 mole) d'une solution aqueuse de 50% Chloroacétaldéhyde en présence de 375ml de  $\text{CHCl}_3$ .

Après élimination de la quantité d'eau existante, on a ajouté 54,4 g (0,2 mole) de  $\text{PPh}_3$  au mélange chloroacétaldéhyde/  $\text{CHCl}_3$  puis on a laissé la réaction à reflux pendant 24h.

A la fin de la réaction, le mélange est mis à  $T^\circ_{\text{amb}}$ , ensuite filtré et traité avec l'eau (300 ml). On extrait la phase aqueuse à laquelle on rajoute du charbon actif et on laisse sous agitation pendant 45min. Ensuite, on filtre sur célite et sous pression. En utilisant une solution de  $\text{NaOH}$  (1N) on fixe le pH de la solution entre 8 et 9. Alors notre 2-(triphenylphosphoranylidine) acétaldéhyde se précipite sous forme d'une poudre beige ; on filtre et on lave avec l'eau.

2<sup>ème</sup> étape : synthèse du cinnamaldehyde

On mélange 1,3éq de 2-(triphenylphosphoranylidine) acétaldéhyde avec 1éq du benzaldéhyde substitué dans 300mL d'acétonitrile et on met sous reflux pendant 24h et sous argon. On évapore par la suite le solvant et on passe le résidu à une colonne chromatographique en utilisant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (9 :1) comme éluant pour obtenir enfin notre cinnamaldehyde désiré.

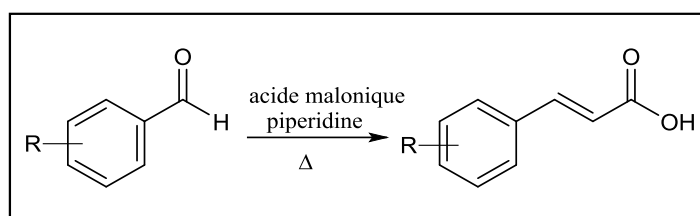
Deuxième mode de synthèse

Ce mode de synthèse est fait en deux étapes, mais avant de commencer la synthèse des cinnamaldehydes on a préparé notre réducteur selon le mode opératoire suivant :



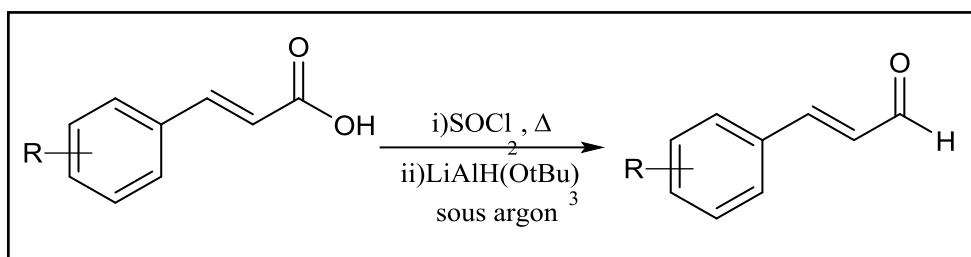
Dans un ballon de 250mL, on mélange 3éq de tertio-butanol avec 1éq de  $\text{LiAlH}_4$  dans l'éther sec à  $T^\circ=0^\circ\text{C}$  pendant 4h. Après évaporation du solvant on obtient notre réducteur  $\text{LiAlH}(\text{OtBu})_3$  qu'on l'utilise directement dans la réaction de réduction des acides cinnamiques ou bien on le conserve sous argon.

### 1<sup>ère</sup> étape : Synthèse des acides cinnamiques

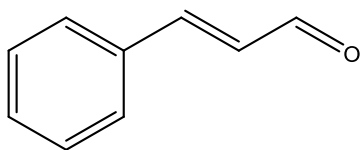


Dans un ballon de 50 mL on mélange 1mmole de benzaldéhyde substitué avec 0,31g d'acide malonique, 0,05mL de pipéridine et 2mL de pyridine, on laisse tout à  $T^\circ=110^\circ\text{C}$  pendant 2h ; après évaporation du solvant on acidifie légèrement le milieu réactionnel avec une solution de HCl (1%), ensuite on filtre et on lave deux fois avec l'eau suivie d'un lavage avec le toluène.

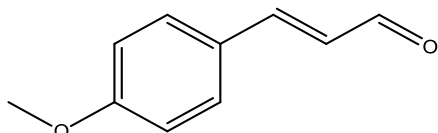
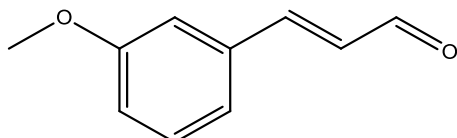
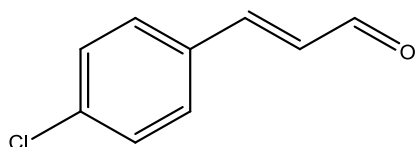
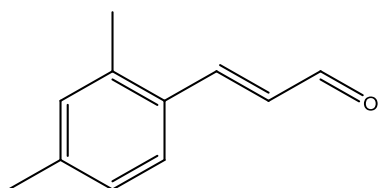
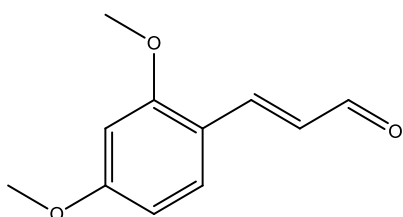
### 2<sup>ème</sup> étape : Synthèse des cinnamaldéhydes à partir des acides cinnamique

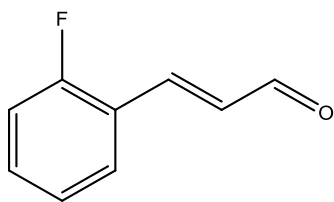


Dans un ballon de 50mL on mélange 1mmole d'acide cinnamique avec 3mmole de chlorure de thionyl ( $\text{SOCl}_2$ ) en présence de 20mL de dichlorométhane et maintenir sous reflux pendant 2h. Après évaporation du solvant, on dissous le résidu obtenus dans le THF qu'on lui additionne une solution de  $\text{LiAlH}(\text{OtBu})_3$  dans THF (0,28g dans 13mL) pendant 30min à  $T^\circ=0^\circ\text{C}$  sous agitation et sous argon. On laisse le mélange sous agitation à  $T^\circ=0^\circ\text{C}$  pendant 2h de plus, après pendant 24h à  $T^\circ_{\text{amb}}$ . Ensuite une solution HCl (N=1%) est rajouté au milieu réactionnel, le mélange est extrait après par le chloroforme (30mL $\times$  3fois). Enfin, une colonne chromatographique (éluant: cyclohexane/acétate d'éthyle (9/1)) est montée pour purifier la phase organique collectée et obtenir notre cinnamaldehyde substitué.

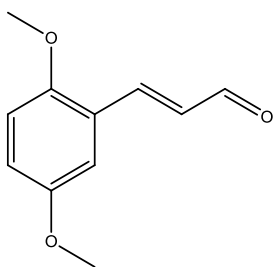
**Le cinnamaldéhyde**

Produit commercialisé

**(E)-3-(4-methoxyphenyl)acrylaldehyde (cin1)****(E)-3-(3-methoxyphenyl)acrylaldehyde (cin2)****(E)-3-(4-chlorophenyl)acrylaldehyde (cin3)****(E)-3-(2,4-dimethylphenyl)acrylaldehyde (cin4)****(E)-3-(2,4-dimethoxyphenyl)acrylaldehyde (cin5)****(E)-3-(2-fluorophenyl)acrylaldehyde (cin6)**



**(E)-3-(2,5-dimethoxyphenyl)acrylaldehyde (cin7)**



**(E)-3-(4-N,N-(dimethylamino)phenyl)acrylaldehyde (cin8)**

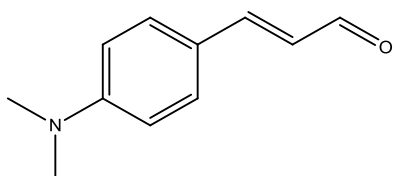
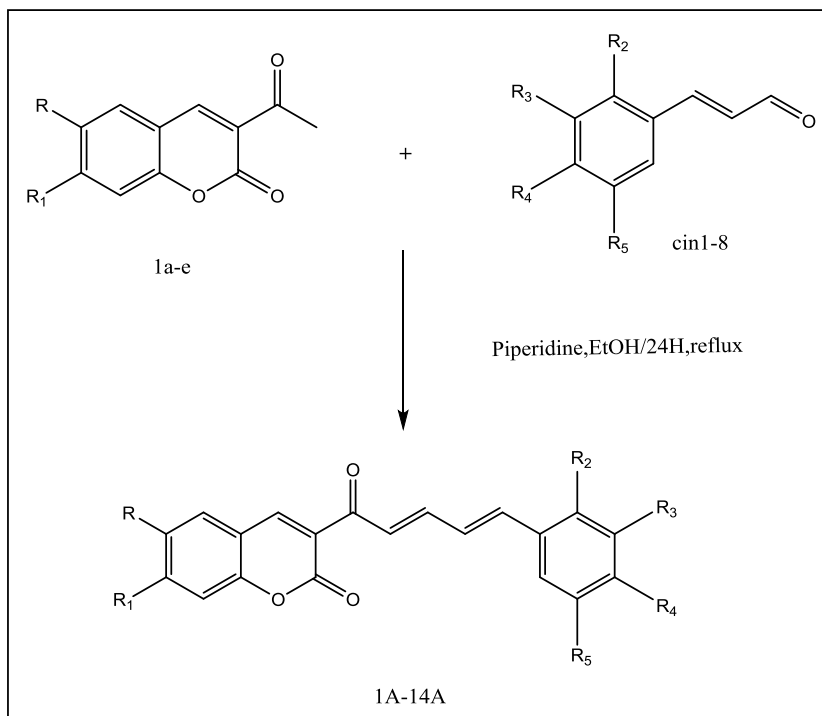


Tableau n°9 :  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  RMN des cinnamaldehydes synthétisées

Ref	Solvent	$^1\text{H}$ RMN ( $\delta$ en ppm)	Solvent	$^{13}\text{C}$ RMN ( $\delta$ en ppm)
cin1	$\text{CDCl}_3$	9,59(d, 1H, $J=5,2\text{Hz}$ ) ; 7,66 (d, 1H, $J=15,6\text{Hz}$ ) ; 7,42-7,48 (m, 2H) ; 6,93-6,95 (m, 2H) ; 6,71 (d, 1H, $J=15,6\text{Hz}$ ) ; 3,5-3,61 (3H, m)	$\text{CDCl}_3$	56; 159; 114,2; 130,2; 127,5 ; 158,6 ; 128,9 ; 193.
cin2	$\text{CDCl}_3$	$\delta$ 9,63 (d, 1H, $J=8\text{Hz}$ ); 7,58 (d, 1H, $J=16\text{Hz}$ ); 7,19 (s, 1H); 6,97-7,11 (m, 3H); 6,34 (d, 1H, $J=16\text{Hz}$ ); 3,76 (s, 3H)	$\text{CDCl}_3$	192,6; 183,1; 165,9; 159; 129,1; 127,8; 120,2; 115,2; 112,4; 54,3
Cin3	DMSO	7,74 (d, 1H, $J=8,4\text{Hz}$ ) ; 7,55 (d, 1H, $J=16\text{Hz}$ ) ; 7,47 (d, 1H, $J=8,4\text{Hz}$ ) ; 6,55(d, 1H, $J=16\text{Hz}$ )	DMSO	165,3; 142,1; 134,7; 133,1; 130,1; 128,9; 120,7
cin4	$\text{CDCl}_3$	10,13 (s,1H); 7,89 (d,1H, $J=16\text{Hz}$ ); 7,38 (d,1H, $J=8,8\text{Hz}$ ); 6,92-6,99 (m, 2H); 6,25 (d,1H, $J=16\text{Hz}$ ); 2,247 (s,3H,); 2,32 (s,3H)	$\text{CDCl}_3$	165,7; 141,5; 140,1; 138,9; 136,4; 130,8; 130,6; 130,5; 129,7; 126,1; 126; 125,3; 118,9; 116,8; 20,2; 18,6
cin5	DMSO	7,793(d,1H, $J=16\text{Hz}$ );7,65(d,1H, $J=8,4\text{Hz}$ );6,62(s,1H,);6,58(d,1H, $J=8,8\text{Hz}$ ); 6,47 (d, 1H, $J=16\text{Hz}$ ); 3,87 (s, 3H); 3,8 (s, 3H)	DMSO	166,8; 162,7; 159,4; 139,1; 130,2; 115,2; 115,2; 106,2; 98,3; 59,6; 55,7
cin6	$\text{CDCl}_3$	7,74 (d, 1H, $J=16\text{Hz}$ ); 7,01-7,47 (m, 4H); 6,47 (d, 1H, $J=16\text{Hz}$ )	$\text{CDCl}_3$	171,5; 162,8; 139,6; 132,2; 129,3; 124,5; 122,3; 119,8; 116,4
cin7	$\text{CDCl}_3$	10,75(s,1H,);7,81(d,1H, $J=16\text{Hz}$ ); 6,96(d,1H, $J=2,8\text{Hz}$ );6,8(d,1H, $J=2,8\text{Hz}$ );6,77(s,1H,); 6,33(d,1H, $J=16,4\text{Hz}$ ); 3,75 (s, 3H) 3,7 (s,3H)	$\text{CDCl}_3$	165,7; 152,5; 151,7; 137,7; 123,2; 119,8; 115,8; 112,1; 111,4; 55,1; 54,7
cin8	DMSO	10,77 (s,1H); 7,74-7,77 (m,1H,); 7,35-7,39 (m, 2H); 6,77-6,83 (m, 2H,); 6,63 (d,1H, $J=9,2\text{Hz}$ ); 6,21(d, 1H, $J=16\text{Hz}$ ); 2,96 (6H,s)	$\text{CDCl}_3$	170,2; 164,2; 151,4; 137,2; 132,5; 131; 111,7; 40

## II.2. Synthèse des chalcones

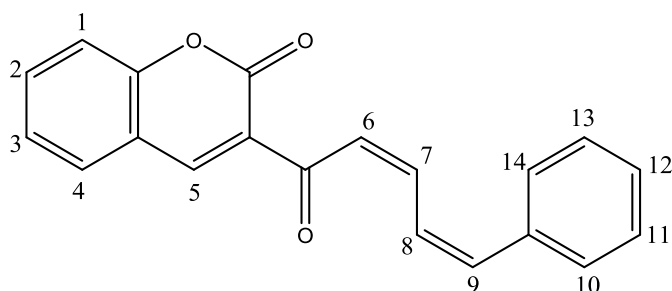
### II.2.1. Condensation des 3-acétylcoumarines et des cinnamaldehydes



#### Mode opératoire

Un mélange de 3-acétylcoumarine substitué (5 mmole) et de dérivé de cinnamaldehyde (6 mmole) est chauffé en reflux dans 50 mL d'éthanol dans un ballon de 100 mL pendant 30 min. Après la dissolution complète des réactifs on a rajouté 5 mole% de piperidine puis on a laissé le mélange à reflux et sous agitation pendant 24h.

L'avancement de la réaction est suivi par CCM. Une fois la réaction est terminée, on laisse revenir à T<sub>amb</sub>, le précipité obtenu est filtrés et recristallisé par la suite avec l'EtOH.

**3-((2Z, 4Z)-5-Phenylpenta-2,4-dienoyl)-2H-chromen-2-one (1A)**

Masse molaire: 302,32 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 184°C

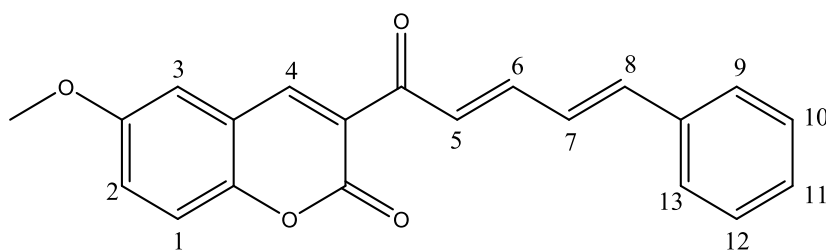
Aspect: poudre jaune

Rendement: 52%

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm)=7,07(dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>1</sub>=8Hz, J<sub>2</sub>=6Hz); 7,08 (d, 1H, H<sub>6</sub>, J=8Hz); 7,35- 7,42 (m, 5H, H<sub>10-14</sub>); 7,68-7,72(m, 2H, H<sub>2</sub> et H<sub>3</sub>); 7,67-7,69 (dd, 1H, H<sub>4</sub>, J=8Hz, J=1,6Hz); 7,52-7,54(dd, 1H, H<sub>1</sub>, J=8,4Hz; J=1,6 Hz); 7,51-7,34 (dd,1H, H<sub>7</sub>, J<sub>1</sub>=9,6Hz et J<sub>2</sub>= 8,4Hz); 7,49-7,52 (d, 1H, H<sub>9</sub> J=10Hz); 7,72 (d,1H, H<sub>2</sub>, J=2,4Hz); 8,6(s,1H,H<sub>5</sub>);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm)=116,7; 118,6; 124,9; 125,39; 127,3; 127,4; 128,9; 129,3; 130 ; 134,1; 136,1; 142,7; 145,2; 147,8; 155,2; 186,3.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>: 302,32; trouvée : 325,085

**6-Methoxy-3-((2E,4E)-5-phenylpenta-2,4-dienoyl)-2H-chromen-2-one (2A)**

Masse molaire: 332,35 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 190°C

Aspect: poudre jaune

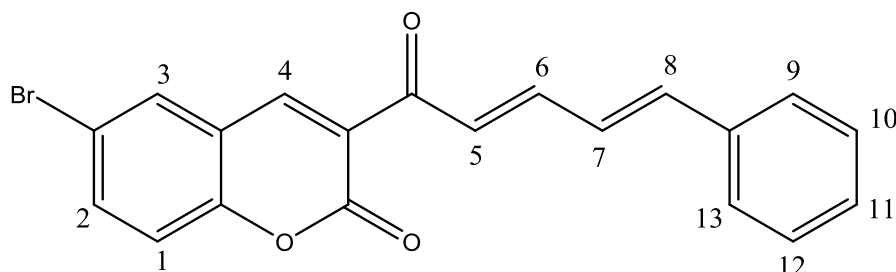
Rendement: 24%

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm)=3,89(s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 7,07(s, H<sub>3</sub>); 7,09 (d, H<sub>9</sub> et H<sub>13</sub>, J=5,6Hz et J=2,5Hz); 7,24 (d, H<sub>2</sub>, J=6Hz); 7,6 (t, H<sub>11</sub>); 7,32-7,35 (d, H<sub>5</sub>, J=14,4Hz); 7,33-7,38 (dd, H<sub>7</sub>, J=18,4Hz); 7,36-7,4 (d, H<sub>8</sub>, J=14,4Hz); 7,5 (d, H<sub>1</sub>, J=6,8Hz); 7,53 (dd, H<sub>10</sub> et H<sub>12</sub>, J=8Hz); 7,66-7,69 (dd, H<sub>6</sub>, J=19Hz); 8,5(s, H<sub>4</sub>);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 55,9 ; 111,0 ; 117,8 ; 118,9 ; 122,6 ; 125,5 ; 127,3 ; 127,4 ; 127,5 ; 128,9 ; 129,3 ; 136,1 ; 142,7 ; 145,1 ; 147,7 ; 149,9 ; 156,4 ; 159,4 ; 186,4.

HRMS (ESI):  $m/z$  [  $\text{M}+\text{Na}$  ]<sup>+</sup> calculée pour  $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{O}_4$ : 332,35; trouvée : 355,095

### 6-Bromo-3-((2E, 4E)-5-phenylpenta-2, 4-dienoyl)-2H-chromen-2-one (3A)



Masse molaire: 380,9  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$P_f$ : 237°C

Aspect: poudre jaune orangé

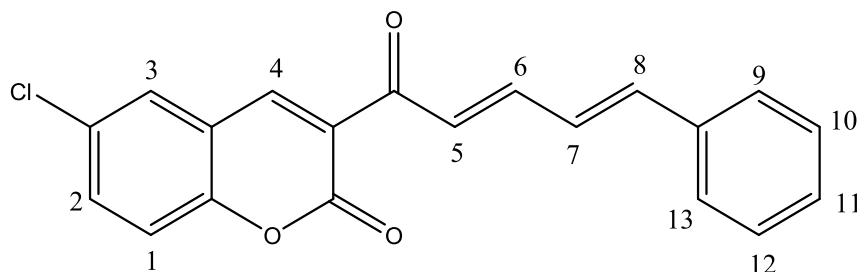
Rendement: 54%

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7,08(d,  $\text{H}_1$ ,  $J=6\text{Hz}$ ); 7,3 (d,  $\text{H}_8$ ,  $J=16\text{Hz}$ ); 7,38 (m,  $\text{H}_{10}\text{-H}_{13}$ ); 7,46 (d :  $\text{H}_5$ ,  $J=16\text{Hz}$ ); 7,53 (d,  $\text{H}_9$  et  $\text{H}_{13}$ ,  $J=9,2\text{ Hz}$ ); 7,68 (dd,  $\text{H}_6$ ,  $J=16,8\text{Hz}$ ); 7,71 (dd,  $\text{H}_7$ ,  $J=16,8\text{Hz}$ ); 7,73 (dd,  $\text{H}_2$ ,  $J=2,4\text{ Hz}$  et  $J=8\text{Hz}$ ); 7,81(d,  $\text{H}_3$ ,  $J=2,4\text{Hz}$ ); 8,48 (s, 1H,  $\text{H}_4$ )

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 117,5; 118,4 ; 119,7 ; 125,5 ; 127,5 ; 128,9 ; 132,2 ; 137 ; 145,9 ; 154,1; 158,5 ; 194,9.

HRMS (ESI):  $m/z$  [  $\text{M}+\text{Na}$  ]<sup>+</sup> calculée pour  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{BrO}_3$ : 380,9; trouvée: 402,994

### 6-Chloro-3-((2E, 4E)-5-phenylpenta-2, 4-dienoyl)-2H-chromen-2-one (4A)



Masse molaire: 336,77  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$P_f$ : 244°C

Aspect: poudre jaune orangé

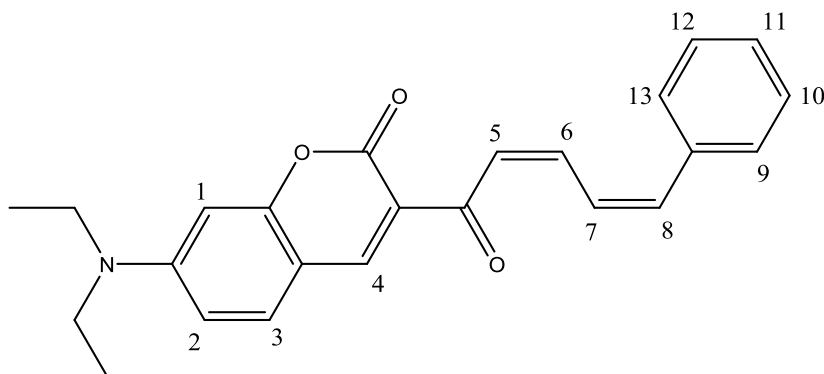
Rendement : 70%

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta(\text{ppm})=7,08(\text{dd}, \text{H}_9 \text{ et } \text{H}_{13}, J_1=2,4 \text{ et } J_2=6\text{Hz})$ ;  $7,34(\text{d}, \text{H}_8, J=14 \text{ Hz})$ ;  $7,36(\text{d}, \text{H}_1, J=8,8\text{Hz})$ ;  $7,41(\text{m}, \text{H}_2, \text{H}_{10} \text{ et } \text{H}_{12})$ ;  $7,46(\text{d}, \text{H}_5, J=14,4\text{Hz})$ ;  $7,53(\text{d}, \text{H}_{11}, J=6,8 \text{ Hz})$ ;  $7,61(\text{dd}, \text{H}_7, J=14\text{Hz})$ ;  $7,55(\text{d}, \text{H}_3, J=1,2\text{Hz})$ ;  $7,7(\text{dd}, \text{H}_6, J=14\text{Hz})$ ;  $8,5(\text{s}, \text{H}_4)$

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta(\text{ppm})=118,1$ ;  $119,6$ ;  $126,4$ ;  $127,05$ ;  $127,2$ ;  $127,5$ ;  $128,7$ ;  $128,9$ ;  $129,1$ ;  $129,5$ ;  $130,3$ ;  $134$ ;  $136$ ;  $143,2$ ;  $145,7$ ;  $146,4$ ;  $153,5$ ;  $158,7$ ;  $185,9$ .

HRMS (ESI):  $m/z$  [  $\text{M}+\text{Na}$  ] $^+$  calculée pour  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{ClO}_3$ :  $336,06$ ; trouvée:  $359,045$

### 7-(Diethylamino)-3-((2Z,4Z)-5-phenylpenta-2,4-dienoyl)-2H-chromen-2-one (5A)



Masse molaire :  $373,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

P<sub>f</sub>:  $166^\circ\text{C}$

Aspect: poudre orangé

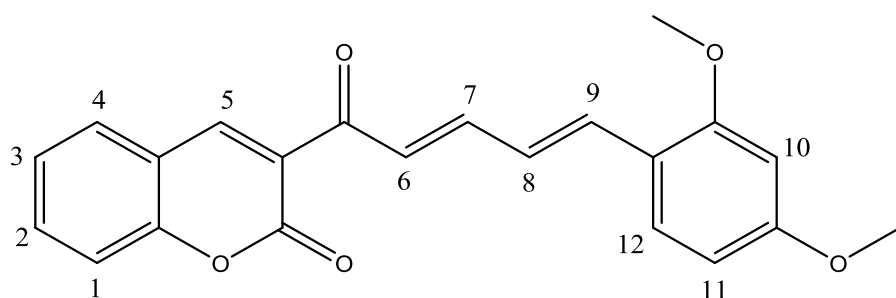
Rendement: 33%

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta(\text{ppm})=1,17(\text{t}, 6\text{H}, 2\text{CH}_3)$ ;  $3,38(\text{q}, 4\text{H}, 2\text{CH}_2)$ ;  $6,98(\text{d}, \text{H}_8, J=10\text{Hz})$ ;  $7,08(\text{dd}, \text{H}_7, J=10 \text{ et } 10,8\text{Hz})$ ;  $7,6(\text{dd}, \text{H}_6, J=9,6\text{Hz})$ ;  $7,57(\text{d}, \text{H}_5, J=9,6\text{Hz})$ ;  $6,54(\text{dd}, \text{H}_2, J=2,5 \text{ et } 9,2\text{Hz})$ ;  $7,33(\text{d}, \text{H}_3, J=9,2\text{Hz})$ ;  $7,23-7,31(\text{m}, 5\text{H}, \text{H}_9-\text{H}_{13})$ ;  $6,4(\text{d}, \text{H}_1, J=1,6\text{Hz})$ ;  $8,45(\text{s}, \text{H}_4)$  ;

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta(\text{ppm})=12,5$ ;  $30,6$ ;  $96,7$ ;  $108,7$ ;  $109,8$ ;  $116,8$ ;  $127,3$ ;  $127,8$ ;  $128,8$ ;  $131,8$ ;  $136,4$ ;  $141,2$ ;  $143,5$ ;  $148,6$ ;  $153$ ;  $158,6$ ;  $160,9$ ;  $186,4$ .

HRMS (ESI):  $m/z$  [  $\text{M}+\text{Na}$  ] $^+$  calculée pour  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ :  $373,17$ ; trouvée:  $396,158$

### 3-((2E,4E)-5-(2,4-Dimethoxyphenyl)penta-2,4-dienoyl)-2H-chromen-2-one (6A)





Masse molaire : 362,38g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub> : 195°C

Aspect: poudre rouge

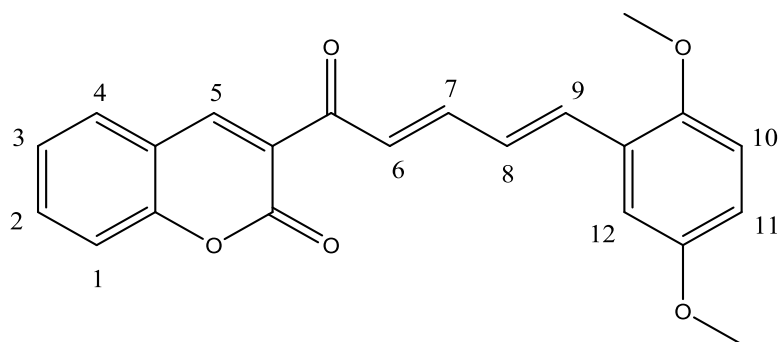
Rendement: 31%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 3,88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub> ortho) ; 3,92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub> para) ; 6,54-6,56 (2d, H<sub>11</sub>et H<sub>12</sub>, J=8, J=2.4Hz) ; 6,48 (d, H<sub>1</sub>, J=2Hz) ; 7,34-7,43 (m, H<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>), 7,63 (s,H<sub>10</sub>) ; 7,65- 7,69 (dd, H<sub>7</sub> et H<sub>8</sub>, J=18Hz); 7,89 (d, H<sub>9</sub> J=16Hz) ; 8,17 (d, H<sub>6</sub>, J=16Hz) ; 8,56 (s, H<sub>5</sub>) ;

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 55,5 ; 98,4 ; 105,6 ; 116,6 ; 117,2 ; 118,72 ; 121,9 ; 124,8 ; 126,1 ; 129,8 ; 131,1 ; 133,8 ; 140,7 ; 147,3 ; 155,1 ; 159,3 ; 160,73 ; 163,5 ; 186,8;

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>: 362,12; trouvée: 385,015.

### 3-((2E,4E)-5-(2,5-Dimethoxyphenyl)penta-2,4-dienoyl)-2H-chromen-2-one (7A)



Masse molaire: 362, 38 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub> : 132°C

Aspect: poudre jaune fluorescente

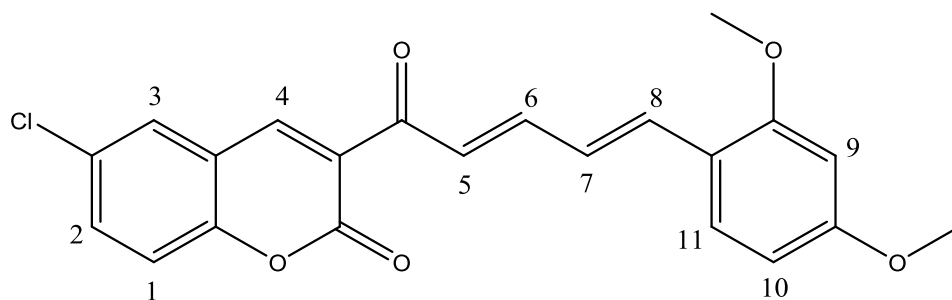
Rendement: 36%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 3,75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub> ortho) ; 3,81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub> méta) ; 6,48 (d,H<sub>1</sub>, J=8Hz) ; 6,79 (d, H<sub>10</sub>, J=8,8 Hz) ; 6,88 (dd, H<sub>11</sub>, J<sub>1</sub>= 6Hz, J<sub>2</sub>= 2,4 Hz) ; 7,14 (d, H<sub>12</sub>, J=3,2 Hz) ;7,36 (dd, H<sub>8</sub>, J=14,4 Hz) ;7,38 (dd, H<sub>7</sub>, J= 14,4 Hz), 7,58 (m, H<sub>2</sub> et H<sub>3</sub>) ;7,86 (d, H<sub>9</sub>, J=16Hz) ; 8,1 (d, H<sub>6</sub>, J=16Hz), 8,17 (d, H<sub>4</sub>, J=7,2Hz) ,8,48 (s, H<sub>5</sub>) ;

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 55,9 ; 56,2 ; 112,6 ; 113,4 ; 116,7 ; 118,2 ; 118,6 ; 124,4 ; 124,6 ; 124,9 ; 125,7 ; 129,9 ; 134 ; 140 ; 147,7 ; 153,6 ; 153,7 ; 155,2 ; 159,3;

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>: 362,12; trouvée: 385,015.

### 6-Chloro-3-[5-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-penta-2,4-dienoyl]-chromen-2-one (8A)



Masse molaire : 396.82 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub> : 80°C

Aspect: des cristaux sous forme d'aiguilles

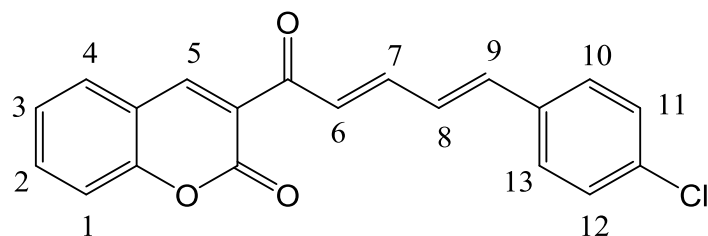
Rendement: 20%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)=3,77 (s, 3H, OMe ortho) ; 3,88 (s, 3H, OMe para) ; 6,34(s, H<sub>9</sub>) ; 6,38(dd, 2H, H<sub>10</sub> et H<sub>11</sub>, J=8Hz) ; 6,4 (dd, H<sub>7</sub>, J=16Hz) ; 6,7 (d, H<sub>5</sub>, J=15,5Hz) ; 7,36 (d, H<sub>8</sub>, J=16Hz) ; 7,43(dd, 2H, H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub>, J=8,4Hz) ; 7,57 (dd, H<sub>6</sub>, J=15,5Hz) ; 7,99 (s, H<sub>3</sub>) ; 8,47(s, H<sub>4</sub>) ;

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 55,4 ; 60,1, 98,5 ; 105,2 ; 116,2 ; 116,7 ; 130,4 ; 139,9 ; 145 ; 153 ; 159,8 ; 162,6 ; 167,9 ; 182,5, 199,1 ;

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>ClO<sub>5</sub>: 396,08; trouvée 418,9755.

### 3-((2E,4E)-5-(4-Chlorophenyl)penta-2,4-dienyl)-2H-chromen-2-one (9A)



Masse molaire : 336,77 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub> : 270°C

Aspect: poudre jaune

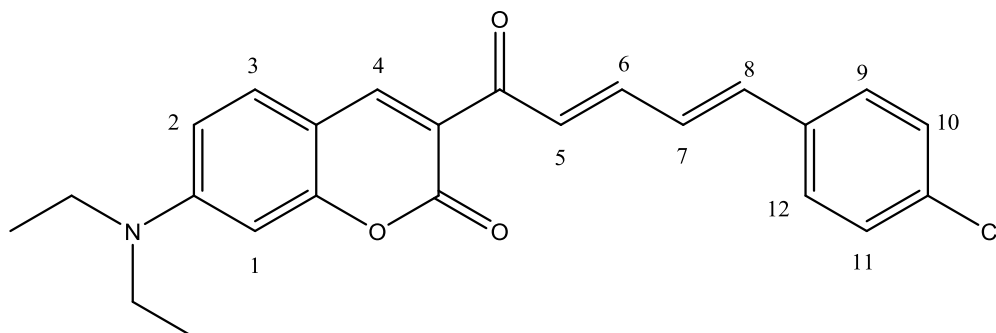
Rendement: 27%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 8,61(s, H<sub>5</sub>) ; 8,42(d, H<sub>4</sub>, J=6,8Hz) ; 7,86 (d, H<sub>10</sub> et H<sub>13</sub>, J=5,6Hz) ; 8,25(d, H<sub>11</sub> et H<sub>12</sub>, J=6,8Hz) ; 7,45(d, H<sub>6</sub>, J=14,4Hz) ; 7,52(dd, H<sub>8</sub>, J=15,6Hz) ; 7,64(dd, H<sub>7</sub>, J=15,6Hz) ; 7,71 (d, H<sub>9</sub>, J=14,4Hz) ; 7,53 (dd, H<sub>3</sub>, J=1,2 et J=8,4Hz) ; 7,52 (dd, H<sub>2</sub>, J=8 et J=2,4Hz) ; 7,47 (dd, H<sub>1</sub>, J= 4,4 et J= 7,2Hz) ;

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm)= 112,8 ; 116,0 ; 116,7 ; 117,8 ; 118,2 ; 119,2 ; 123,7 ; 124,8 ; 125,3 ; 126,7 ; 128,4 ; 130,9 ; 132,5 ; 141,8 ; 150,8 ; 153,9 ; 162,4.

HRMS (ESI):  $m/z$  [  $M+Na$  ]<sup>+</sup> calculée pour  $C_{20}H_{13}ClO_3$ : 336,77 trouvée 336,06 ; 338,05 ; 337,08

**3-((2E,4E)-5-(4-Chlorophenyl)penta-2,4-dienoyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one (10A)**



Masse molaire : 407,13  $g \cdot mol^{-1}$

$P_f$  : 149°C

Aspect: poudre orangé

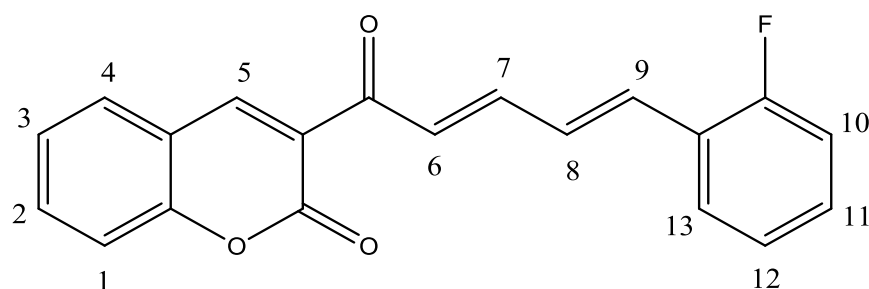
Rendement: 24%

$^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$ (ppm)= 1,13 (t, 6H, 2 $CH_3$ ) ; 3,5(q, 4H, 2 $CH_2$ ) ; 6,5 (d,  $H_8$ ,  $J=12,4Hz$ ) ; 6,63 (dd,  $H_7$ ,  $J=13,2 Hz$ ) ; 6,65 (d,  $H_5$ ,  $J= 12,4Hz$ ), 7,4 (dd,  $H_6$ ,  $J=16,4Hz$ ) ; 7,45 (d,  $H_{10}$  et  $H_{11}$ ,  $J=9,2Hz$ ) ; 7,517 (d,  $H_9$  et  $H_{12}$ ,  $J=7,2$ ) ; 7,08(d,  $H_2$ ,  $J=10Hz$ ) ; 7,03(s,  $H_1$ ) ; 7,67(d,  $H_3$ ,  $J=9,6Hz$ ) ; 8,55(s,  $H_4$ ) ;

$^{13}C$  RMN (100 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$ (ppm)= 12,3; 44,4; 44,4; 95,8; 107,4; 110,1; 115; 115,5; 127,3; 127,5; 128,4; 128,8; 129; 132,3; 132,4; 136,1; 141,3; 142,7; 147,6; 148,2; 152,9; 158,2; 158,2; 194,2 .

HRMS (ESI):  $m/z$  [  $M+Na$  ]<sup>+</sup> calculée pour  $C_{24}H_{22}ClNO_3$  : 407,13 trouvée : 407,13 ; 409,13 ; 408,13.

**3-((2E,4E)-5-(2-Fluorophenyl)penta-2,4-dienoyl)-2H-chromen-2-one (11A)**



Masse molaire: 320, 21 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 240°C

Aspect: poudre jaune pale

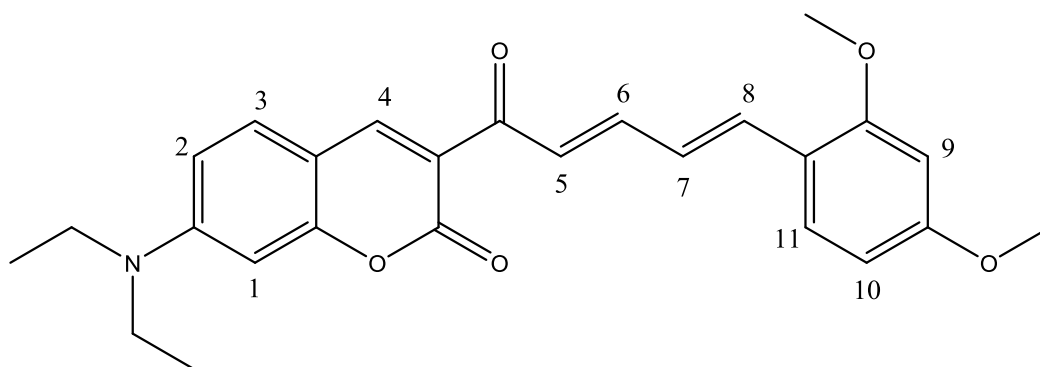
Rendement: 71%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)=8,61(s, 1H, H<sub>5</sub>); 8,42 (d, H<sub>4</sub>, J=6,8Hz); 8 (d, H<sub>1</sub>, J=5,6Hz); 8,25(dd, H<sub>2</sub>, J=8Hz); 7,45(d, H<sub>6</sub>, J=14,4Hz); 7,52(d, H<sub>8</sub>, J=15,6Hz); 7,64(d, H<sub>7</sub>, J=15,6Hz); 7,71(d, H<sub>9</sub>, J=14,4Hz); 7,53(dd, H<sub>3</sub>, J=7,2Hz); 7,52 (d, H<sub>13</sub>, J=8Hz); 7,47ppm (dd, H<sub>11</sub> et H<sub>12</sub>, J=8 et J=1,2Hz); 6,9 (d, H<sub>10</sub>, J=7,5Hz).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)= 116; 116,7; 119,2; 123,7; 124,8; 125,3; 126,7; 128,4; 130,9; 132,5; 135,5; 135,3; 150,8; 159,7; 162,4; 165,1.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>FO<sub>3</sub>: 320,21 trouvée : 320,08 et 321,09.

**7-(Diethylamino)-3-((2E,4E)-5-(2,4-dimethoxyphenyl)penta-2,4-dienoyl)-2H-chromen-2-one (12A)**



Masse molaire: 433,50g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 155°C

Aspect: poudre jaune doré

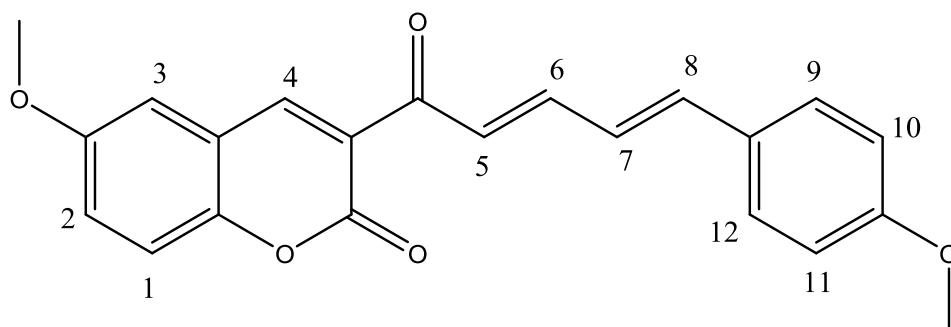
Rendement: 18%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)=1,12 ppm (t, 6H, 2CH<sub>3</sub>); 3,32 (q, 4H, 2CH<sub>2</sub>); 3,84 ppm (s, 3H, OCH<sub>3</sub> ortho); 3,92(s, 3H, para); 6,5 (d, H<sub>9</sub>, J=1,6Hz); 6,68 (2d, H<sub>10</sub>, J=8Hz, et H<sub>5</sub>, J=15,2 Hz); 6,55 (dd, H<sub>7</sub>, J=16Hz); 6,8 (d, H<sub>2</sub>, J=7,6 Hz); 7,4 (d, H<sub>3</sub>, J=8Hz); 7,51 (dd, H<sub>6</sub>, J=15,5 Hz); 7,77 (d, H<sub>8</sub>, J=16 Hz); 8 (d, H<sub>1</sub>, J=2,4 Hz); 8,5 (s, H<sub>4</sub>);

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)= 12,5; 30,2; 44,6; 96; 107,6; 110,3; 115,2; 122; 126; 128; 132,6; 147,8; 153,1; 155; 158,4; 160; 188,8.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub>: 433,50 trouvée : 433,19

**6-methoxy-3-((2E,4E)-5-(4-methoxyphenyl)penta-2,4-dienoyl)-2H-chromen-2-one (13A)**



Masse molaire: 362,38 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 289°C

Aspect: poudre jaune

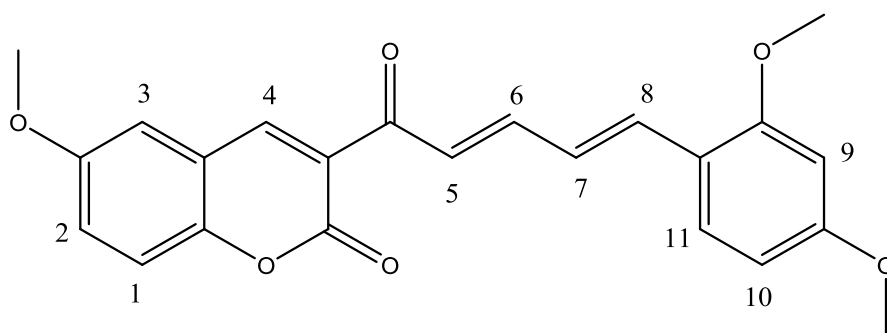
Rendement: 14%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3,77 (s, 3H); 3,8 (s, 3H); 6,25 (d, H<sub>5</sub>, J=17,6Hz); 6,86 (d, H<sub>8</sub>, J= 12,8Hz); 6,93 (d, H<sub>2</sub>, J=8,8Hz); 7,26-7,32 (2d, H<sub>9</sub>-H<sub>12</sub>, J=7,6Hz); 7,4 (dd, H<sub>7</sub>, J=16Hz); 7,46 (s, H<sub>3</sub>); 7,58 (dd, H<sub>6</sub>, J= 16Hz); 7,76 (d, H<sub>1</sub>, J=8,8Hz); 8,43 (s, H<sub>4</sub>);

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 55,4; 55,6; 106; 113,7; 114,3; 114,6; 116,7; 118,3; 121,7; 124,5; 125; 128,5; 130,3; 134,4; 143; 146,4; 147,5; 152,7; 155,3; 159,2; 188,7.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>: 362,38 trouvée :362,12.

**3-((2E,4E)-5-(2,4-dimethoxyphenyl)penta-2,4-dienoyl)-6-methoxy-2H-chromen-2-one (14A)**



Masse molaire: 392,41 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 292°C

Aspect: poudre jaune orangé

Rendement: 13%

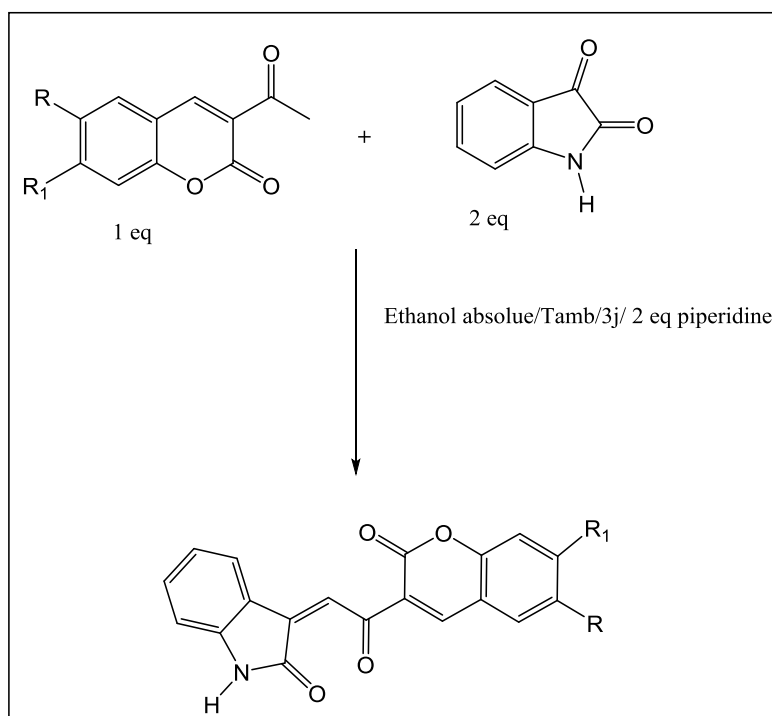
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) = 3,8(s, 3H); 3,81 (s, 3H); 3,82 (s, 3H); 6,9(d, 1H, H<sub>10</sub>, J=7,6Hz); 6,97(d, 1H, H<sub>5</sub>, J=14Hz); 7,1 (s, H<sub>9</sub>, 1H); 7,12 (dd, 1H, H<sub>7</sub>); 7,27 (dd, 1H, H<sub>6</sub>);

7,57(d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,45(d, 1H, H<sub>2</sub>,  $J=7,6\text{Hz}$ ); 7,65 (s, 1H, H<sub>3</sub>); 7,89 (d, 1H, H<sub>1</sub>,  $J=7,2\text{Hz}$ ); 7,93 (d, 1H, H<sub>11</sub>,  $J=7,2\text{Hz}$ ); 8,8 (s, 1H, H<sub>4</sub>);

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 55,8 ; 56,2 ; 98,5 ; 105,9 ; 111 ; 117,9 ; 118 ; 118,7 ; 121 ; 122,9 ; 125 ; 131,2 ; 134 ; 143 ; 145,2 ; 146 ; 151,7 ; 157, 158,9 ; 161 ; 184.

HRMS (ESI):  $m/z$  [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>: 392,41 trouvée : 392,13.

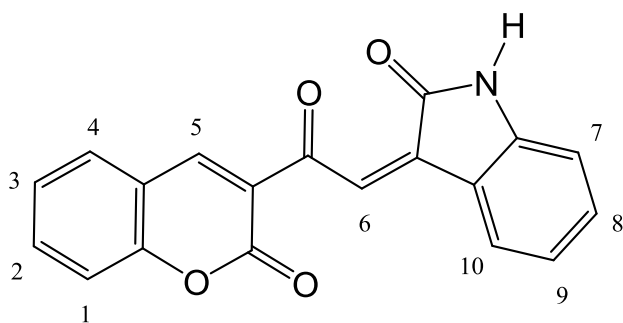
## II.2.2. Condensation des 3-acétylcoumarines et d'isatine



### Mode Opératoire

Dans un ballon approprié, 2 mmole de coumarine et 1 mmole d'isatine dans l'éthanol sont chauffés au reflux jusqu'à la dissolution complète des réactifs, puis 2 mmole de pipéridine sont ajoutés. Ensuite le mélange réactionnel est laissé sous reflux pendant 3 jours. Une fois la réaction est terminée, on évapore le solvant et notre produit est directement obtenu.

### (cis)-3-(2-oxo-2-(2-oxo-2H-chromen-3-yl) ethylidene) indolin-2-one: 1B



Masse molaire : 317,07 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 212°C

Rendement: 65%

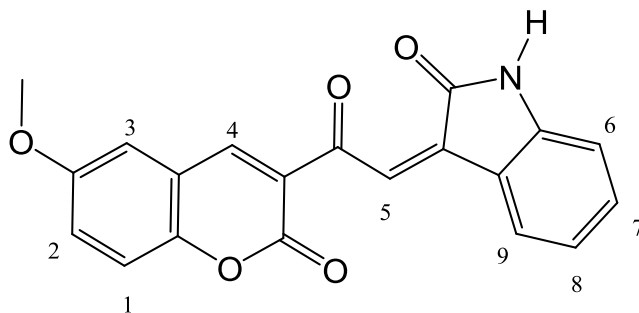
Aspect: cristaux marron

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 6,93 (d, H<sub>10</sub>, J=8Hz); 6,98 (dd, H<sub>9</sub>, J=4,4Hz) ; 7,15(dd,H<sub>1</sub>, J= 8Hz et 1,2 Hz) ; 7,32(s, H<sub>6</sub>) ;7,35(d, H<sub>4</sub>, J=8Hz) ;7,43 (dd, H<sub>2</sub> et H<sub>3</sub>, J=7,5Hz) ; 7,57(dd, H<sub>8</sub>, J=8Hz et 1,2Hz) ; 7,64 (d, H<sub>7</sub>, J=7,6Hz) ; 8,1 (1s,1H ,NH), 8,5 (s, H<sub>5</sub>) ;

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):δ(ppm)=111; 157; 113,8; 123; 143; 130; 159; 133,9; 162; 187,5; 135; 157,7; 163,6; 126,5; 124,2; 128; 121; 135,8.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub> : 317,07 trouvée :317,00.

**(cis)-3-(2-(6-methoxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-2-oxoethylidene) indolin-2-one: 2B**



Masse molaire: 347,32 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>:222°C

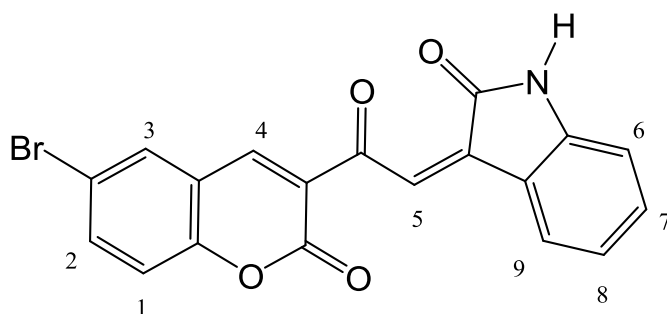
Aspect: poudre marron foncée

Rendement: 60%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):δ(ppm)= 3,8(1s ,3H,OMe) ; 6,93 (d, H<sub>9</sub>, J=8Hz); 6,98 (d, H<sub>2</sub>, J=4,4Hz) ; 7,15(dd, H<sub>8</sub>, J= 8Hz et 1,2 Hz) ; 7,18 (d, H<sub>1</sub>, J=7,2Hz) ; 7,32 (s, H<sub>5</sub>) ; 7,35(s, H<sub>3</sub>) ; 7,57(dd, H<sub>7</sub>, J=8 et 1,2Hz) ; 7,64 (d, H<sub>6</sub>, J=7,6Hz) ; 8,1 (1s,1H , NH), 8,5 (s, H<sub>4</sub>) ;

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 56,5; 112; 158; 113,8; 123; 143; 130; 159; 133,9; 162; 187,5; 135; 157,7; 163,6; 126,5; 124,2; 128; 121; 135,8.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub> : 347,32 trouvée : 347,08.

**(cis)-3-(2-(6-bromo-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-2-oxoethylidene) indolin-2-one: 3B**

Masse molaire: 396,19 g.mol<sup>-1</sup>

Pf: 150°C

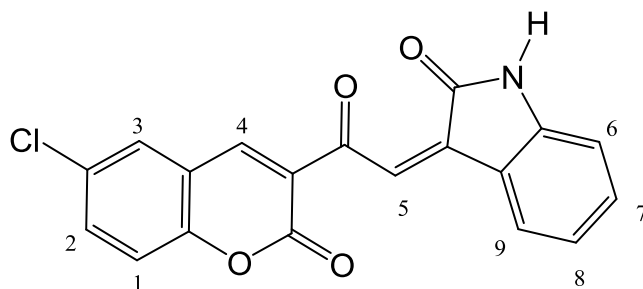
Aspect: poudre brun foncée

Rendement: 53%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)= 9,8(s,1H, NH); 8,46(s, H<sub>4</sub>); 8,05(d, H<sub>9</sub>, J=8Hz); 7,96 (s, H<sub>3</sub>); 7,62(d, H<sub>2</sub>, J=7,2Hz); 7,34(dd, H<sub>7</sub>, J=8,4Hz et 2,8Hz); 7,22(d, H<sub>1</sub>, J=6,8Hz); 7,07(dd, H<sub>8</sub>, J=8,4 et 1,2Hz); 6,74 (d, H<sub>6</sub>, J=6,4Hz); 6,71 (s, H<sub>5</sub>);

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)= 116; 116,4; 121,2; 122,2; 127,2; 130,6; 137; 139; 143; 145; 150; 115; 158; 172; 188.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>BrNO<sub>4</sub>: 396,19 trouvée : 394,98 ; 396,98 ; 397,98.

**(cis)-3-(2-(6-chloro-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-2-oxoethylidene) indolin-2-one: 4B**



Masse molaire: 351,74 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 225 °C

Aspect: cristaux noirs

Rendement: 50%

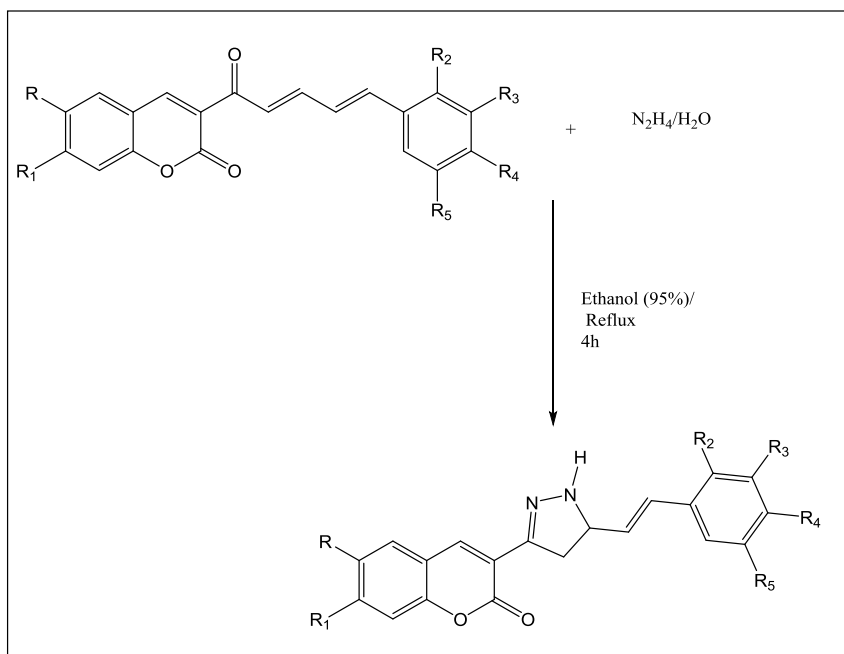
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)=9,9(s,1H, NH); 8,6(s, H<sub>4</sub>); 8,1(d, H<sub>9</sub>, J=8Hz); 8,0 (s, H<sub>3</sub>) ; 7,69 (d, H<sub>6</sub>, J=7,2Hz) ; 7,63(dd, H<sub>7</sub>, J=8,4 et 2,8Hz) ; 6,98(d, H<sub>1</sub>, J=6,8Hz) ; 6,81(dd, H<sub>8</sub>, J=8,4 et 1,2Hz) ; 6,73 (d, H<sub>2</sub>, J=6,4Hz) ; 6,94 (s, H<sub>5</sub>) ;

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 110,3 ; 119,8 ; 121,2 ; 122,2 ; 122,9 ; 123 ; 127,2 ; 129,4 ; 130,1 ; 130,6 ; 135,6 ; 139,7 ; 154,7 ; 160,6 ; 176,6 ; 181.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>ClNO<sub>4</sub>: 351,74 trouvée : 351,03 ; 353,03 ; 352,03 .

### III. Action des dérivés azotés sur les chalcones de la première série

#### III.1. Réactivité des chalcones synthétisées vis-à-vis l'hydrazine



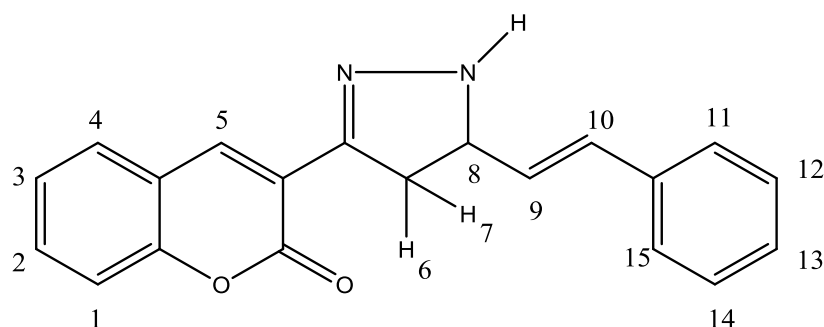
#### Mode Opératoire

A une solution d'hydrazine (20 mmole) dans l'éthanol (50 mL), on a ajouté 2,5 mmole de chalcone synthétisée. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux et sous agitation pendant 4h.

A la fin de la réaction, on a traité le mélange réactionnel avec l'eau et on a extrait la phase organique, cette phase est ensuite lavée deux fois successive avec une solution saturé de carbonate de sodium.

Après évaporation du solvant de l'extraction sous pression réduite, on a obtenu un solide qui a subi une recristallisation à chaud avec le mélange cyclohexane/ acétate d'éthyle (3/2).

**(E)-3-(5-styryl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)-2H-chromen-2-one: 1C**



Masse molaire: 316,35 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 114°C

Aspect: poudre rouge

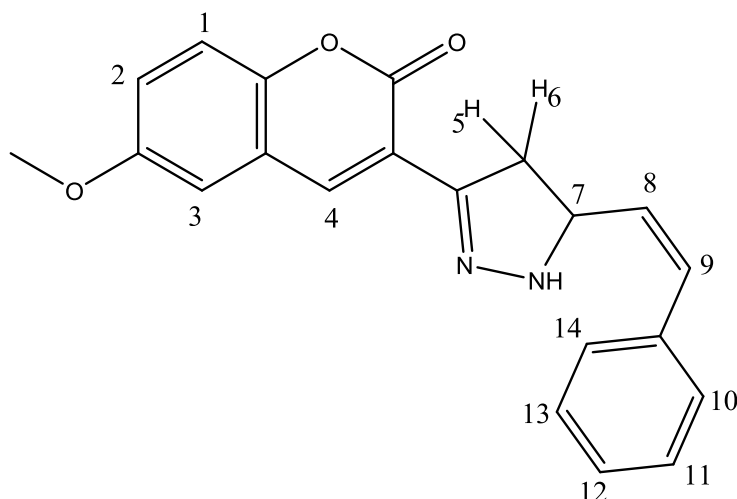
Rendement: 43%

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)=2,89 (d, H<sub>6</sub>) ; 2,97(d, H<sub>7</sub>) ; 3,29(q, H<sub>8</sub>) ; 6,79 (2d, H<sub>9</sub>, J=16Hz) ; 6,81 (d, H<sub>4</sub>, J=8,4Hz) ; 6,87 (d, H<sub>1</sub>, J= 8,4Hz) ; 6,91 (dd, H<sub>2</sub>, J= 8,4 et J= 1,2Hz) ; 7,02 (dd, H<sub>3</sub>, J=9,2 et J= 1,6Hz) ; 7,13 (d, H<sub>10</sub>, 17,2Hz) ; 7,5 (m, H<sub>11</sub>-H<sub>15</sub>) ; 8,66 (s, H<sub>5</sub>) ; 10,97 (s, NH);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 29,7 ; 38,8 ; 116,6 ; 117,5 ; 118,9 ; 119,5 ; 120 ; 129,5 ; 130 ; 132,7 ; 133,9 ; 147 ; 158 ; 160 ; 165.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> : 316,35 trouvée : 316,12.

**(z)-6-methoxy-3-(5-styryl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)-2H-chromen-2-one:2C**



Masse molaire: 346,38 g.mol<sup>-1</sup>

Pf: 130°C

Aspect: poudre noir

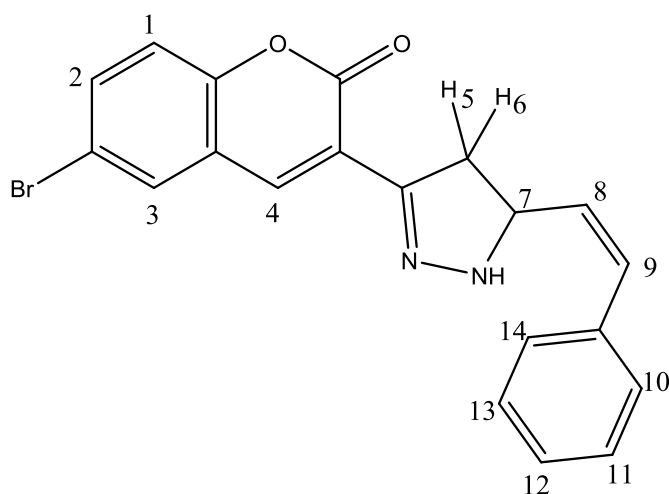
Rendement: 40%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 2,14 (d, H<sub>5</sub>) ; 2,18 (d, H<sub>6</sub>) ; 3,83 (q, H<sub>7</sub>) ; 3,7 (s, 3H, OMe) ; 10,92 (s, 1H, NH) ; 8,7 (s, H<sub>4</sub>) ; 8,5 (d, H<sub>3</sub>, J=3,2Hz) ; 7,85 (dd, H<sub>1</sub>, J=7,2 et J=2,8Hz) ; 6,81 (d, H<sub>9</sub>, J=11,6Hz) ; 6,97-7,03 (m, H<sub>10</sub>-H<sub>14</sub>) ; 6,8-6,84 (2d, H<sub>8</sub>, J=6Hz (H-C sp<sup>2</sup>), J=11Hz) ; 6,9 (dd, H<sub>2</sub>, J=8,8 et J=2,8Hz).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 29,71 ; 38,8 ; 55,8 ; 111 ; 118,6 ; 119,2 ; 121,5 ; 124,5 ; 126 ; 128,5 ; 129 ; 131,5 ; 134,5 ; 135,5 ; 136,3 ; 147 ; 156 ; 158,9 ; 164.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> : 346,38 trouvée : 346,13.

**(z)-6-bromo-3-(5-styryl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)-2H-chromen-2-one: 3C**



Masse molaire: 395,25

P<sub>f</sub>: 160°C

Aspect: poudre marron claire

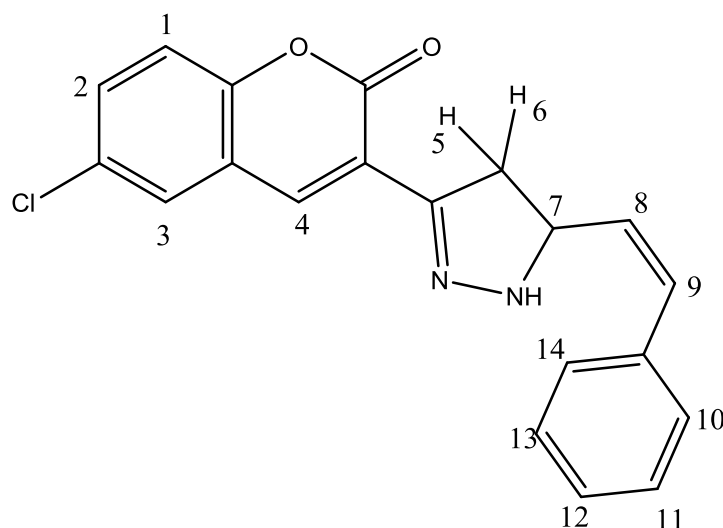
Rendement: 35%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 2,14(d, H<sub>6</sub>) ; 2,18 (d , H<sub>5</sub>) ; 3,83ppm (q , H<sub>7</sub>), 11,26 (s,NH) ; 8,66 (s , H<sub>3</sub>) ;7,8 (s, H<sub>4</sub>) ;7,49-7,51 (m, H<sub>10</sub>-H<sub>14</sub>) ;6,85 (d, H<sub>8</sub>, J=8,8 Hz) ; 6,96 (d,H<sub>9</sub> , J=9,2Hz) ; 7,22(d ,H<sub>1</sub>, J=7,2Hz) ; 7,31(d, H<sub>2</sub>, J=7,5Hz) ;

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :δ(ppm)= 29,7; 38,8;118,6; 119,2; 121,5; 124,5; 126; 128,5; 129; 131,5; 134,5; 135,5; 136,3;146,5; 156; 158,9; 164.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 395,25 trouvée : 394,03 ; 396,03 ; 397,03.

**(Z)-6-chloro-3-(5-styryl-4, 5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)-2H-chromen-2-one: 4C**



Masse molaire: 350, 80 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 158°C

Aspect: poudre marron clair

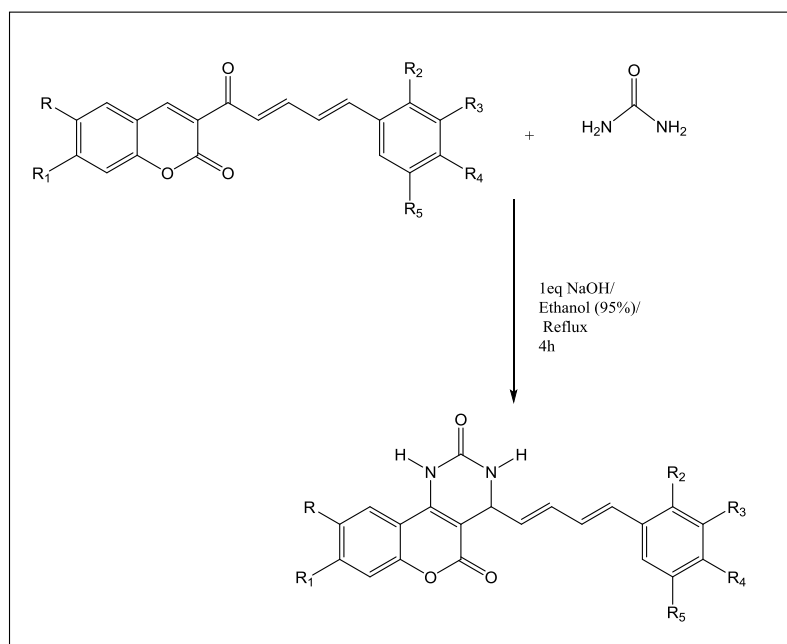
Rendement: 30%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 11,2 (1H,NH) ;8,58 (s , H<sub>3</sub>) ; 8,36 (s, H<sub>4</sub>) ;2,19 (d , H<sub>5</sub>) ; 2,57 (d, H<sub>6</sub>) ; 3,58 (q , H<sub>7</sub>) ; 6,8 (d, H<sub>9</sub>, J=8,8 Hz) ; 6,878 (2d, H<sub>8</sub>, J=9,6 Hz et J=4 Hz) ; 7,26 (d, H<sub>1</sub>, J=7,2Hz) ; 7,29 (d, H<sub>2</sub>, J=7,5Hz) ;7,21 (q, H<sub>12</sub>) ;7,06-7,09(2d , H<sub>10</sub> etH<sub>14</sub>, J=8,4Hz) ;6,91-6,99 (m, H<sub>11</sub> et H<sub>13</sub>).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta(\text{ppm}) = 25,6 ; 34,9 ; 117,9 ; 118,3 ; 118,8 ; 124,5 ; 128,4 ; 129,6 ; 131 ; 131,5 ; 132,2 ; 133,5 ; 144,9 ; 158,2 ; 158,4 ; 160,8 ; 164,1$ .

HRMS (ESI):  $m/z$  [  $\text{M}+\text{Na}$  ] $^+$  calculée pour  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$ : 350,80 trouvée : 350,08 ; 352,08 ; 351,09.

### III.2. Réactivité des chalcones synthétisées vis-à-vis l'urée

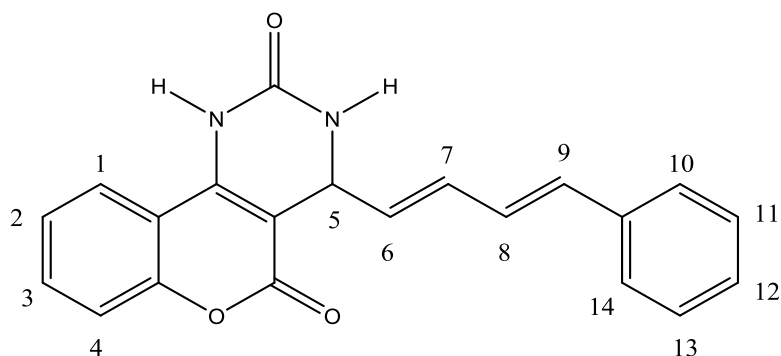


#### Mode Opérateur

Dans un ballon de 100mL, un mélange d'une mmole de chalconne synthétisée avec une mmole d'urée et une mmole de NaOH en présence d'EtOH, comme solvant, est mis à reflux pendant 4h.

A la fin de la réaction, on a neutraliser le mélange avec une solution de HCl (N=1%) et on a extrait la phase organique avec l'AcOEt. Cette phase organique est ensuite évaporée sous pression, le solide obtenu est ensuite recristallisé avec le mélange cyclohexane/AcOEt.

**4-((1E, 3E)-4-phenylbuta-1,3-dien-1-yl)-3,4-dihydro-1H-chromeno[4,3-d]pyrimidine-2,5-dione : 1D**



Masse molaire: 346,36 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 150°C

Aspect: poudre marron

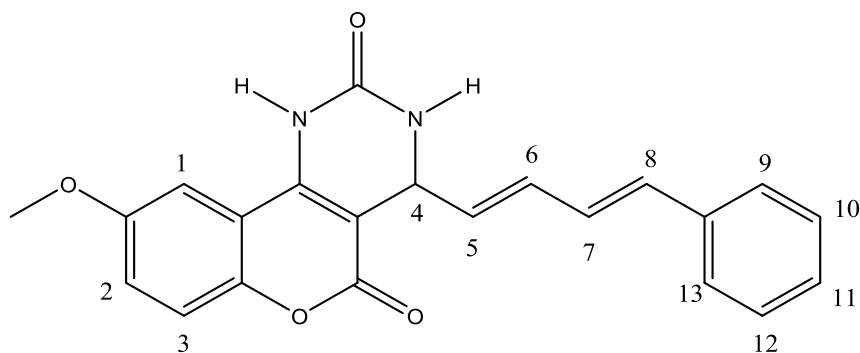
Rendement: 30%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)=5,4 (d, H<sub>5</sub>) ; 6,74 (d, H<sub>6</sub>, J=15,2Hz) ; 6,87 (dd, H<sub>7</sub>, J=15,2Hz) ; 7,25 (dd, H<sub>8</sub>, J=15,2Hz) ; 7,89 (d, H<sub>9</sub>, J=16Hz), 7,30ppm (s, NH) ; 7,33-7,43 (m, H<sub>10</sub>-H<sub>14</sub>) ; 10,25 (s, NH) ; 9,6 (d, H<sub>1</sub>, J=7,6 Hz) ; 7,52-7,62 (m, H<sub>2</sub> et H<sub>4</sub>) ; 7,71-7,74 (dd, H<sub>3</sub>, J=9,2Hz)

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm)=60,4 ; 116,7 ; 120,7 ; 122, 126,1 ; 127 ; 127,3 ; 128,6 ; 128,7 ; 128,8 ; 129,2 ; 129,4 ; 129,6 ; 131,8 ; 136,2 ; 141,7 ; 143,6 ; 151,1 ; 156.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> : 346,36 trouvée : 344,12.

**9-methoxy-4-((1E, 3E)-4-phenylbuta-1, 3-dien-1-yl)-3,4-dihydro-1H-chromeno[4,3-d]pyrimidine-2,5-dione: 2D**



Masse molaire: 376,14 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 214°C

Aspect: poudre jaune foncée

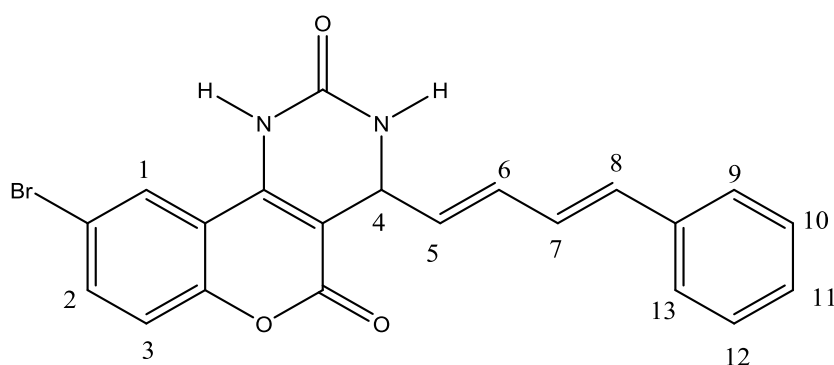
Rendement: 21%

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta(\text{ppm})= 3,8(\text{s},3\text{H})$  ;  $5,4(\text{d}, \text{H}_4)$  ;  $7,3(\text{m}, \text{H}_{10}\text{-H}_{12})$  ;  $7,24(\text{s}, \text{H}_1)$  ;  $7,42(\text{d}, \text{H}_2, J=7,2\text{Hz})$  ;  $7,45(\text{s}, \text{NH})$  ;  $7,57(\text{dd}, \text{H}_9 \text{ et } \text{H}_{13}, J= 2,4\text{Hz et } 10,4 \text{ Hz})$  ;  $7,61(\text{d}, \text{H}_3, J=10,4\text{Hz})$  ;  $8,4(\text{s},\text{NH})$  ;  $6,95(\text{d}, \text{H}_5, J=16\text{Hz})$  ;  $6,98(\text{dd}, \text{H}_6, J=16\text{Hz})$  ;  $7,02(\text{d}, \text{H}_8, J=16\text{Hz})$  ;  $7,16(\text{dd}, \text{H}_7, J=12\text{Hz})$ .

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta(\text{ppm})= 52$  ;  $55,9$  ;  $108$  ;  $111$  ;  $117,8$  ;  $118,9$  ;  $112,6$  ;  $125,5$  ;  $127,3$  ;  $127,4$  ;  $128,9$  ;  $129,4$  ;  $136,1$  ;  $142,7$  ;  $145,2$  ;  $147,7$  ;  $156,4$  ;  $159,5$ .

HRMS (ESI):  $m/z$  [  $\text{M}+\text{Na}$  ] $^+$  calculée pour  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$  : 376,14 trouvée : 374,13.

**9-bromo-4-((1E, 3E)-4-phenylbuta-1, 3-dien-1-yl)-3,4-dihydro-1H-chromeno [4,3-d]pyrimidine-2,5-dione : 3D**



Masse molaire:  $424,02 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Pf:  $123^\circ\text{C}$

Aspect: poudre marron foncé

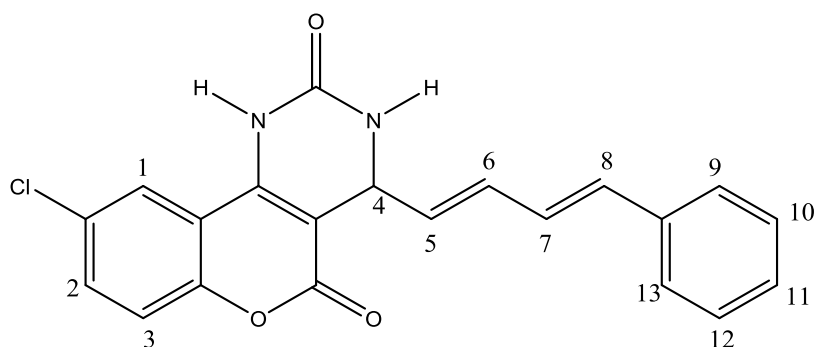
Rendement: 37%

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta(\text{ppm})= 6,03(\text{d}, \text{H}_4)$  ;  $6,1(\text{d}, \text{H}_5, J=16\text{Hz})$  ;  $6,75(\text{dd}, \text{H}_6, J=14\text{Hz})$  ;  $6,97(\text{dd}, \text{H}_7, J=14,8\text{Hz})$  ;  $7,3(\text{m}, \text{H}_9\text{-H}_{13})$  ;  $7,48(\text{d}, \text{H}_8, J=16,4\text{Hz})$  ;  $7,56(\text{d}, \text{H}_3, J=7,2\text{Hz})$  ;  $7,66(\text{s}, \text{NH})$  ;  $7,8(\text{d}, \text{H}_2, J=6\text{Hz})$  ;  $8,05(\text{s}, \text{H}_1)$  ;  $8,9(\text{s}, \text{NH})$  ;

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta(\text{ppm})= 58,7$  ;  $101,9$  ;  $117$  ;  $118$  ;  $120$  ;  $127$  ;  $128,5$  ;  $129,3$  ;  $130$  ;  $131$  ;  $133$  ;  $135$  ;  $144$  ;  $144,7$  ;  $150$  ;  $151,6$  ;  $167,2$ .

HRMS (ESI):  $m/z$  [  $\text{M}+\text{Na}$  ] $^+$  calculée pour  $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{BrN}_2\text{O}_3$  : 424,02 trouvée : 422,03 ; 424,02 ; 425,03.

**9-chloro-4-((1E,3E)-4-phenylbuta-1,3-dien-1-yl)-3,4-dihydro-1H-chromeno[4,3-d]pyrimidine-2,5-dione : 4D**



Masse molaire: 378, 81 g.mol<sup>-1</sup>

Pf: 103°C

Aspect: poudre marron foncée

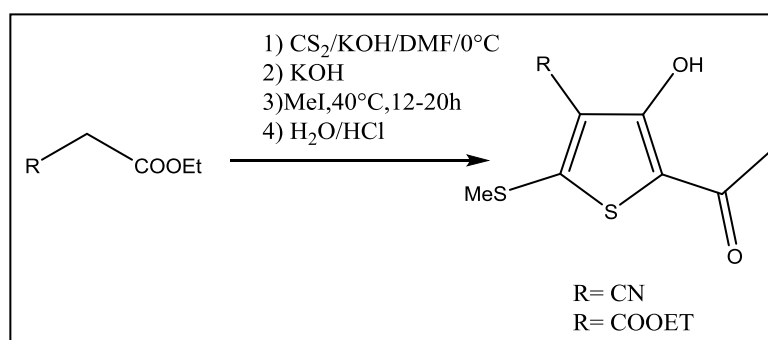
Rendement: 35%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 5,92 (d, H<sub>4</sub>) ; 6,53 (d, H<sub>5</sub>, J=15,2 Hz) ; 6,75(dd, H<sub>6</sub>, J=14,4Hz) ; 6,82 (s, 1H, NH) ; 7,1 (dd, H<sub>7</sub>, J=16,8Hz) ; 7,25 (m,5H, H<sub>9</sub>-H<sub>13</sub>) ; 7,38 (d, H<sub>8</sub>, J=14Hz) ; 7,41 (d, H<sub>3</sub>, J=9,2Hz) ; 7,45 ( d, H<sub>2</sub>, J=9,6Hz) ; 7,9 (s, H<sub>1</sub>) ; 8,07 (s, 1H, NH) ;

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm)= 60,4 ; 117,9 ; 123,3 ; 123,5 ; 126,2 ; 126,9 ; 127,2 ; 127,4 ; 127,9 ; 128,9 ; 129 ; 129,3 ; 131,2 ; 136 ; 137,5 ; 140,4 ; 142,1 ; 144,1 ; 144,6 ; 154,5 ; 167,2.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 378,81 trouvée : 378,08 ; 380,07 ; 379,08.

#### IV. Synthèse des thiophènes



#### Mode Opérateur

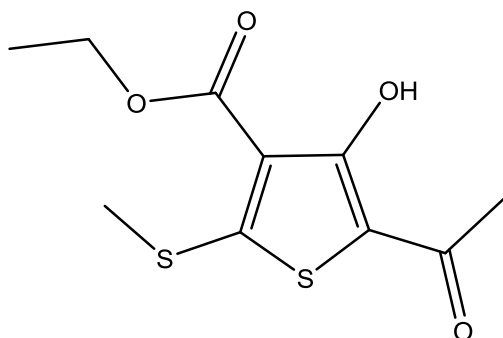
Dans un ballon tricol de 250mL muni d'un réfrigérant et d'un thermomètre, on a placé 150mmol de cyanoacétate d'éthyle, 9,05mL de disulfure de carbone ainsi que 200mL de DMF et on Laisser sous agitation quelques minutes à 0°C. Ensuite on a ajouté goutte à goutte



300mmol d'hydroxyde de potassium aqueux (16,83g dans 15mL d'eau), puis laissé sous agitation pendant 30min à 0°C. Après on a additionné goutte à goutte 175 mmol de chloroacétone. On a laissé le mélange sous agitation pendant 1h à 0°C. Puis on a ajouté de nouveau l'hydroxyde de potassium aqueux (150mmol) goutte à goutte. Une fois l'ajout est fini, on a augmenté doucement la température jusqu'à 40°C puis laisser sous agitation pendant 3h. Ensuite, on a rajouté goutte à goutte 150mmol d'iodure de méthyle pendant 30min. Laisser sous agitation pendant 12h à 50°C.

Quand la réaction est achevée, on a versé le mélange réactionnel sur 500mL d'eau glacée, y ajouter quelques gouttes d'acide chlorhydrique. Laisser reposer au réfrigérateur pendant 1h puis filtrer. Une fois la filtration est finie, on a recristallisé le produit obtenu dans l'isopropanol.

#### Ethyl 5-acetyl-4-hydroxy-2-(methylthio)thiophene-3-carboxylate



Masse molaire: 260,02 g.mol<sup>-1</sup>

P<sub>f</sub>: 127-128 °C

Aspect: poudre jaune

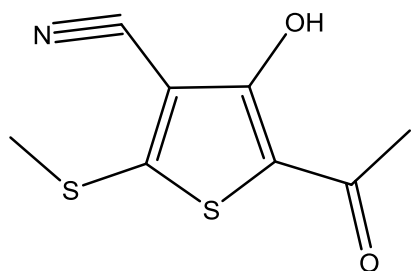
Rendement: 50 %

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 1,35(t, 3H, CH<sub>3</sub>) ; 2,25 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>) ; 2,52 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 4,31(q, 2H, CH<sub>2</sub>); 8,14 (s, 1H, OH);

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14,2; 18,26; 20,1; 62,3; 120,9; 138,2; 140,1; 154,3; 158,6; 199.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> : 260,02 trouvée : 260,00.

#### 5-acetyl-4-hydroxy-2-(methylthio) thiophene-3-carbonitrile



Masse molaire: 213 g.mol<sup>-1</sup>

Pf: 142°C

Aspect: poudre beige

Rendement: 54%

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 2,42(s,3H) ; 2,69 (s,3H, SMe); OH(s, 9,91)

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm)= 17,3; 27; 111; 111,5; 160; 166,1; 168,3; 195.

HRMS (ESI): m/z [M+Na]<sup>+</sup> calculée pour C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>: 213 trouvée : 212,99.

# **Chapitre IV: Tests Biologiques Sur Les Chalcones Synthétisées**

Dans ce présent chapitre, et après avoir présenté le principe de fonctionnement des phosphatases CDC25 et leurs rôles dans le cycle cellulaire, on présentera les techniques utilisées pour nos tests biologiques, suivis par les résultats d'une série de produits synthétisés.

## I. Les phosphatases CDC25

CDC25 est une phosphatase à double spécificité. La première a été isolée à partir de la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Comme d'autres protéines du cycle cellulaire tel que CDC2 et CDC4. « CDC » signifie "cell division cycle". Ces phosphatases à double spécificité sont des protéines tyrosine phosphatases (PTP). Les CDC25 déphosphorylent les CDK (Cyclin Dependant Kinases), ce qui permet leur activation et ainsi l'entrée et la progression dans le cycle cellulaire.<sup>91</sup>

### I.1. la structure

Chez l'Homme, il existe trois isoformes de CDC25 : A, B, C.

II. Elles sont toutes constituées de 470 à 580 acides aminés qui sont répartis en deux régions : la région N-terminale, qui est peu conservée et contient des sites de phosphorylation, d'ubiquitination, et de la régulation de l'activité de la phosphatase ; et la région C-terminale, qui est hautement conservée entre les espèces et contient le site catalytique.<sup>92</sup>

III. L'activité catalytique est effectuée par l'intervention d'une cystéine (Cys431 pour CDC25A, Cys473 pour CDC25B, et Cys377 pour CDC25C) qui est situé dans un motif HCX<sub>5</sub>R tel que c'est présenté en cas de CDC25B:

- Histidine 472 ..... **H : le résidu histidine**
  - Cysteine 473 ..... **C : la cystéine catalytique**
  - Acide Glutamique 474
  - Phénylalanine 475
  - Sérine 476
  - Sérine 477
  - Acide Glutamique 478
- 5X : la boucle permettant d'établir le lien entre la liaison hydrogène amide et le phosphate du substrat pour CDC25B**

<sup>91</sup> Strausfeld U, Labbé JC, Fesquet D et al. ; "Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein"; *Nature* ; 1991; 351 (6323): 242–245.doi:10.1038/351242a0. PMID 1828290

<sup>92</sup> Rudolph,J; CDC25 phosphatases: Structure, Specificity and Mecanism,;*Biochemistry* ;2007; 46(12); 3595-3604

- Arginine 479 ..... **R** : le résidu arginine nécessaire à la fixation au phosphate du substrat ainsi qu'à la stabilisation de cette liaison.

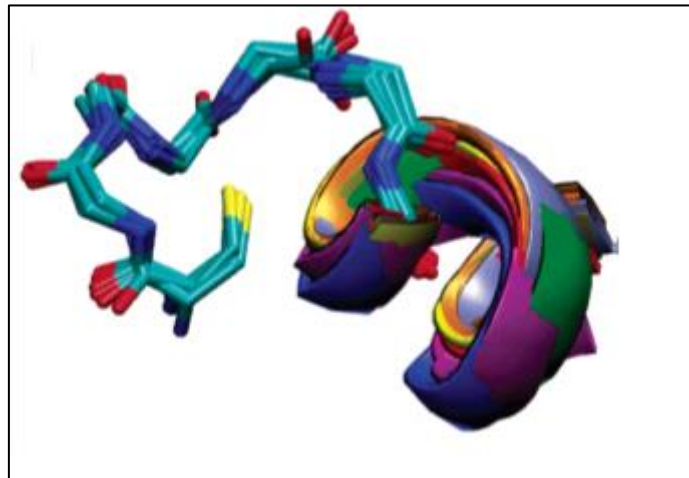


Figure 27 : Superposition de la boucle du site actif de CDC25B (1qb0) avec un groupe d'autres PTP. Les résidus cystéine des sites actifs sont présentés dans l'hélice avec l'épine dorsale de la boucle de HCX5R. Les cinq premiers résidus de l'hélice qui suit immédiatement la boucle du site actif sont indiqués dans le dessin avec des couleurs différentes pour chaque phosphatase.

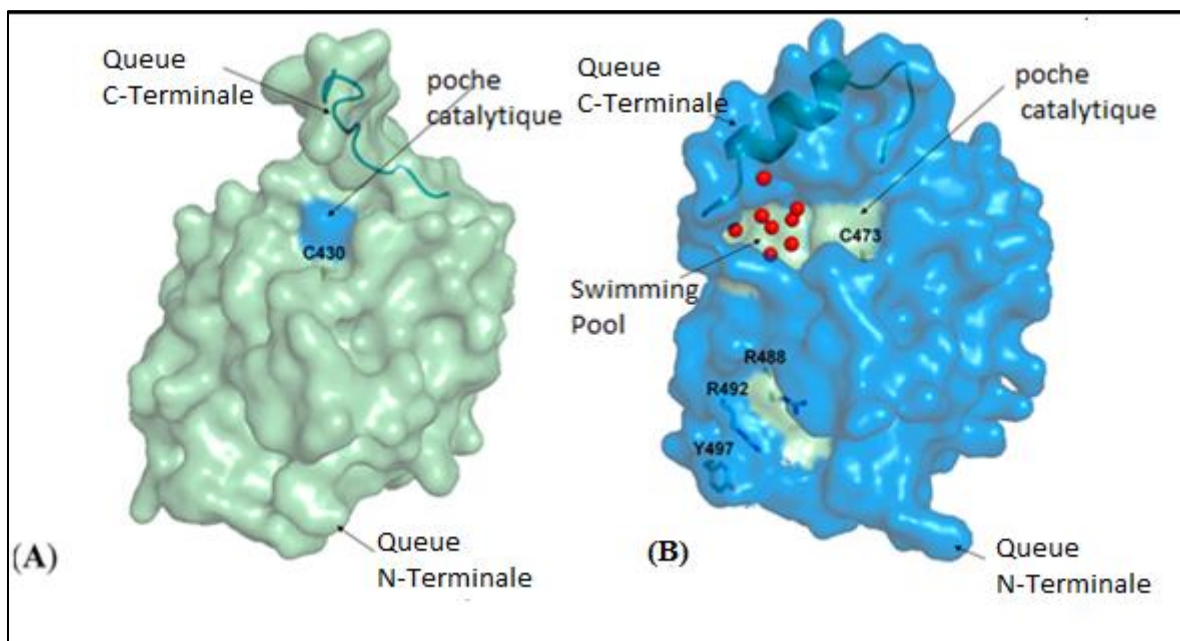


Figure 28: Structure des CDC25 (A et B) présentant leurs sites actifs<sup>93</sup>

<sup>93</sup> Annette K. Brenner, Håkon Reikvam, Antonio Lavecchia and Øystein Bruserud, *Molecules* ;2014, 19(11), 18414-18447; doi:10.3390/molecules191118414

## I.2. CDC25B

### I.2.1. Domaine catalytique

Le domaine catalytique ou cite active du Cdc25B se trouve à la surface de l'enzyme et il est de petites dimensions (1.9A°) et peu profond, ce qui lui permet de fixer son substrat très facilement.<sup>4</sup>

La figure ci-dessous (figure 29) présente une structure cristalline de ce domaine catalytique avec le groupement phosphate qui est dedans et les liaisons hydrogènes entre le groupement et les acides aminés du site catalytique.

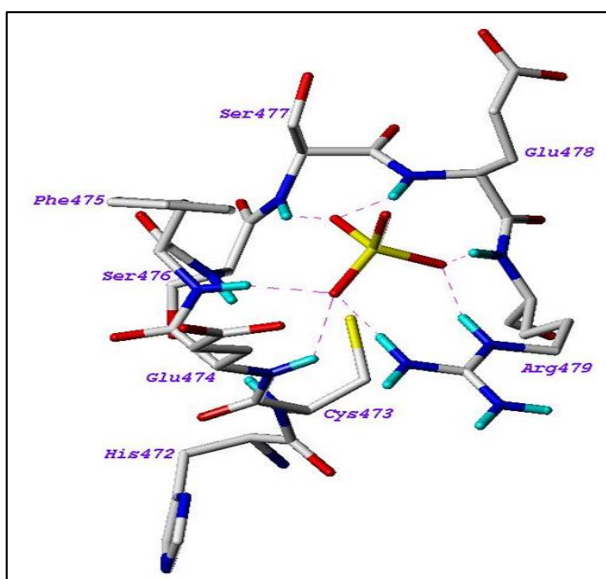
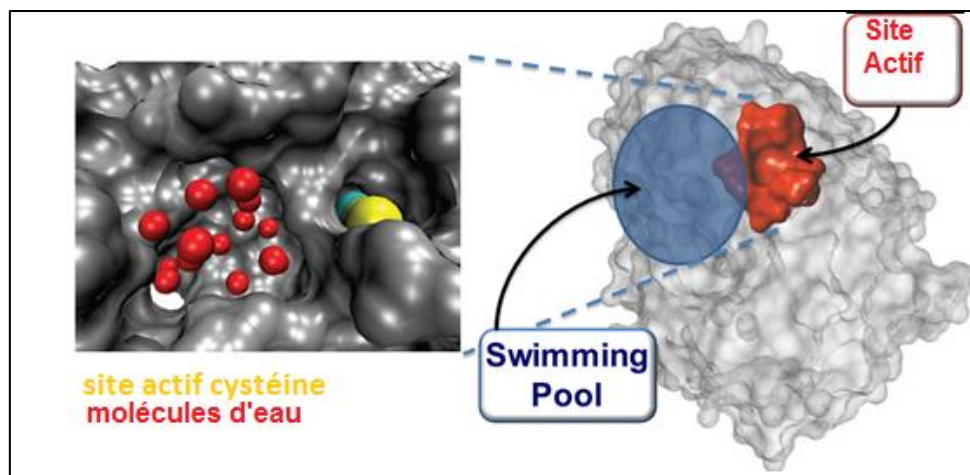


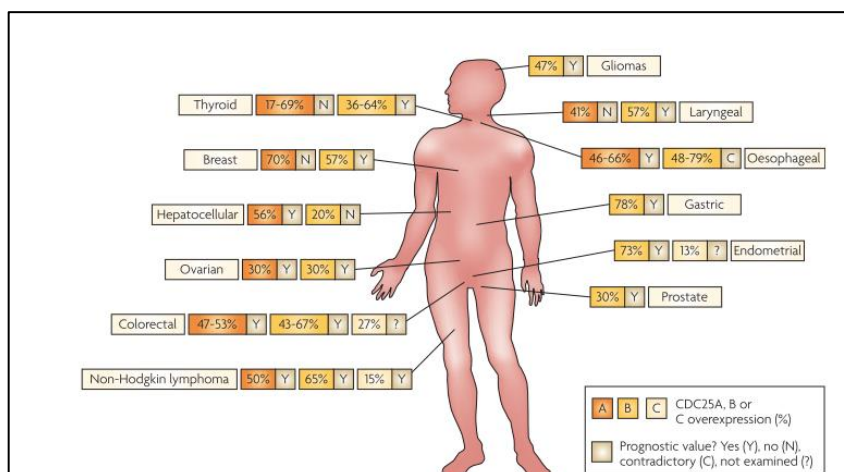
Figure 29: Structure cristalline du domaine catalytique de Cdc25B montrant la phosphatase dans le site<sup>94</sup>

A côté de ce domaine on trouve un autre site appelé « swimming pool » qui participe à la conformation du site actif. Ce site est nommé swimming pool car il est plus profond et plus grand que le site actif et il contient des molécules d'eau. (Figure 30)

<sup>94</sup> Reynolds, R.A et al ; Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G2/M phase transition of the cell cycle; *Mol biol*, 1999, 293, 559-568

Figure 30: Swimming pool et site actif<sup>95</sup>

Des recherches ont été réalisées sur les CDC25 et ont démontré un lien entre ces derniers et le cancer. Dans de nombreux cancers (Figure 31), on a observé une surexpression significative des CDC25. Cette surexpression est corrélée à une agressivité accrue de la tumeur et à un mauvais pronostic vital pour le patient.<sup>96,97</sup>

Figure 31: surexpression de la protéine CDC25 dans les cancers humains<sup>98</sup>

<sup>95</sup> Rudolph, Targeting the Neighbor's Pool ; *J Mol Pharmacol*, 2004, 66, 780-782

<sup>96</sup> Kristjansdottir, K. ; Rudolph, J. ; Kristja, K. ;& Carolina, N., CDC25 phosphatases and cancer. *Chemistry & Biology*, 2004, 11 (8)

<sup>97</sup> Wang, Z. ; Trope, C.G. ; Florens, V.A. ; Suo, Z. ; Nesland, J.M. ; & Holm, R., Overexpression of CDC25B, CDC25C, and phospho-CDC25C (Ser216) in vulvar squamous cell carcinomas are associated with malignant features and aggressive cancer phenotypes, *BMC cancer*, 2010, 10

<sup>98</sup> Rose Boutros, Valérie Lobjois et Bernard Ducommun; CDC25 phosphatases in cancer cells: Key players? Good target. *Nature Reviews Cancer*; 2007, 7 (7), 495-507

Alors, d'après toutes ces résultats les CDC25 sont une cible thérapeutique pour le cancer. Et pour cela, d'autres recherches chimiques et biologiques ont été menées dans le but de trouver des molécules capables d'inhiber l'activité des CDC25.

Mais, pour synthétiser ces molécules il était nécessaire de savoir de plus le mécanisme catalytique des CDC25 qui est simplifié dans le schéma 20.

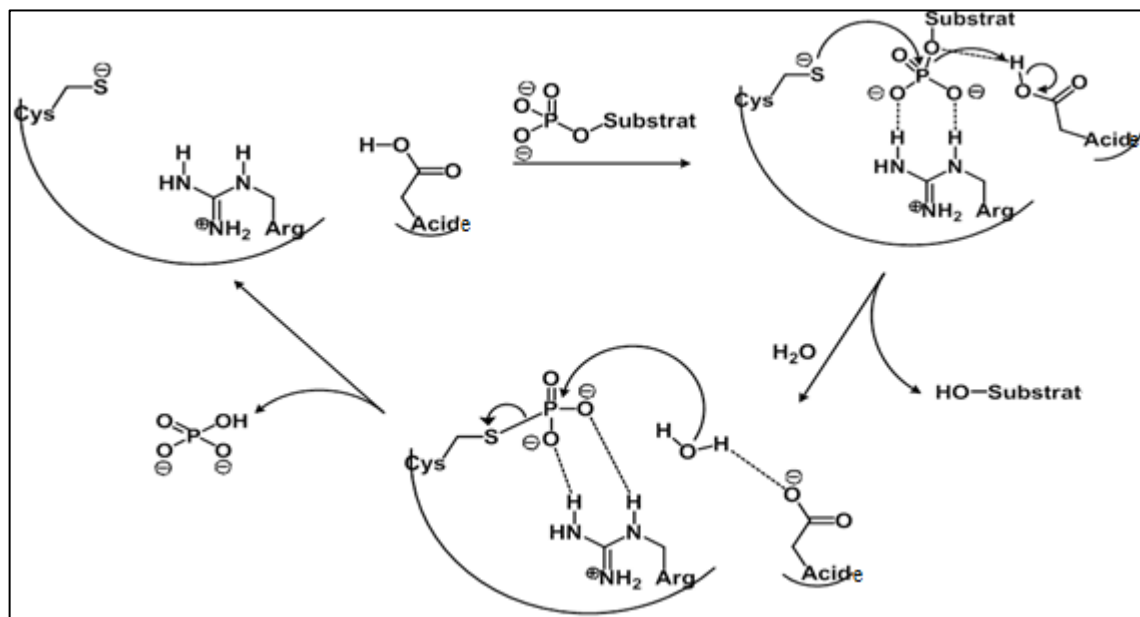


Schéma 20: Schéma représentatif du mécanisme catalytique des CDC25<sup>99</sup>

## II. Inhibiteurs de CDC25

Depuis une dizaine d'année, la recherche d'inhibiteurs des PTP et surtout des CDC25 a connu des évolutions et a donné la naissance de près des 200 molécules inhibitrices synthétisées.

Les molécules synthétisées, décrites dans la littérature, possèdent des structures chimiques très variées, de même que leur fonctionnement et leur efficacité.

On a regroupé ci-après ces inhibiteurs en sous-groupe tout en citant quelques exemples.

<sup>99</sup> Chen,W.et al. Dual-specific Cdc25B phosphatase: in search of the catalytic acid; *Biochemistry*, 2000, 39, 10781-10789



## II.1. Les mimes de groupement phosphate

Ces derniers agissent en mimant le groupement phosphate des substrats de CDC25, en prenant ainsi leur place, ils bloquent leur transformation en produit de réaction. Parmi plusieurs produits qui ont été synthétisé et cité dans la littérature on a présenté les structures chimiques de ces deux molécules.<sup>100,101</sup>

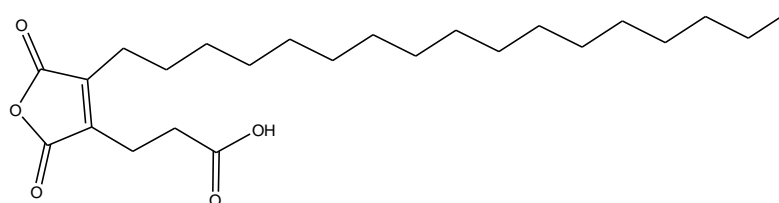


Figure 32: Structure de l'anhydride 1i (Brault et al.2007)<sup>102</sup>

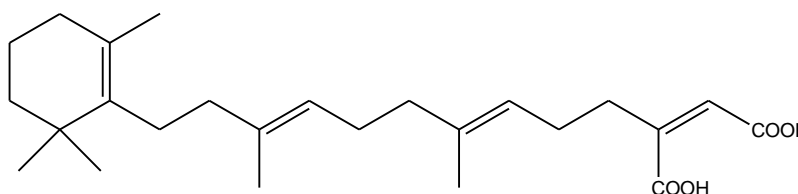


Figure 33: Structure du sester-terpénoïde n°25<sup>103,101</sup>

## II.2. Les composés poly-soufrés

Ces composés soufrés ont des diverses propriétés biologiques. Il y a eu l'extraction de certaines molécules soufrées à partir de l'ail et de l'oignon dans le but de tester leurs activités vis-à-vis des

<sup>100</sup> Ham S.W. & Carr B.I.2004, Cell division cycle 25(CDC25) phosphatase inhibitors as antitumor agent, *Drug Design Reviews-Online*, 2004, 1 (2).

<sup>101</sup> Contour-Galcera.M.O, Sidhu.A, Prevost.G, Bigg.D, Ducommun.B, What's new on CDC25 phosphatase inhibitors, *Pharmacology and therapeutics*, 2007, 115 (1).

<sup>102</sup> Brault,L. ;Denancé,M. ; Banaszak,E. ; El Maadidi,S. ; Battaglia, E. ; Bagrel, D ;& Samadi, M , Synthesis and Biological evaluation of dialkylsubstituted maleic anhydrides as novel inhibitors of CDC25 dual specificity phosphatases, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, 42 (2).

<sup>103</sup> Foster,C ;Lazo,J.S ;& Kingston,D.G.I, Sesterpenoids and an alkaloid from a Thorectandra sp. as inhibitors of the phosphatase CDC25B, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2005a, 13 (17)

CDC25<sup>104</sup>. Ils agissent en freinant la prolifération des lignées de carcinome mammaires humaines MCF-7 et VCR-Res (lignée résistante à la vincristine).



Figure 34: Structure du diallyl-tetrasulfide (à gauche) et Structure du dipropyl-tetrasulfide (à droite)

### II.3. Dérivés thiophéniques

Différentes études ont été réalisées, et ont mis en valeur le pouvoir inhibiteur des composés thiazolés vis-à-vis des CDC25. Ainsi une équipe a synthétisé une quinone-thiazole, BN82685, qui est caractérisée par une  $CI_{50}$  compris entre 0,1 et 0,2  $\mu M$ .<sup>105</sup>

En 2012, l'équipe de Sarkis et al.<sup>14</sup>, a testé des dérivés symétriques et asymétriques de structure thiazolones liés entre eux par divers *linkers* pour inhiber la CDC25B.

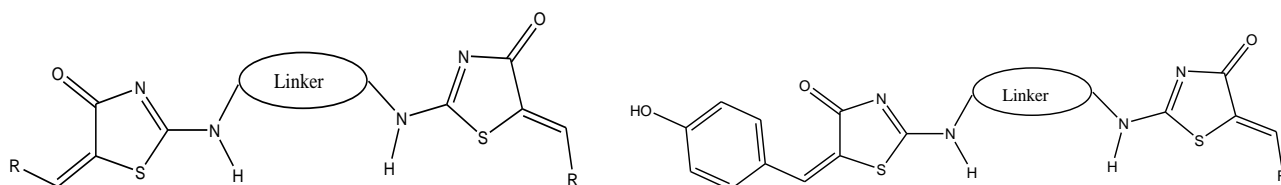


Figure 35: Structures des composés bis-thiazolone (Sarkis et al.2012)<sup>106</sup>

<sup>104</sup> Viry.E, Anwar.A, Kirch.G, Jacob.C, Diedrich.M, Bagrel.D, Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases. *International Journal of Oncology*, 2011, 38 (4)

<sup>105</sup> Breza.M.C, Quaranta.M, Contour-Galcera. M.O, Lavergne. O, Modesert.O, Auvary.P, Kasprzyk.P.G, Prevost.G.P, Ducommun.B, Inhibition of human tumor cell growth *in-vivo* by an orally bioavailable inhibitor of CDC25 phosphatases, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2005, 4 (9)

<sup>106</sup> Sarkis,M. ; Tran,D.N. ; Kolb, S. ; Miteva, M.A. ; Villoutreix, B.O. ; Garbay, C. ;& Braud, E., Design and synthesis of novel bis-thiazolone derivatives as micromolar CDC25 phosphatase inhibitors: effect of dimerization on phosphatase inhibition, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22 (24)

## II.4. Dérivés à base de quinone

Le composé IRC-083864 (figure 36), qui est de nature bis-quinoléique, il a montré une bonne réactivité vis-à-vis de CDC25A et CDC25B ( $CI_{50}=0,023 \pm 0,0017$  (CDC25A) et  $CI_{50}=0,026 \pm 0,0044$  (CDC25B)).<sup>107</sup>

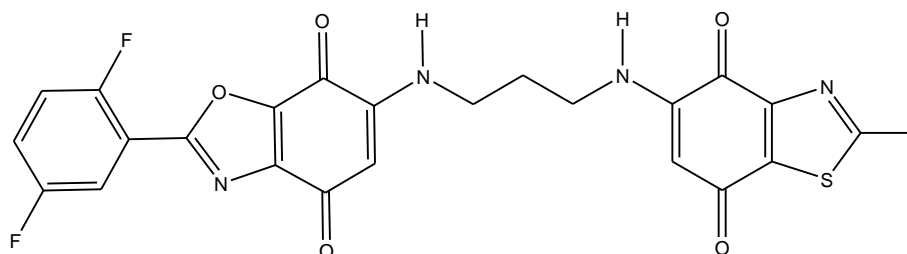


Figure 36: Structure du composé IRC-083864

## II.5. A la recherche de nouveaux inhibiteurs de CDC25

Comme c'est déjà indiqué, il y a divers inhibiteurs de CDC25 qui ont été découverts. Mais malheureusement il y a peu de composé qui présentent une bonne réactivité vis-à-vis des tumeurs humaines.

Sauf le groupe des quinones qui présentent les meilleurs inhibiteurs mais accompagné d'une organotoxicité importante, ce qui ne lui permet pas d'être un bon candidat thérapeutique.<sup>108</sup>

Donc il était nécessaire de chercher de nouvelles molécules qui sont à la fois inhibiteurs et de faible organotoxicité. Pour cela, il y a eu recours à l'étude des chalcones et des flavonoïdes qui sont des molécules naturelles possédant des réactivités anti-cancéreuses et ils sont capables d'inhiber CDC25 chez l'eucaryote : *Caenorhabditis elegans* (Kim et al.2009)<sup>109</sup>.

<sup>107</sup> Marie-Christine Brezak et al ; *International Journal of Cancer* ; 124 (6) (2009): 1449–1456

<sup>108</sup> Monks . T.J, Hanzlik.R.P, Cohen.G.M, Ross.D, Graham.D.G, Quinone chemistry and toxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1992 , 112 (1)

<sup>109</sup> Kim,K.S, Kawasaki.I, Chong.Y, Shim.Y.-H, Inhibition of overexpressed CDC25.1 phosphatase activity by flavone in *Caenorhabditis elegans*, 2009, *Molecules and Cells*, 27 (3)

Dans le squelette des flavones, on note bien la structure des coumarines. Cette famille de molécules est connue pour leur activité anti-cancéreuse (Lacy & O’Kennedy 2004 ; Lopez et al. 2004)<sup>110, 111</sup> et pour leur faible toxicité.

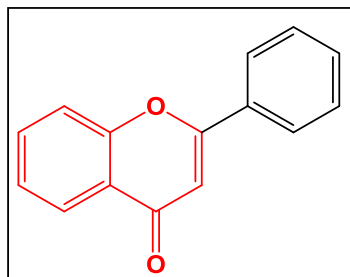


Figure 37: structure du flavone

A partir de cette idée, en 2010, Valente et *al.* ont testé des nouvelles molécules à base de la coumarine et ayant à la fois la structure d’une chalcone, ils ont conclu qu’un seul composé possède une activité inhibitrice envers le CDC25B (figure 38).<sup>112</sup>

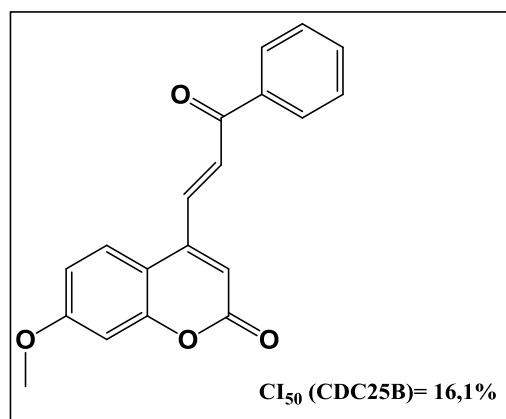


Figure 38: Chalcone-coumarine inhibiteur de CDC25B et son CI<sub>50</sub>.<sup>6</sup>

<sup>110</sup> Lacy.A & O’Kennedy.R, Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer, *Current Pharmaceutical Design*, 2004, 10 (30)

<sup>111</sup> Lopez-Gonzalez. J.S, Prado-Garcia. H, Aguilar-Cazares. D, Molina-Guarneros. J.A, Morales-Fuentes. J, Mandoki. J.J, Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines., *Lung Cancer*(Amsterdam, Netherlands), 2004, 43 (3).

<sup>112</sup> Valente, S.; Bana, E.; Viry, E.; Bagrel, D.; Kirsch, G ; Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases; *Bioorg. Med. Chem. Lett* ; 2010; 20 (19); 5827-5830.

En 2014, Chao *et al.* ont étudié l'évaluation de l'activité inhibitrice des chalcones envers les CDC25B à partir des dérivés de 2,4-dihydroxychalcone, et ils ont trouvé que les dérivés p-méthyl et p-diméthylamine (figure 39) possède des activités très intéressantes par rapport aux autres composés substitués pour une concentration de 20 $\mu$ g/mL.<sup>113</sup>

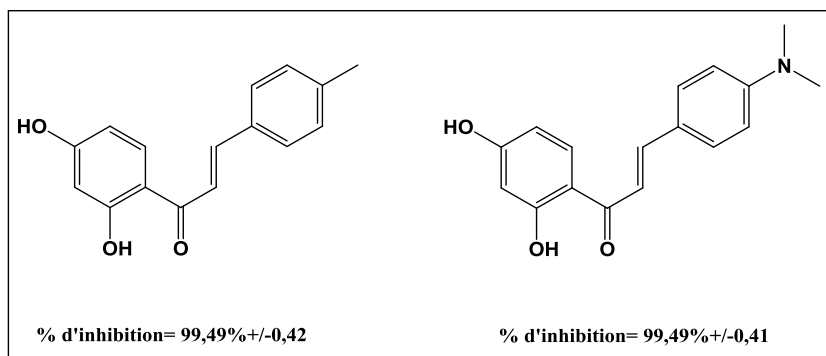


Figure 39: pourcentage d'inhibition de p-méthyl-2,4-dihydroxychalcone (à gauche) et de p-diméthylamine-2,4-dihydroxychalcone (à droite).<sup>23</sup>

En même année, Zhang *et al.* ont testé l'activité inhibitrice d'une série de 2-hydroxy-4-isoprenyloxychalcone synthétisée sur la CDC25B et ils ont trouvé que les composés **I**, **II** et **III** ont une très haute activité inhibitrice qui dépasse 97,5%.<sup>114</sup> Aussi Yuan *et al.* ont prouvé que la licochalcone B possède une activité inhibitrice de CDC25B.<sup>115</sup> (Figure 40)

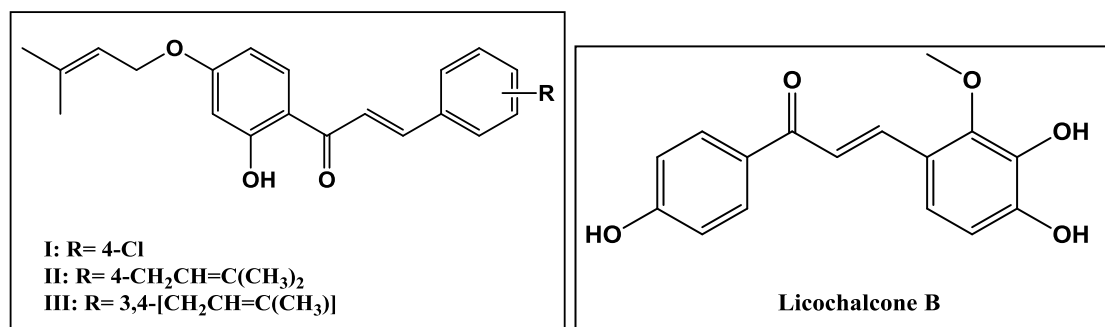


Figure 40: structure des chalcones inhibitrices de CDC25B

<sup>113</sup> Chao Xie, Yuan Sun, Cheng-Yan Pan, Li-Ming Tang, Li-Ping Guan; 2,4-Dihydroxychalcone derivatives as novel potent cell division cycle 25B phosphatase inhibitors; and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors; *Pharmacol. Reports*; 2014; 69; 257–262

<sup>114</sup> J. Zhang, F. Ji, Y. Gu, X. Zhan, S. Qiao; Chalcones derivatives as potent cell division cycle 25B phosphatase inhibitors, *Pharmacol. Reports*; 2014; 66; 515-519.

<sup>115</sup> X. Yuan, T. Li, E. Xiao, H. Zhao, Y. Li, S. Fu, L. Gand, Z. Wang, Q. Zheng, Z. Wang; Licochalcone B inhibits growth of bladder cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis, *Food Chem. Toxicol*; 2014; 65; 242-251.

En 2015, Zhao et *al.* ont étudié l'activité inhibitrice des dérivés de 2',4',6'-trihydroxychalcones et il est noté que le composé 2,4-dichloro-2',4',6'-trihydroxychalcone possède une activité inhibitrice très élevée (99,63% +/- 0,37) pour une concentration de 20µg/mL (figure 41).<sup>116</sup>

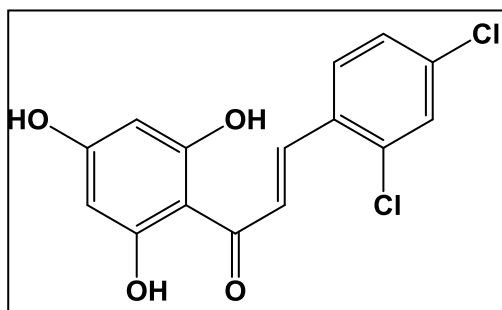


Figure 41: 2,4-dichloro-2',4',6'-trihydroxychalcone

Toutes ces informations ont formé une base de données pour le criblage virtuel *in-silico* (Docking), que l'on a utilisé pour étudier les différentes propositions possibles des structures chimiques à base de coumarine afin de synthétiser des molécules inhibitrices de CDC25 en basant sur l'hypothèse de lier deux molécules entre elles par une chaîne carbonée<sup>14, 17</sup>.

Ensuite, le potentiel inhibiteur des molécules a été évalué par un dosage enzymatique par fluorimétrie et un test qualitatif en appliquant la technique analytique MALDI-TOF pour mettre en évidence leurs réactivités et leurs réversibilités.

### III. Evaluation de l'activité des composés synthétisés

#### III.1. Criblage Virtuel par Docking

##### III.1.1. Principe

Le docking est une application d'une suite logique de programmes mathématique-informatique désignés à la chimie pharmaceutique qui se base sur le choix de type de la cible protéinique et la famille d'inhibiteurs.

Dans la plupart des cas et selon les résultats obtenues, l'utilisateur a recours d'appliquer des différents programmes disponibles afin d'optimiser ses résultats.

<sup>116</sup> Shui-Lian Zhao, Zhou Peng, Xing-Hua Zhen, Hong-Guo Jin Yan Han, You-Le Qu, Li-Ping Guan; Potent CDC25B and PTP1B phosphatase inhibitors: 2',4',6'-trihydroxylchalcone derivatives; *Med Chem Res*; 2015; 24; 2573–2579

Généralement, le criblage virtuel est une méthode permettant l'évaluation biologique *in-silico* du criblage réel à haut débit (HTS : High-Throughput screening), qui nous aide à tester le mode de fixation et l'orientation d'un nombre illimité et varié de molécules dans les sites actifs des enzymes sujets. Ce qui rend cette méthode très utile et primordiale en chimie médicinale.

Donc le docking a comme principe d'évaluer deux structures chimiques différentes : un ligand et un récepteur. Son plus c'est la possibilité d'étudier l'environnement d'acide aminées dans lequel le ligand est considéré introduit. Par contre, et comme tout autre programme, le docking possède des désavantages. En fait ; le docking néglige toutes déformations effectués sur l'enzyme, ou la protéine lors de la fixation d'un ligand, ce qui la rend parfois la seule justification d'erreur d'anticipation.<sup>117</sup>

### III.1.2 Détermination du site actif

L'identification du site actif qui est l'ensemble des résidus d'acides aminés pouvant intervenir dans le processus de reconnaissance du ligand, est une étape de base dans la stratégie du docking.

Pour cela il y'on existe deux méthodes pour le savoir :

- Ou bien en effectuant la recherche dans PDB (Proteine Data Bank) on trouve une structure cristalline du ligand avec le récepteur ce qui nous aide à déterminer le site actif. Mais ; dans ce cas il faut être très prudent dans l'interprétation de cet information car pour un même récepteur le site actif peut être différent selon le contexte pharmacologique de la molécule (agoniste, antagoniste, agoniste inverse)
- Dans le deuxième cas ; où aucun ligand n'a été cristallisé avec le récepteur, il sera judicieux d'appliquer le CASTp qui est un algorithme permettant de mesurer le volume des sites actifs<sup>118</sup> et donc donner le nombre de cavités, leurs tailles ainsi que leurs circonférences. Les méthodes utilisées consistent à évaluer la surface accessible aux solvants (surface Richards<sup>119</sup>) et la surface moléculaire (surface Connolly<sup>120</sup>).

---

<sup>117</sup> Thèse de Alban ARRAULT ; Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma 2007;

<sup>118</sup> <http://sts.bioengr.uic.edu/castp/>

<sup>119</sup> Lee, B.; Richards, F.M. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol*, 1971, 55, 379-400.

<sup>120</sup> Connolly, M. L. Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic-acids, *Science*, 1983, 221, 709-713.

### III.1.3. Les interactions entre le ligand et le récepteur

Les interactions entre une protéine et un ligand dans la plupart des cas étudiés ne sont pas covalentes. Sachant que l'énergie libre de Gibbs a comme expression la suivante :

$$\Delta G = -RT \ln K_i = \Delta H - T\Delta S$$

*Tel que : R c'est la constante des gaz (8,314 J. K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>)*

*T c'est la Température (K)*

*K<sub>i</sub> est la constante d'inhibition*

Et que la grandeur du  $\Delta G$  en solution aqueuse est comprise entre -10 et -70 KJ/mol.

On peut conclure que les composantes de cette énergie sont:

- la complémentarité géométrique, stérique et de surface entre le ligand et le récepteur
- les contacts entre deux régions lipophiles des deux entités.
- les liaisons hydrogènes

Les molécules d'eau dans les cavités des protéines peuvent parfois être un élément fondamental.<sup>121</sup> Elles sont capables d'assurer le relais entre le récepteur et le ligand et ainsi créer des réseaux de liaisons hydrogène.

### III.1.4. Résultats du Docking

#### III.1.4.1 Résultats du Docking des molécules synthétisés avec CDC25A

Pour réaliser le criblage *in-silico* avec l'enzyme CDC25A, on a recouru à utiliser sa structure cristalline en pdb : la 1C25. En appliquant l'auto-dock Vina comme software, on a remarqué que la majorité des molécules synthétisées bloquent le site actif contenant la cystéine 430.

Aussi qu'il faut noter que chaque série des produits synthétisés a bloqué ce site d'une façon différente aux autres, ce qui est dû à l'orientation de la partie coumarinique ou benzénique des molécules de la première série et de plus la présence de l'hydropyrazole, l'izatine ou du tétrahydropyrimidine pour les autres séries. Le groupement phényle de 80% des composés de la première série forme un obstacle sur le site actif du CDC25A sauf exception des produits 3 et 4 qui bloquent la Cys 430 par l'intermédiaire de sa partie coumarinique (Figure 42).

---

<sup>121</sup> Maréchal, Y. The hydrogen bond and the water molecule, *Elsevier Science & Technology* 2007.



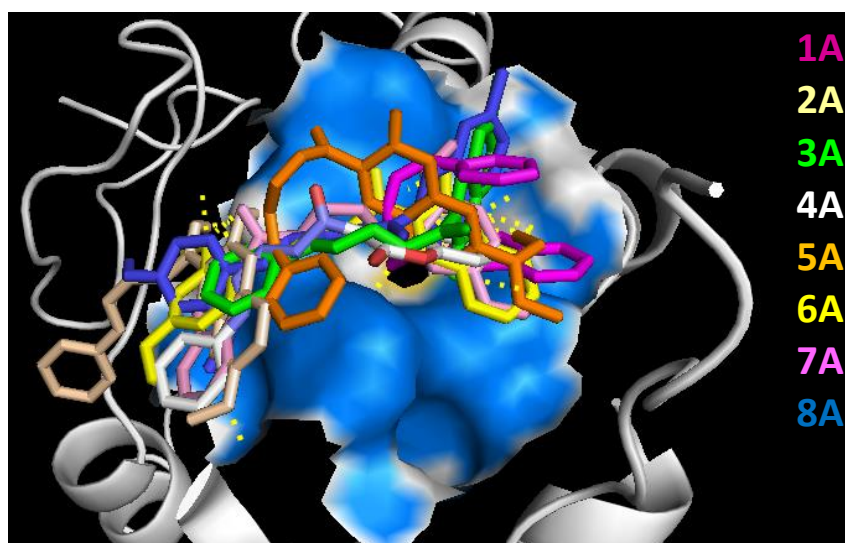
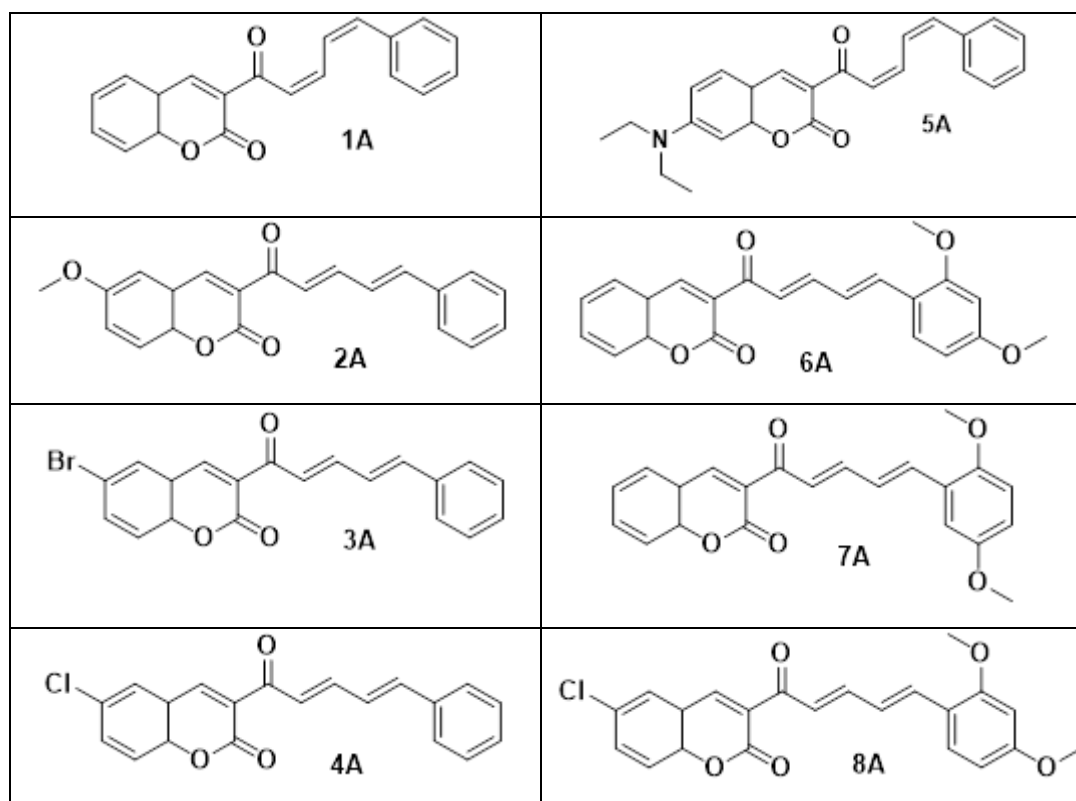
Tableau n°10: Structures des molécules sélectionnées pour le teste *in-silico* avec CDC25A

Figure 42: Résultats du docking pour les produits de la première série

Concernant les produits de la deuxième série, on remarque que le blocage du site actif est réalisé par la partie coumarinique de toutes les molécules (figure 43).

Tableau n°11 : Structures des composés de la deuxième série des chalcones

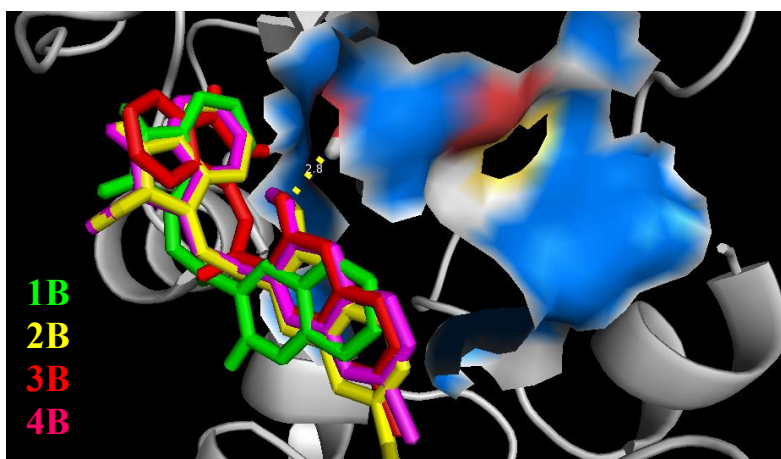
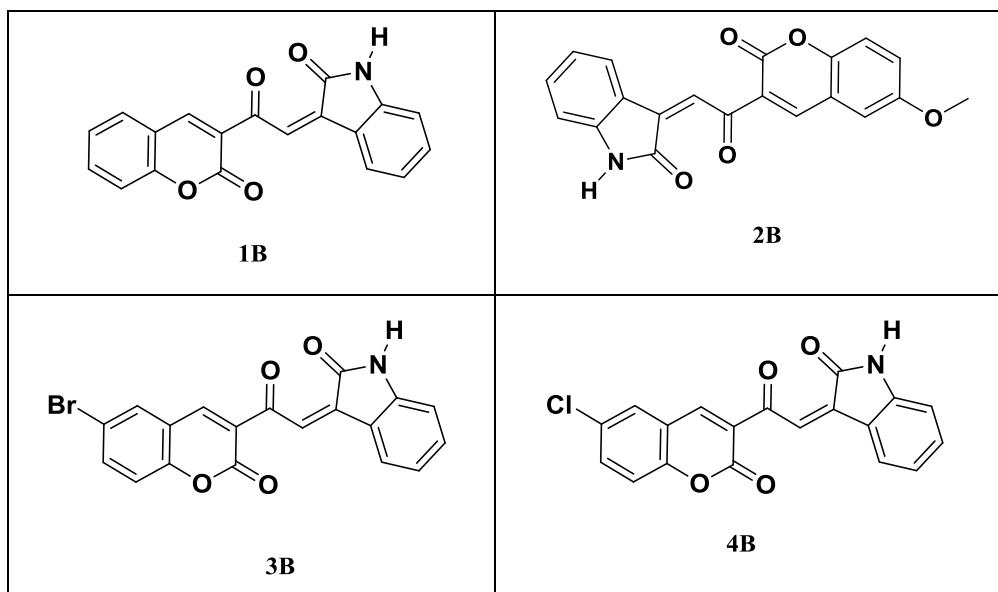


Figure 43: Résultats du docking pour des molécules de la deuxième série

Puisque les produits de la troisième série possèdent un carbone asymétrique il fallait faire le docking pour les deux énantiomères de ces composés. Alors on a remarqué que les produits 1C et 4C bloquent le site actif de CDC25A avec leurs énantiomères S. Par contre les produits 2C et 3C bloquent ce dernier par leurs énantiomères R (Figure 44).

Tableau n°12 : Structure des énantiomères des molécules de la troisième série

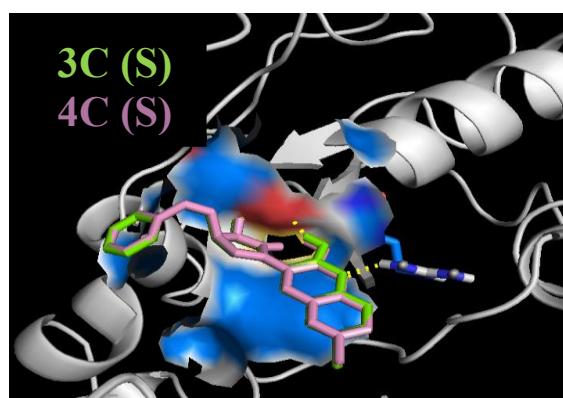
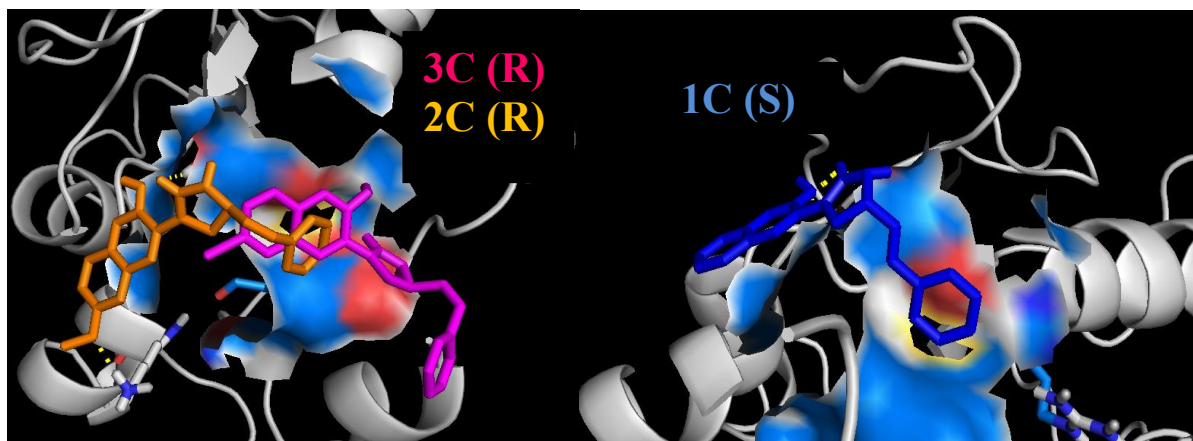
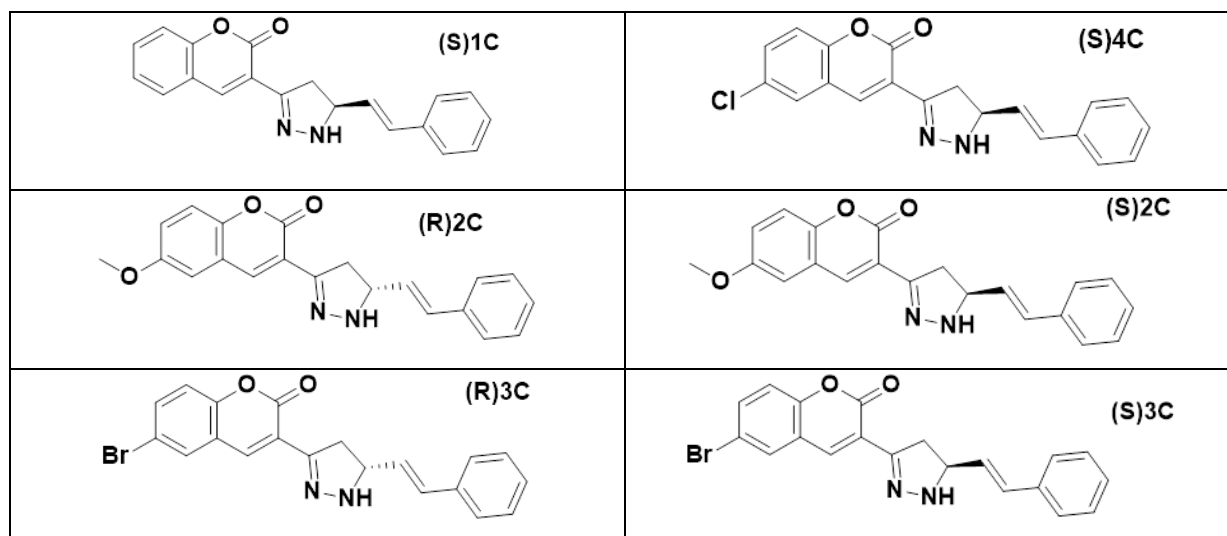
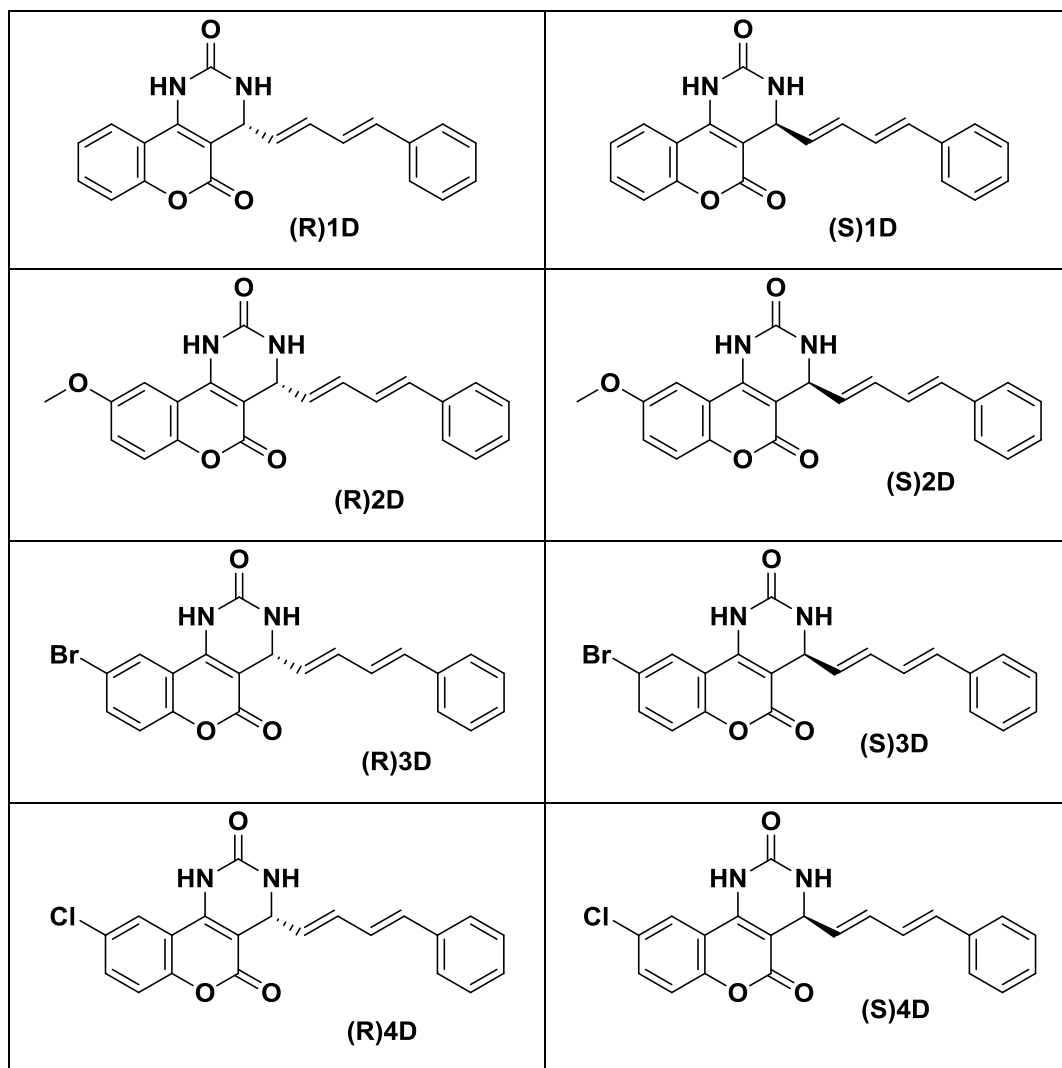


Figure 44: Résultats du docking de la troisième série

Grâce au nouveau cycle intermédiaire entre la partie coumarinique et le phényle, Les deux énantiomères de la dernière série sont capables de bloquer le site actif de cet enzyme. Mais, le composé 1D bloque ce site par son énantiomère R uniquement (figures 45).

Tableau n°13 : Structures des énantiomères des composés de la dernière série



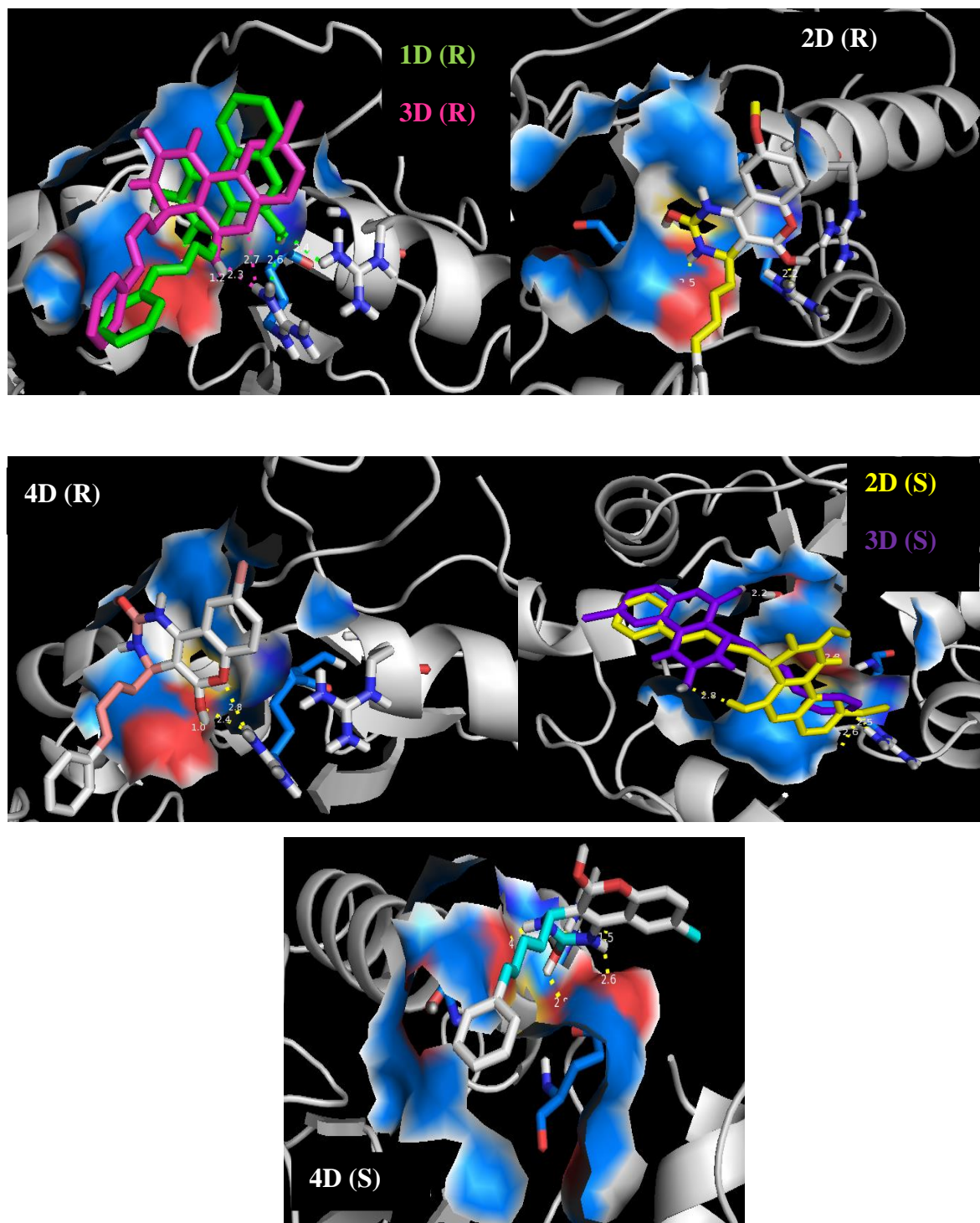


Figure 45: Résultats du docking pour les produits de la quatrième série par leurs énantiomères.

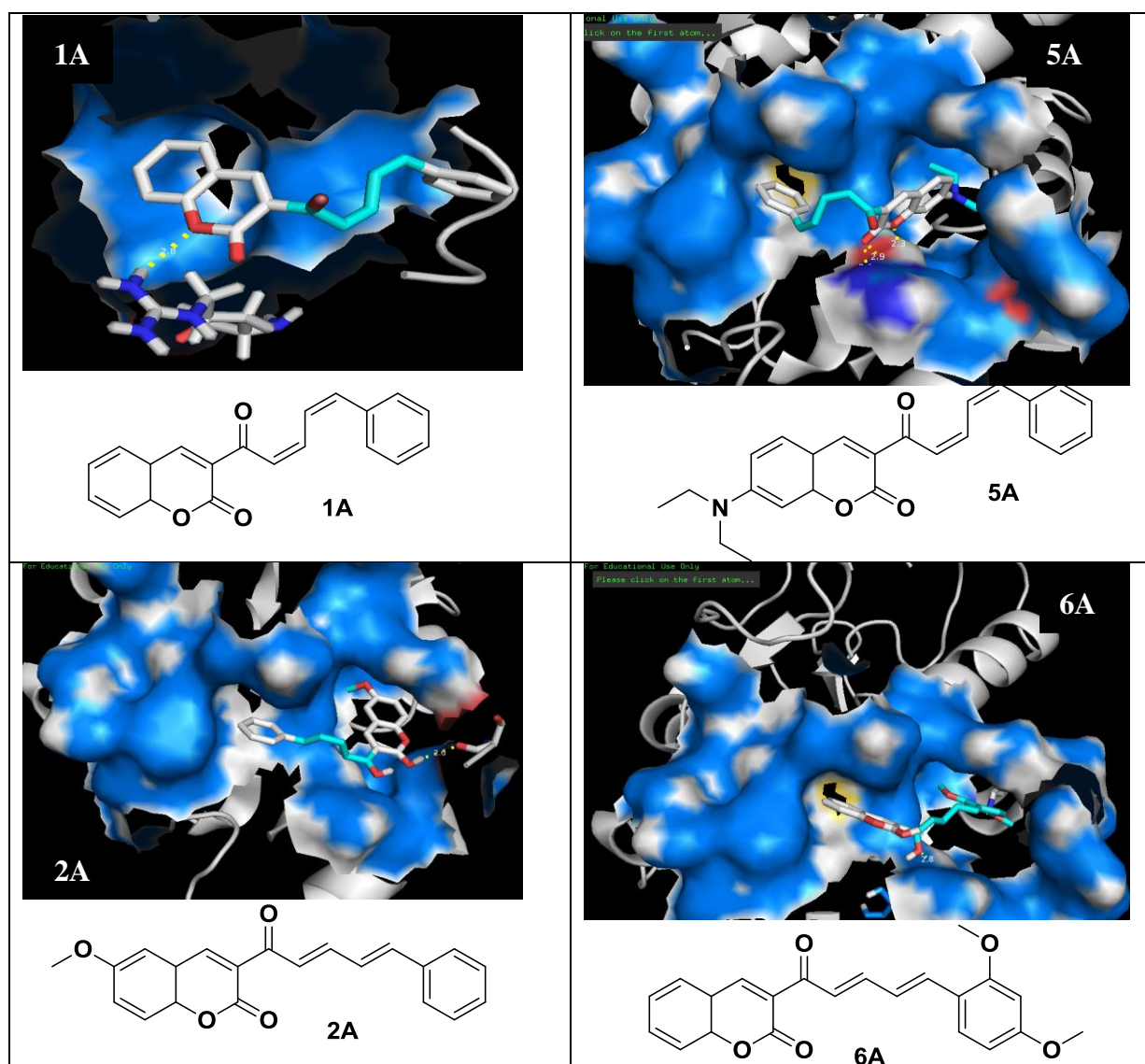
#### III.1.4.2 Résultats du Docking avec CDC25B

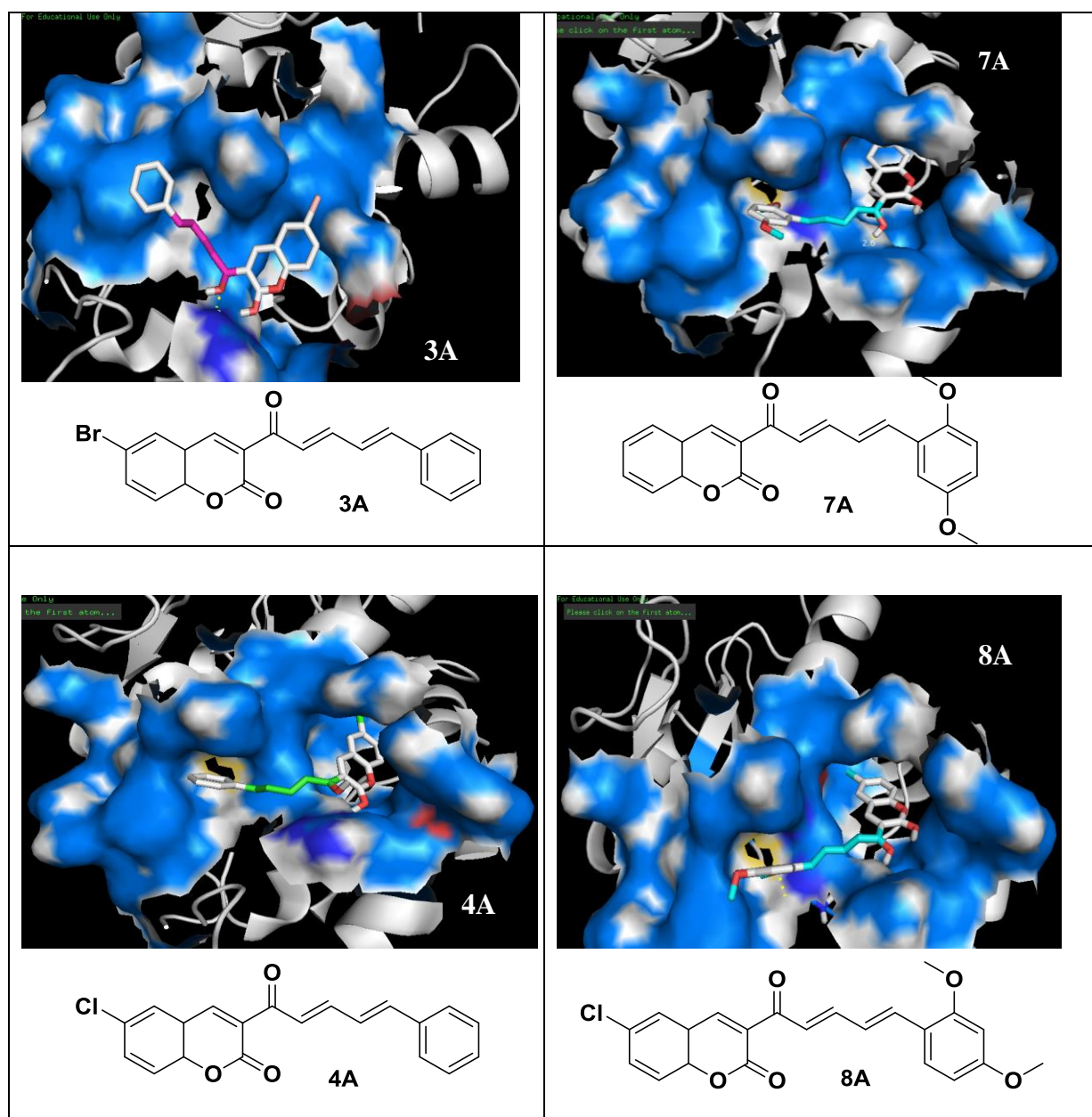
Les structures des molécules synthétisées ressemblent beaucoup à la structure d'un dimère qui répond à la dernière hypothèse étudiée (former des molécules ayant deux parties liées par une chaîne carbonée et s'intègrent dans les sites de CDC25B) puisqu'elles sont formées par



un motif coumarinique lié à un motif benzénique par l'intermédiaire d'une chaîne carbonée de longueur 7,3Å<sup>o</sup> contenant deux doubles liaisons et une liaison C=O, ou bien un cycle intermédiaire de cinq ou six atomes. En appliquant le docking comme software ; on a remarqué que la plupart de molécules synthétisées s'intègrent dans la protéine de manière que la partie coumarinique occupe le *swimming pool* et l'autre partie de la molécule recouvre partiellement ou la totalité du site actif dans le cas de la structure cristalline du CDC25 B qui a comme code pdb (1QB0). (Tableau n° 14).

Tableau n° 14 : Résultats du docking des molécules de la première série





Les molécules de la première série montrent une répartition équivalente de la position des deux parties de la molécule : le groupement phényle de 1A, 4A, 5A et 6A est dans le swimming pool par contre la partie coumarinique de la molécule ou bien elle est orientée vers le site actif ou bien elle est fixée dedans par l'intermédiaire des LH. Ce qui n'est pas le cas avec les molécules de la deuxième série, qui ne montre aucun contact avec le site actif sauf le composé 12 qui s'intègre dans ce dernier avec la partie coumarinique et dans le swimming pool par sa partie isatine. (Figure 46)

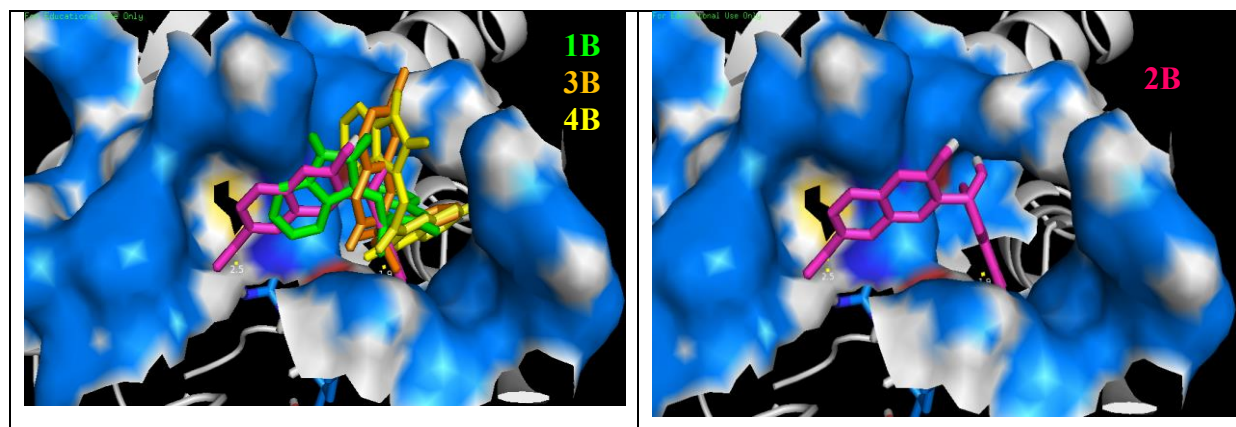
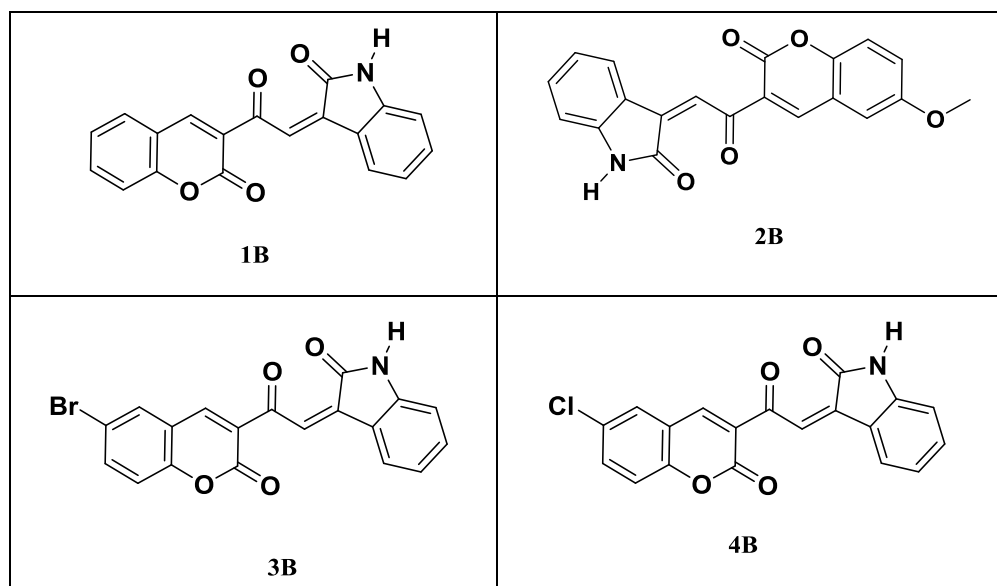


Figure 46: Résultats du docking pour la deuxième série

Tableau n°15 : Structures des composés de la deuxième série



D'autre part, on a remarqué que les énantiomères S de la troisième série montre plus d'aptitude à se fixer au site actif par l'intermédiaire de la partie coumarinique, surtout le composé 3C(S) qui est fixé au site actif par une LH(2,4 A°) entre le doublet d'oxygène de la C=O coumarinique et l'Arg479 et une deuxième de même longueur entre NH d'imidazole et l'Arg544. (Tableau n°17)



Tableau n°16 : Structure des énantiomères des molécules de la troisième série

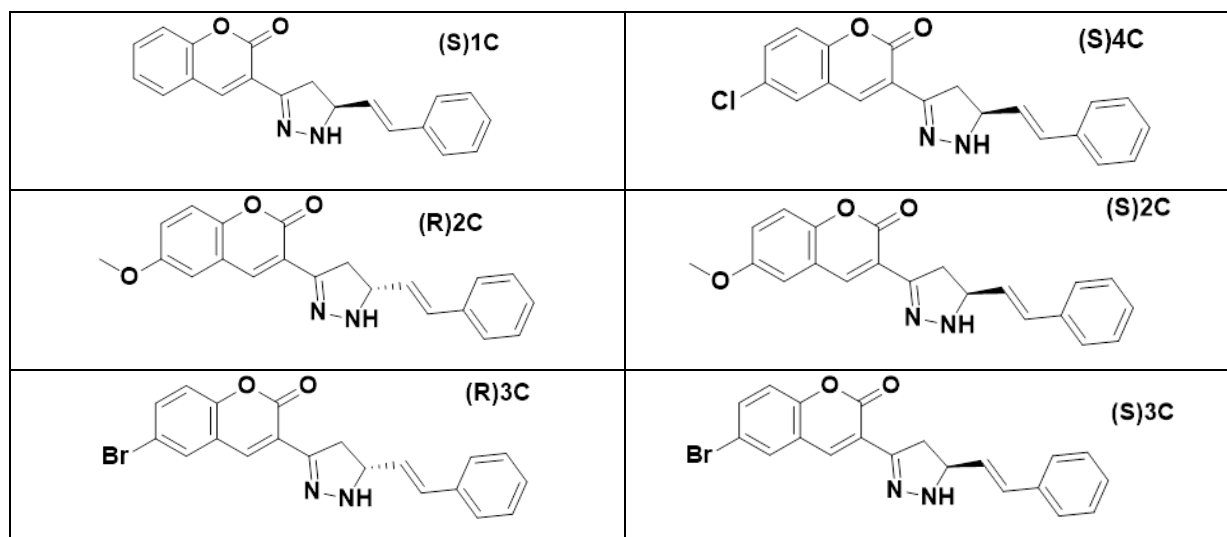
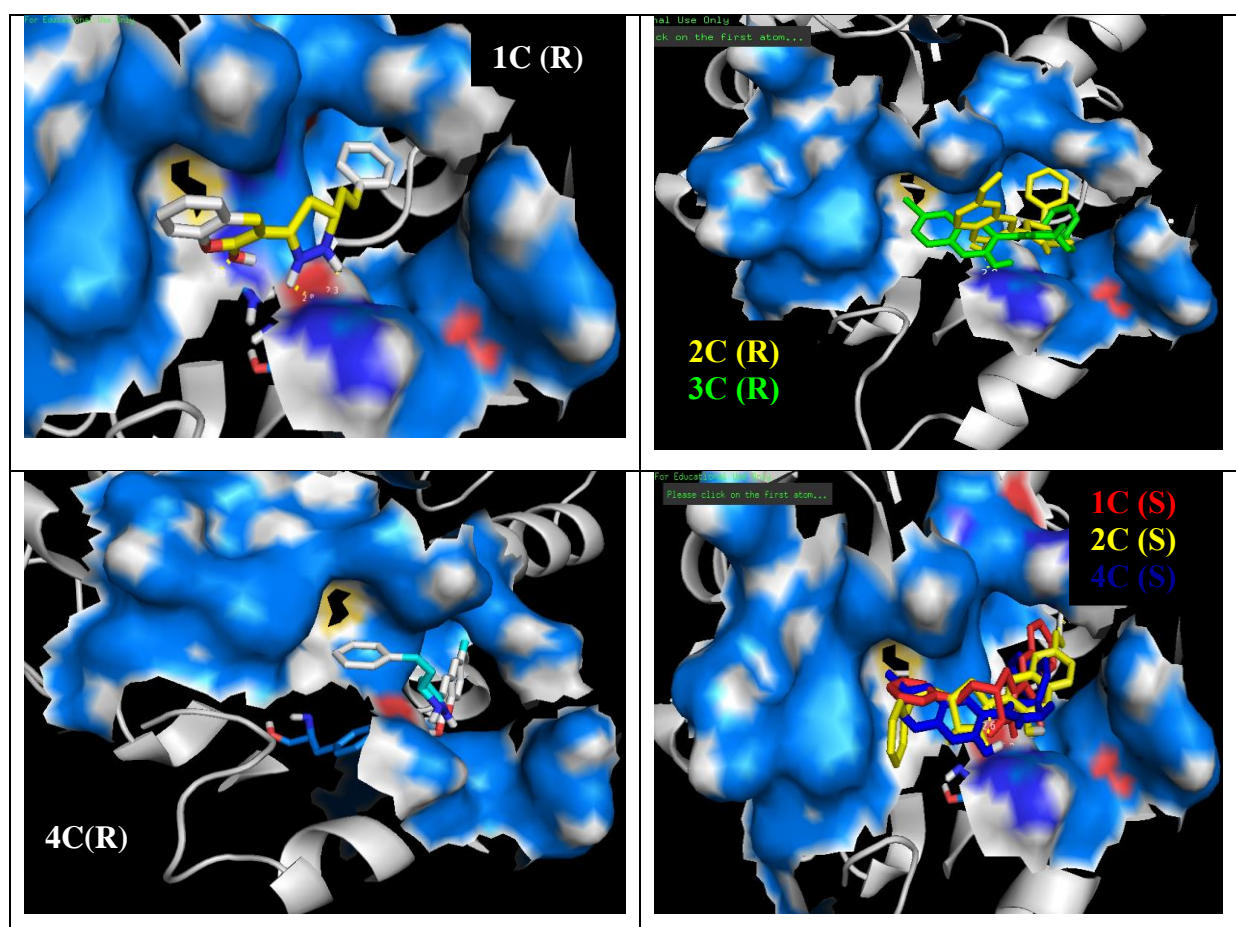
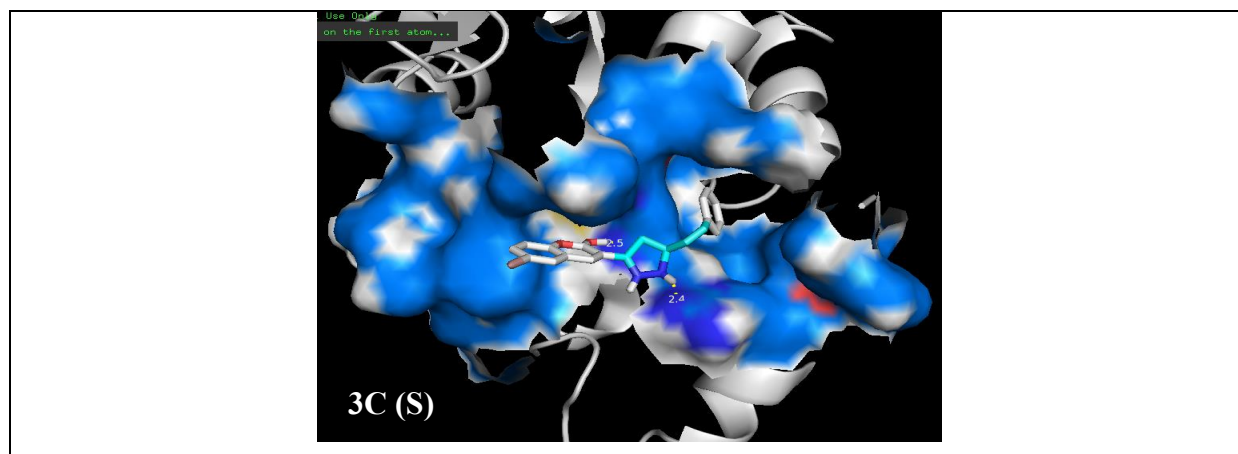


Tableau n°17: Résultats du Docking des molécules de la troisième série





Concernant la dernière série il est à noter que la majorité des énantiomères de ces molécules ont la tendance de se fixer au site actif par le noyau de la coumarine ou bien par le tétrahydro-pyrimidin-2-one formé. (Tableau n°18 et 19)

Tableau n°18 : Structures des énantiomères des composés de la dernière série

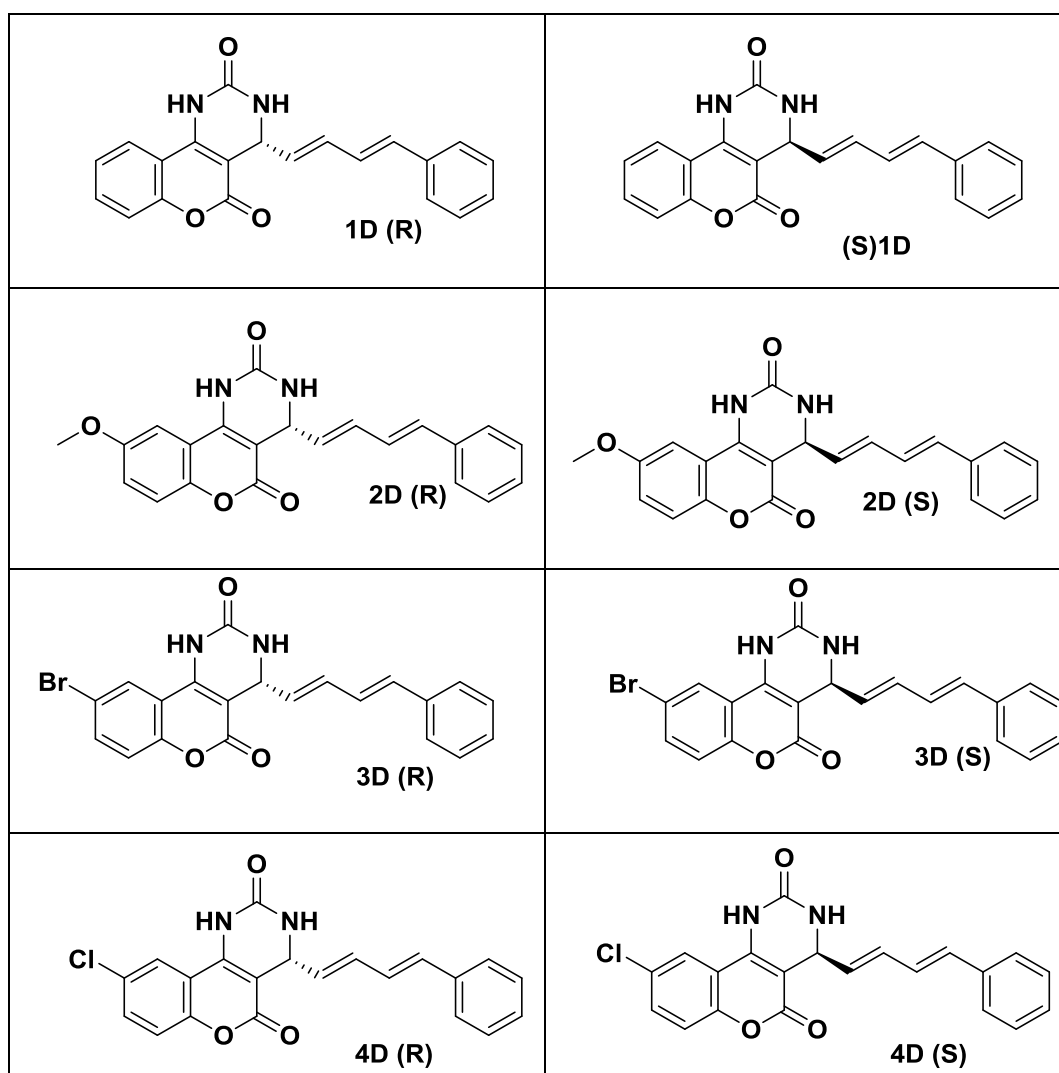
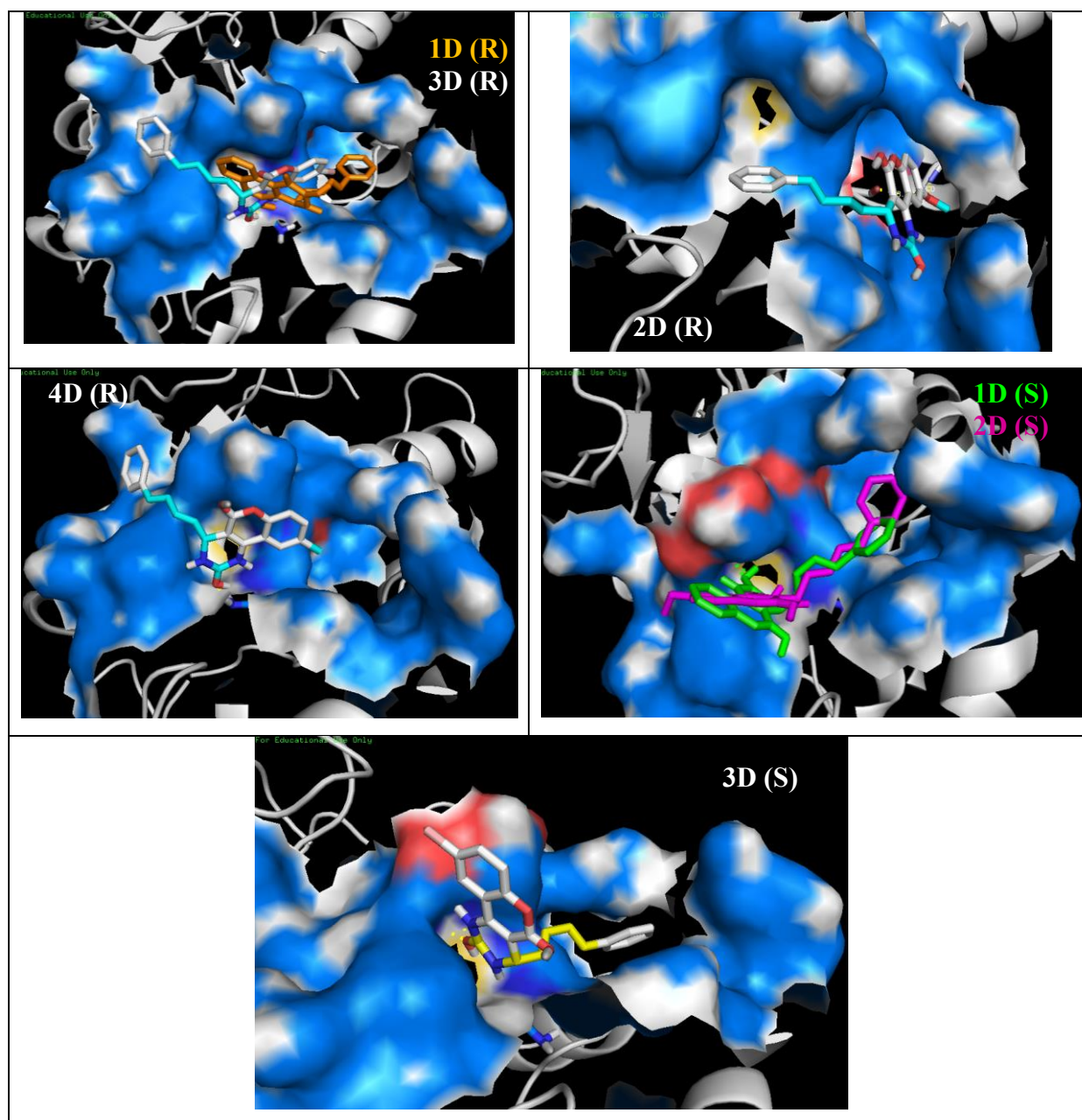


Tableau n°19: Résultats du docking des molécules de la dernière série



La fixation des molécules dans la protéine est réalisée par différentes interactions et liaisons comme : les liaisons hydrogène, interaction hydrophobe ou hydrophile aussi les interactions électrostatiques.

Les liaisons hydrogène considérées se sont celles qui ne dépassent pas 3,2 Å en biologie selon la littérature<sup>122</sup>. Ces liaisons ont été établie entre la C=O du noyau coumarinique ou celle conjugué avec la double liaison de la chaîne carbonée dans la première série, ou bien

<sup>122</sup> Sathyapriya Rajagopal & Saraswathi Vishveshwara, Short hydrogen bonds in proteins, *FEBS Journal*, 2005, 272, 1819–1832

entre NH d'imidazole ou de tetrahydropyrimidine des séries 3 et 4 des molécules synthétisées et les acides aminés suivants :

- Lys 470, Ser434, Arg436, Glu431, Arg439 : dans le cas du CDC25A
- Tyr428, Ser549, Arg544, Glu446, Arg479 : dans le cas du CDC25B

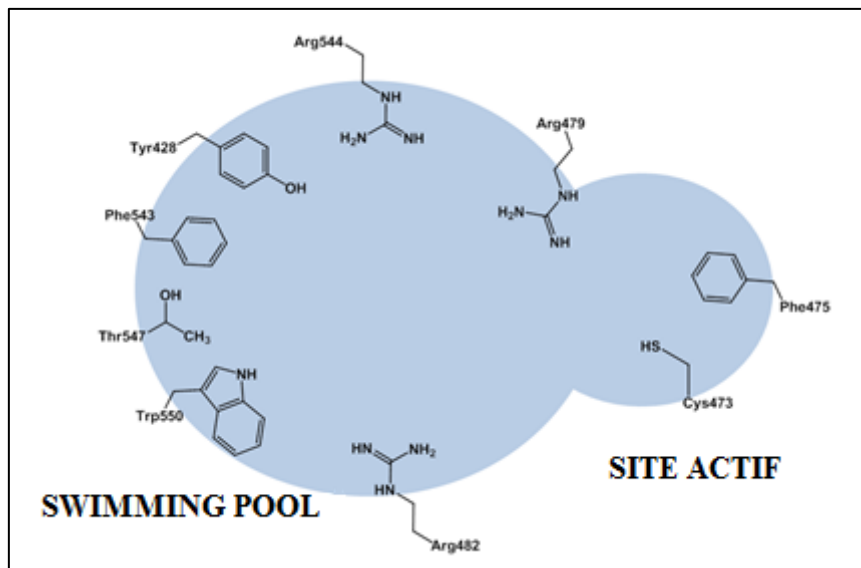


Figure 47: composition de site actif et de swimming pool du Cdc25B<sup>123</sup>

Les résultats cités ci-dessus des positions des différentes molécules ont été sélectionnées selon trois critères essentiels : leurs manières d'intégration dans le site actif, le nombre de liaisons hydrogène établies entre la molécule et les acides aminés et leurs longueurs dans ce site ainsi leurs énergies calorifiques.

Le tableau ci-dessous résume tous ses critères :

<sup>123</sup> Lavecchia.A et al, Cdc25B Phosphatase Inhibitors in Cancer Therapy: Latest Developments, Trends and Medicinal Chemistry Perspective *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2008, 8, 843-856.

Tableau n°20: Nombre de LH et leurs longueurs entre les molécules et CDC25A et B, et énergie de pénétration des molécules dans les sites

Ref	CDC25A		CDC25B	
	Energie (Kcal/mol)	Nombre et longueur de LH avec l'AA (Å)	Energie (Kcal/mol)	Nombre et longueur de LH avec l'AA (Å)
1A	-4,5	LH : Arg436 : 2,4 LH : Glu431 : 2,6 ; 2,9	-6,9	LH : Arg482: 2,8
2A	-5,6	LH : Lys470 : 2	-7,3	LH : Ser549 : 2,6
3A	-5,4	2LH : Arg436 : 2,5 et 2,7	-6,5	LH : Arg544 : 2,5
4A	-5,6	2LH : Ser434 : 2,5 Glu431 : 2,6	-7,5	LH: Arg544: 2,7
5A	-3.9	LH : Ser434 : 2,7 LH : Glu431 : 2,7	-7,7	LH : Arg544 : 2,5 LH : Tyr428 : 2,6
6A	-6,2	LH : Ser434 : 2,9	-7,6	LH : Tyr428 : 2,7 LH : Glu446 : 2
7A	-6,1	LH : Arg436 : 2,6 LH : Ser434 : 2,9	-7,8	LH: Arg479: 2,3 LH: Tyr428: 2,6
8A	-5,9	2LH : Ser434 : 2,7 et 2,9	-7,4	LH : Arg479 : 2,2
1B	-6,4	LH : Ser434 : 2,2	-7,8	LH : Pro444 : 2,6 LH : Tyr428 : 2,8
2B	-6,4	LH : Ser434 : 2,3	-7,6	LH : Tyr428 : 2,2 LH : Arg479 : 2,7 et 2,8
3B	-6,3	LH : Ser434 : 2,3	-7,6	LH : Tyr428 : 2,2 LH : Arg544 : 2,6
4B	-6,5	LH : Ser434 : 2,3	-7,5	LH : Tyr428 : 2,2 LH : Arg544 : 2,6
(R)1C	Pas de position favorisée		-7,3	LH : Arg479 : 2,4 2LH : Tyr428 : 2,3 et 2,8
(S)1C	-6,1	LH : Ser434 : 2,9	-8,6	2LH : Tyr428
(R)2C	-5,5	LH : Lys470 : 2,1	-7,1	LH : Arg544 : 2,5
(S)2C	-6,4	2LH : Ser434 : 2,4 et 2,5 ; 2LH : Arg436 : 2,6	-7,3	LH : Tyr428 : 2,3 LH : Arg482 : 2,4
(R)3C	-5,5	LH : Ser434 : 2,3	-7,5	LH: Arg544: 2,6

		LH: Glu431: 2,3		
(S)3C	-6,5	2LH : Ser434 : 2,2 2,7; LH: Arg436: 2,7	-6,8	LH : Arg479 : 2,4 LH : Arg544 : 2,4
(R)4C	pas de position de position favorisée		-8,1	LH : Tyr428 : 2,1
(S)4C	-6,4	LH: Ser434: 2,1 LH: Arg436: 2,7	-7,5	LH: Arg544: 2,6
(R)1D	-6,4	LH: Glu431: 2,2 LH: Arg439: 2,4 LH: Arg436: 2,6	-7,0	2 LH: Arg479: 2,5 et 2,8
(S)1D	Pas de position favorisée		-6,5	LH: Glu478: 2,2 LH: Ser477: 2,3
(R)2D	-5,6	LH: Arg436: 2,2 LH: Glu431: 2,2	-8,3	LH: Glu446: 2 LH: Pro444: 2,6
(S)2D	-6,3	LH: Arg436: 2,5 LH: Ser434: 2,8	-6,6	2LH: Arg479: 2,1 et 2,4 LH: Ser477 : 2,1
(R)3D	-5,9	2LH : Arg436 : 2,3 et 2,8	-6,6	LH: Arg479: 2,5
(S)3D	-6,3	LH: Ser434: 2,9	-6,5	LH: Glu478: 1,8 LH: Ser477: 2,4
(R)4D	-5,8	2LH:Arg436: 2,4 et 2,8	-6,7	LH: Arg479: 2,5
(S)4D	-5,9	LH: Ser434: 2,4 LH: Arg436: 2,5 2LH: Glu431: 2,5 et 2,8	Pas de position favorisée	

D'après les résultats regroupés dans le tableau et celles dans les figures précédentes, on peut conclure que :

- La majorité des composés de la première série bloquent les sites actifs des deux enzymes.
- Les produits de la deuxième série bloquent le site actif de CDC25A, mais non pas celui de CDC25B en exception le composé B2.
- La moitié des énantiomères S des composés de la troisième série ont plus d'aptitude de bloquer le site actif de CDC25A par contre cette pourcentage atteint sa totalité avec le site actif de CDC25B.



- Tous les composés de la dernière série sont capables de bloquer les sites actifs des deux enzymes.
- Les énergies des LH entre les molécules et les sites actifs de CDC25A et CDC25B sont comprises entre -16,3KJ/mol et -36KJ/mol qui appartiennent à l'intervalle de l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) en solution aqueuse qui est comprise entre -10 et -70KJ/mol.
- Les LH ont été établit entre l'Arg436 et la Ser434 du site actif de CDC25A et la majorité des molécules, par contre ces liaisons ont été établit entre l'Arg544, l'Arg479, la Tyr428 et la majorité des molécules synthétisées dans le cas de CDC25B.

Ces résultats sont passés par la suite vers le criblage biologique *in-vitro* en appliquant parallèlement deux méthodes de test différentes (Méthode fluorimétrique et la MS-MALDI/TOF).

## III.2. Criblage par tests biologiques

### III.2.1. Méthode Fluorimétrique

#### III.2.1.1.Principe

L'évaluation de l'inhibition des CDC25 par un composé se fait *via* une méthode fluorométrique, un outil de détection puissant qui permet de mesurer diverses activités enzymatiques.

Les protéines CDC25 utilisées dans des analyses fluorimétriques *in-vitro* sont des protéines recombinantes humaines dans lesquelles CDC25 est relié à une unité de la glutathion-S-transférase (GST). Ces enzymes de fusion sont obtenues par une méthode mise au point dans le laboratoire et qui implique la production de protéines dans *E. coli*.

Les bactéries sont transformées avec un vecteur plasmidique pGex contenant l'ADNc de CDC25 (A, B ou C). Puis, les bactéries sont sélectionnées sur un milieu contenant de l'ampicilline, ce qui permet de ne sélectionner que les bactéries ayant intégré le plasmide (portant un gène de résistance à l'ampicilline). L'introduction d'IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1 Thiogalactopyranoside) permettra la production de protéines recombinantes. Celles-ci sont ensuite extraites et purifiées par chromatographie d'affinité à l'aide d'une colonne de glutathion (GSH) -agarose, qui permet de maintenir les protéines de fusion GST-CDC25 *via* une interaction GSH-GST.

Comme on a déjà indiqué que le fonctionnement du CDC25s est basé sur l'élimination des groupements phosphate d'un substrat, le principe de dosage d'activité de molécules synthétisées est très facile.

Il s'agit de mesurer par fluorimétrie l'activité de cette enzyme et pour cela il sera judicieux de préparer un substrat non fluorescent appelée 3OMF-P (3-O-méthylfluoresceine phosphate) qui subit une déphosphorylation pour donner une molécule fluorescente, le 3-OMF(3-O-méthylfluoresceine) qui peut être excité à 480 nm et émettre à 520 nm (Fig.4).

Le taux de la déphosphorylation du 3-OMF-P est proportionnel à l'activité de CDC25, donc on peut mesurer l'activité *in-vitro* de CDC25 en présence ou en absence du composé potentiellement inhibiteur.

En fait ; en présence d'un inhibiteur, le taux de déphosphorylation du 3-OMF-P sera réduit et par conséquent la production du 3-OMF sera plus faible et générera moins de fluorescence. Ces réactions sont réalisées à 30°C dans un tampon constitué de Tris 50mM, EDTA 1mM, 0,1% de BSA (albumine de sérum bovin) et avec un pH de 8,1.

La température et le pH du tampon permettent le fonctionnement optimal de CDC25.

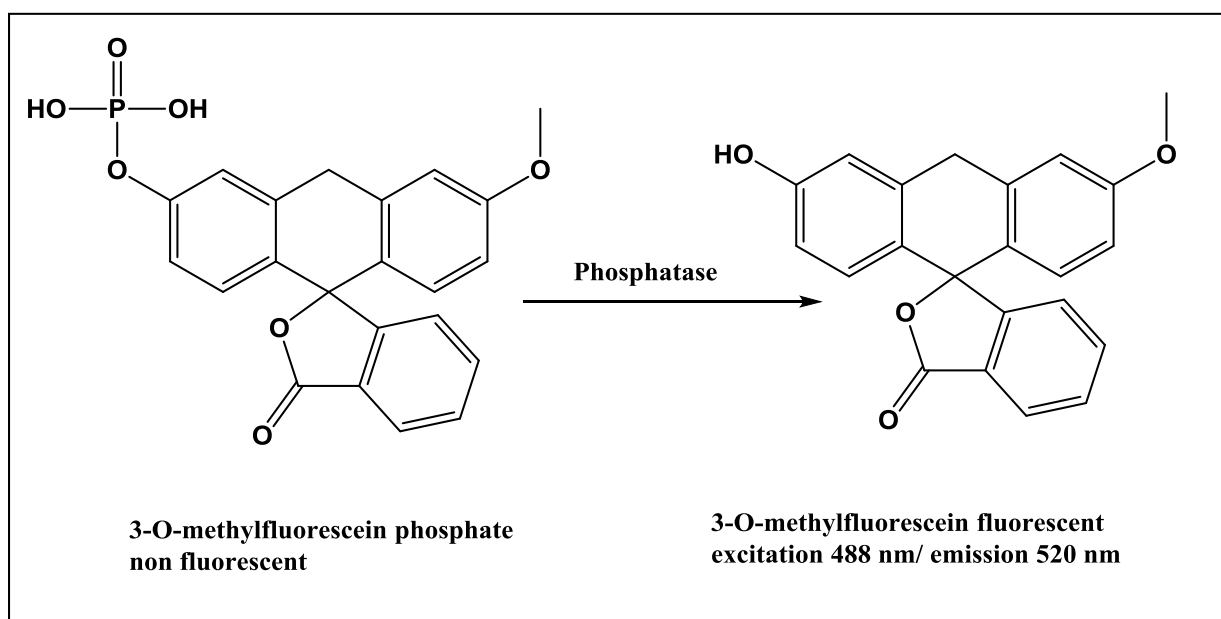


Figure 48: déphosphorylation de 3-OMFP en 3-OMF

### III.2.1.2. Mode Opérateur

La réaction de déphosphorylation est réalisée en triplicat dans des plaques de 96 puits afin de bien contrôler et optimiser les résultats. Le test comprend entre autre :

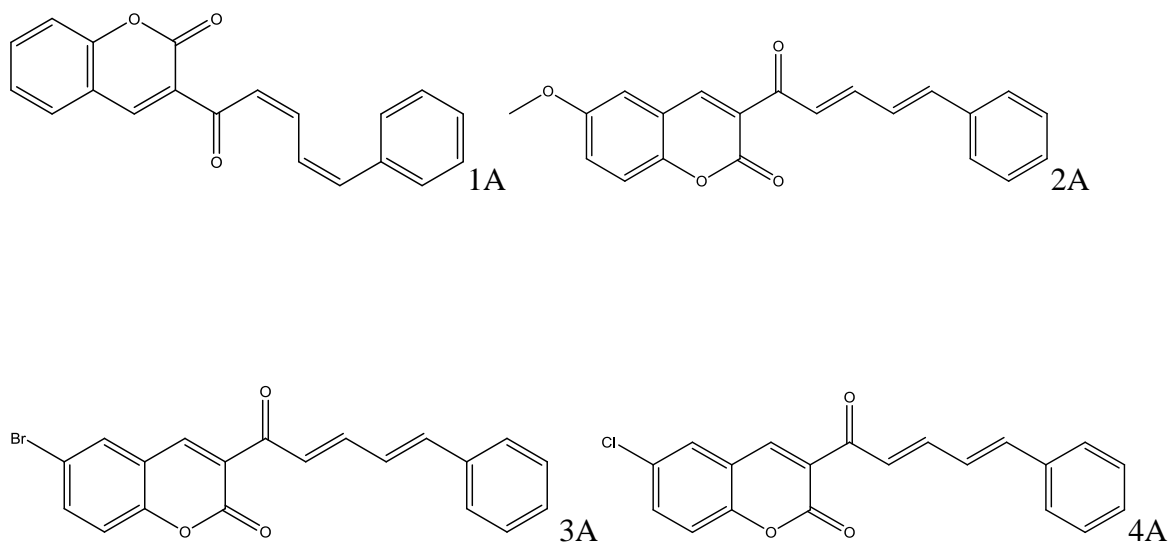


- Le blanc : c'est un témoin contenant du tampon de la réaction et du substrat, il permet de quantifier la fluorescence inhérente à la décomposition spontanée de l'OMF-P lors de la manipulation, ce qui est nécessaire pour calibrer les autres mesures (soustraction de la valeur de cet indicateur pour les calculs).
- Le témoin DMSO : est le témoin négatif de l'inhibition, on évalue l'activité de CDC25 mais sans inhibiteur en présence du solvant DMSO. Nous considérons alors que cela correspond à l'activité CDC25 maximale (la référence est de 100%).
- Le contrôle naphtoquinone : est le contrôle positif de l'inhibition. La naphtoquinone est un inhibiteur puissant de CDC25, utilisé à 20 $\mu$ M. Il permet de vérifier que les CDC25 sont inhibées lors du test.

Pendant l'essai, les protéines recombinantes sont tout d'abord mises en contact avec le composé à tester à une concentration standard de 100  $\mu$ M (si la solubilité le permet), pendant 20 min à 30°C. Cela permet au composé de se lier éventuellement aux phosphatases CDC25. Puis le substrat 3 - OMFP est ajouté et la lecture se fait immédiatement (une lecture toutes les 20min pendant deux heures pour obtenir la cinétique de transformation du substrat).

### III.2.1.3.Résultats

D'après les résultats de docking, on a décidé préférentiellement de faire le test fluorimétrique pour les composés 1A-8A cités en dessous :



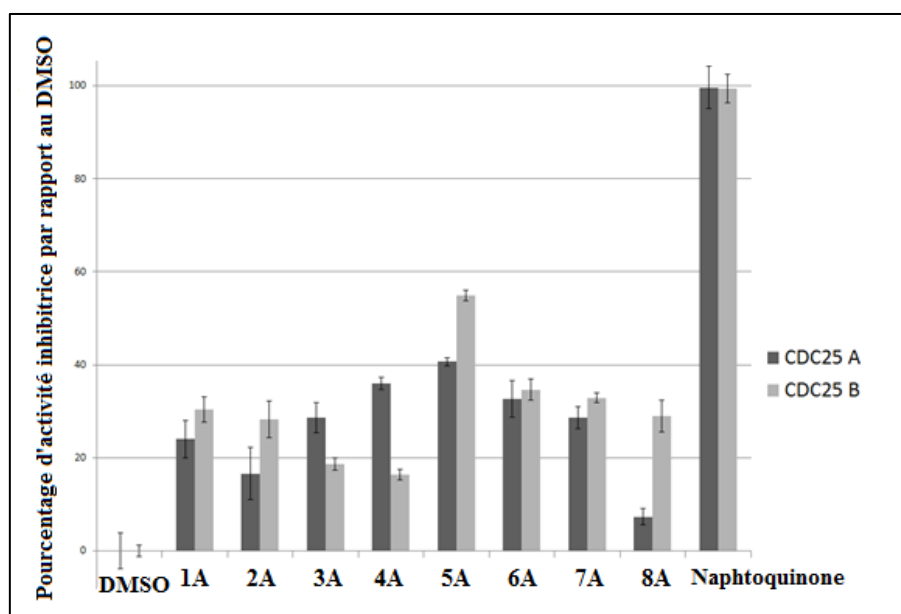
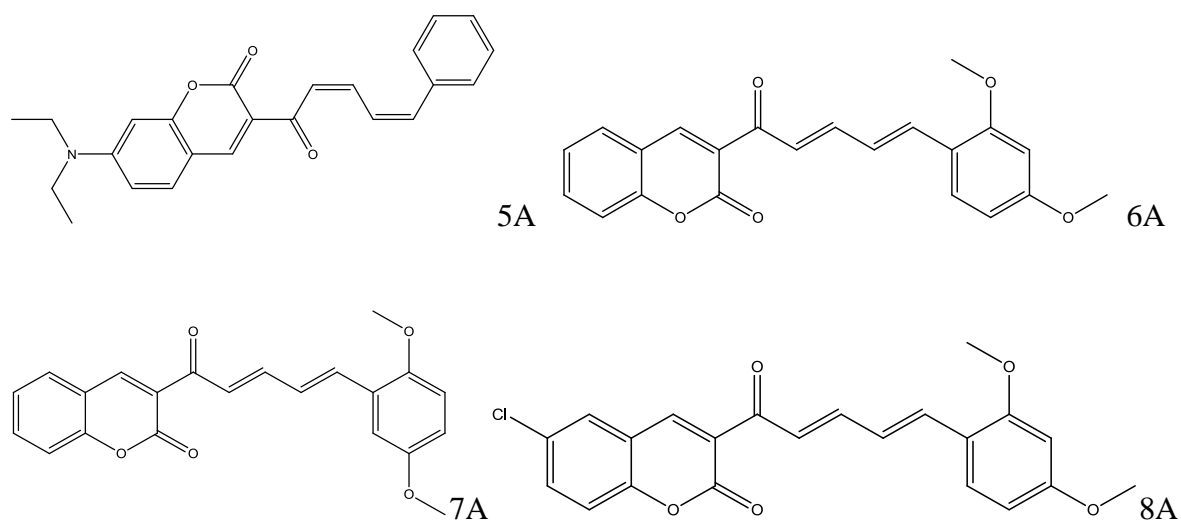


Figure 49: Pourcentage d'activité inhibitrice des produits synthétisés avec le CDC25 A et B à une concentration de 20 $\mu$ M par rapport au DMSO control.

D'après cet histogramme on note que le produit 5A présente une activité inhibitrice plus importante par rapport aux autres produits :

Avec CDC25A :  $41 \pm 0.92\%$ , et avec CDC25B :  $55 \pm 1.13\%$

De plus on note que la substitution électrophile des atomes Cl et Br dans la position 6 sur le noyau coumarinique des produits 3A et 4A, augmente l'activité inhibitrice des molécules avec le DC25A par rapport au composé 2A qui a le groupement méthoxy comme substituant dans la même position. Alors, l'ordre d'activité inhibitrice avec cet enzyme est : 4A>3A>2A qui s'est inversé dans le cas d'activité inhibitrice avec le CDC25B.

Aussi, l'introduction d'un groupe méthoxy sur le fragment phényle a augmenté l'activité du composé 4A envers le CDC25B mais elle l'a diminué avec CDC25A (de 35,95% à 7,34%).

En outre, en comparant les activités des composés 1A, 6A et 7A; il est montré que la substitution du groupe méthoxy sur le cycle phényle a augmenté l'activité contre les deux isoformes CDC25.

### III.2.2. Criblage physico-chimique par MALDI-TOF-MS

#### III.2.2.1. Présentation

- MALDI

L'expression anglaise « matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) » a été établie en 1985 par Franz Hillenkamp, Michael Karas et leurs collègues<sup>124</sup>. Ces chercheurs ont découvert que l'acide aminé : alanine, pouvait être ionisée plus facilement s'il était mélangé avec le tryptophane et irradié avec un laser pulsé à 266 nm. Le tryptophane absorbait l'énergie laser et aidait à ioniser l'alanine non absorbante. Alors, les polypeptides jusqu'à 2843 Da peuvent être ionisés lorsqu'ils sont mélangés avec ce type de « matrice »<sup>125</sup>.

En 1987, cette méthode a été étendue à des grosses molécules avec Koichi Tanaka (de Shimadzu Corp) et ses collègues en combinant des particules de 30 nm de cobalt dans du glycérol avec un laser à azote à 337 nm pour l'ionisation<sup>126</sup>.

En utilisant la combinaison laser-matrice, Tanaka était capable d'ioniser des biomolécules aussi importante que la protéine 34 472 Da carboxypeptidase-A.

En 1988, Karas et Hillenkamp furent capables d'ioniser l'albumine (protéine 67 kDa) en utilisant une matrice d'acide nicotinique et un laser à 266 nm<sup>127</sup>.

Les premiers instruments commerciaux introduits au début des années 1990 conduit de nombreux chercheurs à utiliser la technique MALDI<sup>128</sup>.

---

<sup>124</sup> Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F., Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules, *Analytical Chemistry*, 1985, 57;2935 — 9

<sup>125</sup> Karas, M.; Bachman, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F.; Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds; *International Journal of Mass Spectrometry Ion Proc*, 1987, 78, 53-68

<sup>126</sup> Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T., Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 1988, 2 (20), 151-3

<sup>127</sup> Karas M, Hillenkamp F, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Analytical Chemistry*, 1988, 60 (20), 2299-301 (PMID 3239801)

En 2002, Tanaka a reçu le prix Nobel de chimie, en démontrant qu'une protéine pouvait être ionisée grâce à un alliage de matrice convenable et du laser<sup>129</sup>.

Des améliorations supplémentaires furent réalisées en utilisant un laser à 355 nm et les dérivées de l'acide cinnamique, l'acide férulique, l'acide caféique et l'acide sinapique comme matrice<sup>130</sup>.

Aujourd'hui, la spectrométrie de masse MALDI utilise principalement des matrices organiques et surtout le  $\alpha$ -CHCA et le DHB.

- **Temps de vol (Time Of Flight: TOF)**

Il existe des différentes méthodes utilisées en spectroscopie de masse pour séparer les ions des masses dont les plus connues :

- Une méthode qui se base sur la différence des volumes des ions à séparer : la séparation se fait en appliquant un champ électromagnétique dans le trajet de circulation des ions alors ces derniers vont subir des trajets différents dépendant de leurs volumes jusqu'à ce qu'ils arrivent au détecteur.
- Autre méthode qui est plus commode, c'est de créer un champ statique de fréquence radioélectrique de telle façon que seulement les ions qui ont une masse faible prennent une trajectoire définie et atteignent le détecteur. Cependant, le nom de « time of flight masse analyse » temps de vol pour l'analyse de masse est impliqué, qui relie la masse des ions analysés par leurs temps de vol.<sup>131</sup>

Etant donné que la vitesse et le temps sont reliés par l'équation suivante :

$$\text{vitesse} = \frac{dx}{dt} ,$$

$$\text{Et que la même vitesse} = \sqrt{\frac{2 \times \text{énergie}}{\text{masse}}}$$

Donc le temps de vol se sera calculer selon cette équation :

<sup>128</sup> Karas, M.; Bahr, U., Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Large Biomolecules, *Trends in Analytical Chemistry* 1990, 9, 321-5

<sup>129</sup> K Markides, Gräslund, A, Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002

<sup>130</sup> Beavis RC, Chait BT, Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation, *Rapid Communication in Mass Spectrometry* , 1989, 3 (12), 436-9 (PMID 2520224)

<sup>131</sup> Cotter, R.J, Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Structural Analysis of Biological Molecules; *Analytical Chemistry*, 1992; 64(21), 1027A-1039A

$$(TOF) \text{ temps de vol} = \frac{\text{longueur de tube}}{\text{vitesse}}$$

$$= \text{longueur de tube} \times \sqrt{\frac{\text{masse}}{2 \times \text{energie}}}$$

Donc TOF :  $t = \sqrt{\frac{m}{2eV}} \times \text{longueur de tube}$

### III.2.2.2. Principe de fonctionnement

Toute technique de spectrométrie de masse repose sur la mesure d'un rapport masse sur z ( $m/z$ ). La première étape d'une analyse consiste à ioniser les composés faute de quoi il n'y a pas de résultat.

Le Maldi est une technique d'ionisation douce, donc suite à l'ionisation des macromolécules, leurs fragmentations par des méthodes plus officielles deviennent plus faciles à cause de leurs fragilités. Cette ionisation est déclenchée grâce à un faisceau laser (d'habitude un laser à l'azote). Par prudence et pour qu'il n'y aura pas destruction des molécules par un faisceau direct et alors faciliter la vaporisation et l'ionisation, une matrice est mise en jeu pour cela.

Cette matrice est formée essentiellement par des molécules cristallisées, les plus utilisées sont : l'acide-3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapique), l'acide 2-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB).

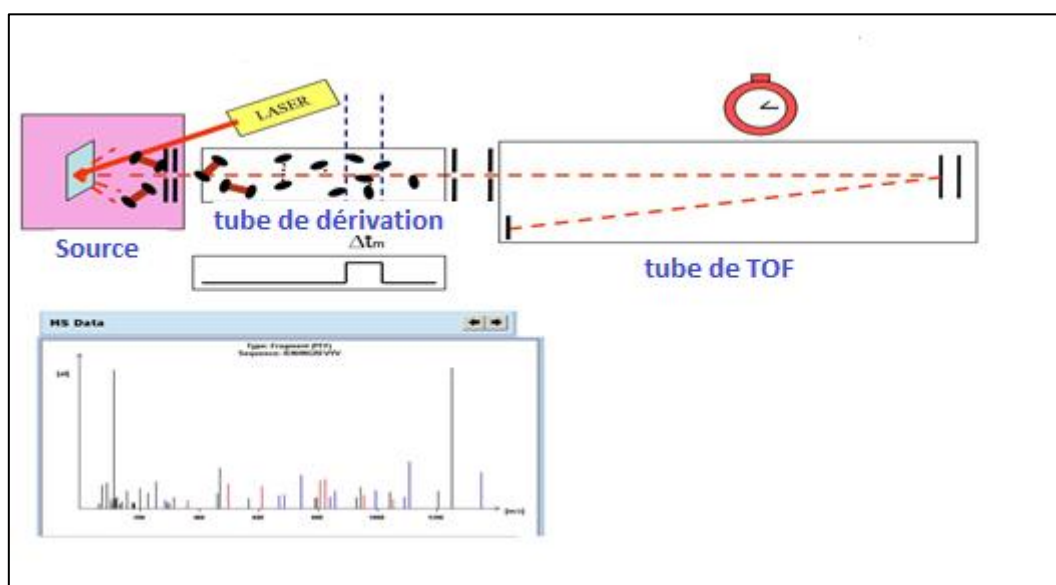


Figure 50: Principe de MALDI-TOF-MS

### III.2.2.3. Principe du criblage

Le principe de criblage est basé sur 3 étapes essentielles :

#### Première étape :

On a préparé des solutions alcooliques des produits à analyser ( $C=10^{-4}M$ ) et on a posé une microlitre de cette solution sur que la plaque métallique sur laquelle on dépose le même volume de la matrice DHB et on refait la même opération avec la matrice HCCA.

Cette opération est réalisé afin d'évaluer l'affinité de ces composés vis-à-vis de ces matrices et choisir la bonne matrice pour chaque produit dans la suite des analyses.

#### Deuxième étape :

C'est l'étape d'incubation des molécules synthétisés déjà passés par les analyses fluorimétrique.

On a suit le mode opératoire utilisé avant dans nos laboratoires<sup>132</sup> avec quelques modifications. En effet, on a préparé des solutions mères alcooliques de concentration  $10^{-2} M$  de chaque produit et de ces solutions on a pris le volume d'un millilitre et on l'a dilué avec l'eau afin d'avoir une concentration final  $2 \cdot 10^{-3} M$ .

Après on a incubé  $40 \mu L$  de cette dernière solution avec  $150 \mu L$  de CDC25A de concentration  $8 \cdot 10^{-5} M$  pendant une heure à  $37^{\circ}C$ . Le mélange d'incubation est transvasé dans des éppendorf contenant des filtres et suivie par centrifugation pendant 10 minute à 12,000 rpm alterné par rinçage avec l'eau ( $2 \cdot 100 \mu L$ ), cette opération est répéter plusieurs fois jusqu'à filtration complète des substrats. Ensuite le retentât a été dissous dans  $20 \mu L$  d'eau distillée. Deux  $\mu L$  de cette solution ont été repéré sur la plaque du MALDI (deux spots pour un seul échantillon en deux lignes), évaporé à sec à température ambiante.

Puis,  $1 \mu L$  de la matrice DHB a été déposée pour l'une des spots et  $1 \mu L$  de HCCA a été déposé sur la deuxième afin d'évaluer la réponse de chaque composé avec chaque matrice, et a conservé le spectre qui avait la réponse intense.

La présence de l'ion moléculaire dans le spectre de MS implique que le produit est un inhibiteur réversible.

---

<sup>132</sup> E. Sibille , E. Bana , W. Chaouni , M. Diederich , D. Bagrel , P. Chaimbault , Development of a matrix-assisted laser desorption/ionization–mass spectrometry screening test to evidence reversible and irreversible inhibitors of CDC25 phosphatases, *Analytical Biochemistry*, 2012, 430 , 83–91

**III.2.2.4.Résultats**

Après évaluation des spectres observés on note que seulement les trois produits 3A, 4A et 5A ont une réponse positive puisque d'après le tableau n°10 on a pu voir les pics des isotopes moléculaire de chaque composé après incubation.

Tableau n°21: Les isotopes observés en spectroscopie de masse après criblage

Ref	Ion	m/z obs.	m/z theo.	Dm(ppm)	Remarque
3A	[M+H] <sup>+</sup>	381,0126	381,0121	1,31	isotope <sup>79</sup> Br
	[M+H] <sup>+</sup>	383,0214	383,0103	29,0	isotope <sup>81</sup> Br
	[M+Na] <sup>+</sup>	403,0060	402,9940	29,8	isotope <sup>79</sup> Br
	[M+Na] <sup>+</sup>	405,0064	404,9942	30,1	isotope <sup>81</sup> Br
4A	[M+H] <sup>+</sup>	337,0665	337,0626	11,6	isotope <sup>35</sup> Cl
	[M+H] <sup>+</sup>	339,0748	339,0604	42,5	isotope <sup>37</sup> Cl
	[M+Na] <sup>+</sup>	359,0445	359,0445	0,0	isotope <sup>35</sup> Cl
	[M+Na] <sup>+</sup>	361,0337	361,0424	-24,1	isotope <sup>37</sup> Cl
5A	[M+H] <sup>+</sup>	374,1805	374,1751	14,4	

Dans la figure ci-dessous, on a regroupé les spectres les plus intenses observés.

On a remarqué que le produit 3A, a donné une réponse très intense avec la matrice DHB par contre les produits 4A et 5A ont donné les meilleurs spectres avec la matrice HCCA.

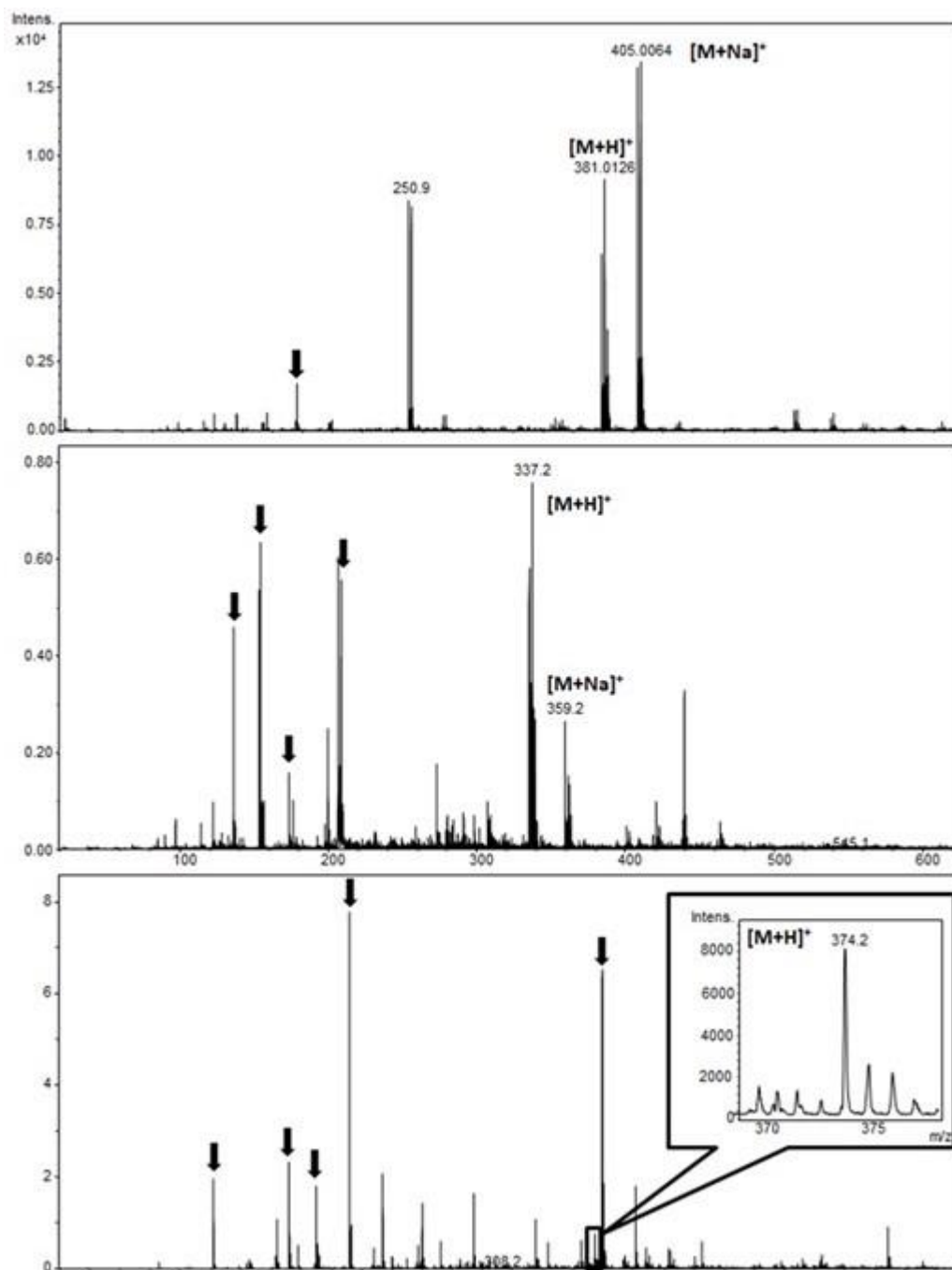


Figure 51: Spectres MS des composés après criblage

On conclure que selon les résultats obtenus par l'analyse MALDI-TOF/MS que les composés 3A, 4A et 5A sont considérés comme des inhibiteurs réversibles pour la CDC25A.



### III.3. Test antioxydant

#### III.3.1. Principe du test DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques<sup>133,134</sup>. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le DPPH<sup>•</sup> reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH<sup>•</sup>. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH<sup>•</sup>, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm. Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes:

- La libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) ;
- La libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylés et des anthocyanes)<sup>135, 136</sup>.

Dans le cas des composés phénoliques (AH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH<sup>•</sup> alors transformé en une molécule stable DPPHH<sup>137,138</sup>.

---

<sup>133</sup> Blois M.S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical, *Nature*, 1958, 181, 1199-1200.

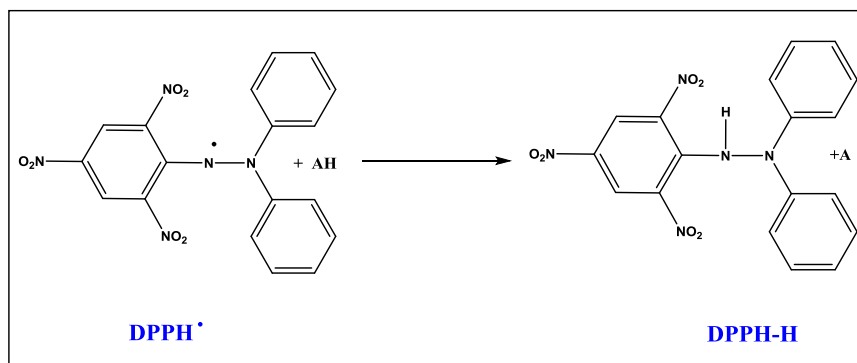
<sup>134</sup> Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 1995, 28, 25-30

<sup>135</sup> Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 1841-1856.

<sup>136</sup> Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Md.* 1996, 21(6), 895-902

<sup>137</sup> Molyneux P., The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 2004, 26 (2), 211-219.

<sup>138</sup> Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A, Saura-Calixto F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1998, 76(2), 270-276.



**Schéma 21: Principe de fonctionnement de DPPH**

La capacité anti-radicalaire (capacité à fixer des radicaux libres, c'est-à-dire la capacité à arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité.

Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier<sup>36</sup>.

### III.3.2. Résultats du test antioxydant

Le tableau ci-dessous regroupe l'activité anti-oxydante effectuée par test DPPH pour les cinq premiers chalcones synthétisés ainsi que celle des 3-acétyl-coumarines substitués.

On note que les cinq premiers produits 1A-5A montrent une activité anti-oxydante meilleure que les réactifs de départ (les 3-acétylcoumarines) ainsi que ces composés ne possèdent aucune activité anti-oxydante pour une concentration de 15µM/mL par contre ils ont montré une activité modeste par rapport au produit de référence (Trolox) à la concentration 5µM/mL.

On note de même que le composé 5A est le plus actif par rapport aux autres composés avec une activité égale à 5,79± 5,82 µMTE/mL à la concentration 5µM/mL.

Tableau n° 22: comparaison de l'activité anti-oxydante des cinq premières chalcones (1A-5A) avec celle des dérivés de 3-acétylcoumarine (1a-5e)

Composé	Activité anti-oxydante ( $\mu$ MTE/mL)	
	5 $\mu$ M /mL	15 $\mu$ M /mL
<b>1A</b>	29,58 (+/- 4,76)	-7,91 (+/- 28,85)
<b>2A</b>	19,95 (+/-0,43)	-11,05 (+/-18,76)
<b>3A</b>	31,61(+/-7,67)	-40,7(+/-5,18)
<b>4A</b>	21,42(+/-7,86)	-50,04(+/-7,56)
<b>5A</b>	5,79(+/-5,82)	-109,58(+/-2,83)
<b>1a</b>	30,29(+/- 3,98)	-20,62(+/-16,15)
<b>2b</b>	27,26(+/-0,68)	11,12(+/-16,96)
<b>3c</b>	32,01(+/-9,17)	-13,03(+/-10,71)
<b>4d</b>	26,39(+/-0,98)	-9,03(+/-8,47)
<b>5e</b>	27,12(+/-10,64)	-16,67(+/-11,36)
<b>Trolox</b>	<b>0,428</b>	<b>0,410</b>

## **Conclusion Et Perspectives**

### Conclusion

Au cours des travaux de thèse, nous avons étudié la synthèse de nouvelles séries de chalcones en combinant des dérivés de 3-acétyl-coumarines avec une série de cinnamaldehydes dans le but d'évaluer leurs activités biologiques.

Premièrement, on a synthétisé cinq dérivés de 3-acétyl-coumarines et huit cinnamaldehydes, qui ont été par la suite condensés entre eux en appliquant la condensation aldolique.

Nous avons évalué le potentiel anticancéreux des composés de différentes séries synthétisées en les passant tout d'abord par le criblage *in-silico* par l'application d'un logiciel de docking (auto-dock vina), afin de prévoir la fixation et l'orientation de ces molécules dans les sites actifs des CDC25 A et B.

On a fait une sélection de molécules selon les résultats obtenus et la disponibilité de la matière première pour le test enzymatique et le pouvoir antioxydant.

Cette sélection a été utilisée pour les essais MALDITOF-MS, permettant d'identifier les molécules réversibles par rapport au CDC25A.

Il a été démontré que les chalcones 3A, 4A et 5A ont une bonne activité inhibitrice vis-à-vis des deux enzymes. Le produit 5A a montré une meilleure activité anti-oxydante que les autres composés.

Ensuite, on a condensé ces 3-acétyl-coumarines avec l'isatine pour synthétiser une deuxième série, qui d'après le docking n'a pas donné des bonnes orientations pour ces derniers dans les sites actifs des CDC25A et B.

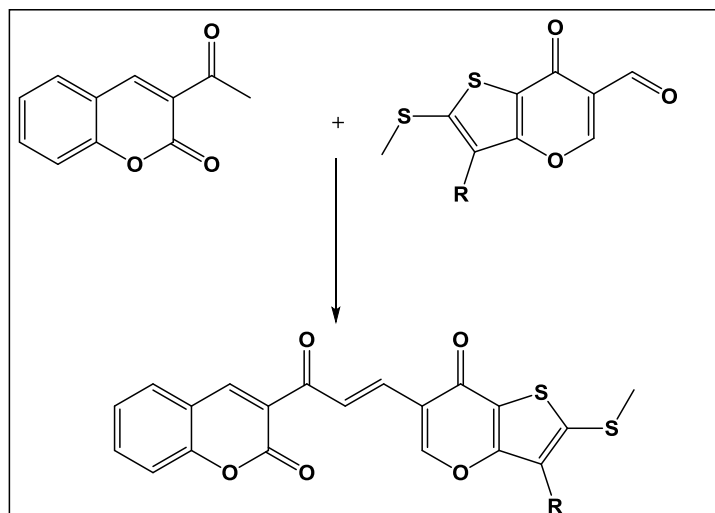
Dans le but d'étendre les résultats de synthèse précédente, nous avons procédé à deux nouvelles condensations pour les chalcones de la première série : l'une avec l'urée, l'autre avec l'hydrazine. D'après le criblage *in-silico*, ces nouveaux produits obtenus ont montré plus d'aptitude de s'intégrer dans les sites actifs de CDC25A et B que celles de la première et la deuxième série.

### Perspectives

Il est certain que les dérivés de séries oxygénés de la famille des flavonoïdes constituent une grande source de produits actifs.

De plus ces composés peuvent se retrouver dans le milieu naturel. Il est donc intéressant de continuer par la synthèse des dérivés coumariniques avec d'autres dérivés de type acides polyphénoliques pour obtenir de nouveaux produits pour des tests biologiques.

Avec l'expérience de notre laboratoire, on peut envisager la formation des chalcones à partir des dérivés 3-acétyl-coumarine avec des aldéhydes dérivés de chromones comme dans le schéma ci-dessous.



Il serait également possible de remplacer le noyau benzénique par son bio-isomère thiophénique, ceci ouvrirait la voie à des molécules originales.

## **Références**

## Références de L'introduction:

<sup>1</sup> H. Abidi, J.S. Mojarrad, H. Asghaloo, G. Zarrini; Synthesis, *in-vitro* antimicrobial and antioxidant activities of chalcones and flavone derivatives having allylic substitutions *Medicinal Chemistry Research*; 2011; 20 (8); 1318-1324.

<sup>2</sup> S. Deperts, G. Kirsch; Synthesis of 5-Methylbenzo[b]thieno[2,3-c]isoquinolines and 5-Methylbenzo[b]seleno[2,3-c]isoquinolines; *European Journal of Organic Chemistry*; 2000; 7; 1353-1357.

<sup>3</sup> G. Sommen, A. Comel, G. Kirsch; A Convenient Synthesis of 2,3,4,5-Functionalised thieno[2,3-b]thiophenes; *Synthesis*; 2003; 5; 735-741.

<sup>4</sup> G. Revelant, S. Hesse, G. Kirsch; Synthesis of novel 2-aminothieno[3,2-d]thiazoles and selenolo[3,2-d]thiazole, *Tetrahedron*; 2011; 67,9352-9357.

<sup>5</sup> S. Hesse, G. Kirsch; Synthesis of new furocoumarin analogues via cross-coupling reaction of triflate; *Tetrahedron Letter*; 2003; 44; 97-99.

<sup>6</sup> Valente.S, Bana.E, Viry.E, Bagrel.D, Kirsch.G; Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases; *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*; 2010; 20; 5827-5830.

## Références du Chapitre I: Les chalcones

<sup>7</sup> Ohashi.H et al, *Cladrastis Platycarpa* constit, struct, *Phytochemistry*, 1977, 16, 1106-1107

<sup>8</sup> Harborne and Baxter, *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive compounds from plants*; Taylor and Francis, London 1993.

<sup>9</sup> J M Henderson and M H Kutner, An analysis of survival and treatment failure following abdominoperineal and sphincter-saving resection in Duke's B and C rectal carcinoma. A report of the NSABP clinical trials; *Annals Surgery*; 1987; 206 (2); 224–226.



- <sup>10</sup> Silfen, J.; Yanai, P.; Cabantchik, Z. I. Bioflavonoid effect on in vitro cultures of plasmodium falciparum. Inhibition of permeation pathways in the host cell membrane by the intraerythrocytic parasite. *Biochemical Pharmacology*. 1988, 37: 4269-4276.
- <sup>11</sup> Charles-Adolphe Wurtz; Ueber einen Aldehyd-Alkohol; *Journal fur Praktische Chemie* ; 1872; 5(1) ; 457-464
- <sup>12</sup> P.C.M. Jansen, D.Cardon ; *Ressources Végétales de l'Afrique Tropicale 3 Colorants et Tanins*, Fondation Porta/Backhuys Publishers/CTA Wageningen, Pays-Bas, 2005, page 95
- <sup>13</sup> Yoshikazu Tanaka, Shinzo Tsuda and Takaaki Kusumi; Metabolic Engineering to Modify Flower Color; *Plant Cell Physiology*; 1998; 39 (11); 1119-1126
- <sup>14</sup> TA Holton and EC Cornish; Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis; *Plant Cell*; 1995; 7 (7); 1071–1083.
- <sup>15</sup> Stefan Martens and Gert Forkman; Cloning and expression of flavone synthase II from Gerbera hybrids; *The Plant Journal*; 1999; 20 (5); 611-618.
- <sup>16</sup> Elio G.W.M. Schijlen , C.H. Ric de Vos , Arjen J. van Tunen , Arnaud G. Bovy; Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants; *Phytochemistry*; 2004; 65; 2631–2648
- <sup>17</sup> Cathie Martin, Francesca Quattrocchio, Erich Grotewold, and Yimei Lin and Ann Hirsch; Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology; *Plant Physiology*; 2001; 126
- <sup>18</sup> Jeffrey E. Young, Janet S. Klosko, and Marjorie E. Weishaar; *Schema Therapy: A Practitioner's Guide*; Guilford Press, New York; 2003, pp436, DOI: 10.1017/S1352465804211869, ISBN: 1-57230-838-9
- <sup>19</sup> Napoli CA, Fahy D, Wang HY, Taylor LP; White anther: a petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility and is complemented by a chalcone synthase transgene; *Plant Physiology*; 1999; 120; 615-622

<sup>20</sup> Van der Meer IM, Stam ME, Van Tunen AJ, Mol JNM, Stuitjie AR; Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility; *Plant Cell*; 1992; 4; 253-262

<sup>21</sup> Ylstra B, Busscher J, Franken J, Hollman PCH, Mol JNM, Van Tunen AJ; Flavonols and fertilization in *Petunia hybrida*: localization and mode of action during pollen tube growth; *Plant Journal*; 1994; Vol 6; 201-212

<sup>22</sup> Jorgensen RA<sup>1</sup>, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA; Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences; *Plant Molecular Biology*; 1996; 5; 957-73.

<sup>23</sup> Deroles, S., Bradley, J.M., Schwinn, K.E., Markham, K.R., Bloor, S., Manson, D.G. and Davies K.M.; An antisense chalcone synthase cDNA leads to novel colour patterns in *lisianthus (Eustoma grandiflorum)* flowers; *Molecular Breeding*; 1998; 4; 59-66.

<sup>24</sup> Palleros, D. R., Solvent-Free Synthesis of Chalcones; *Journal Chemical Education*; 2004; 81; 1345

<sup>25</sup> Toda, F., et al., Aldol condensations in the absence of solvent: acceleration of the reaction and enhancement of the stereoselectivity *Journal of Chemical Society Perkin Trans. I*, 1990, 3207.

<sup>26</sup> F.L.Ansari, S. Umbreen, L.Hussain, T.Makhmoor, S.A. Nawaz, M.A.Lodhi, S.N. Khan, F.Shaheen, M.I. Chhouchary, A.Rahman; Synthesis and biological activities of chalcone and 1,5-Benzothiazepine derivatives :Promising new free-radical scavengers, and Esterase, Urease, and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors; *Journal Of Chemistry and Biodiversity*, 2005; 2; 487-496.

<sup>27</sup> S.S.Mokele, Y.B.Vibhute; Synthesis of some new biologically active chalcones and flavones; *Der Pharma Chemica*; 2009; 1 (2), 145-152.

<sup>28</sup> R.Singh, N.Kumar, M.Yadav, D.Pathak; Microwave-Assisted ,solvent free and parallel synthesis of some newer 2,4-disubstituted 1,5-Benzodiazepines of biological interest; *International Journal of Pharmaceutical Science and Drug Research*; 2013; 5 (3); 88-95.

- <sup>29</sup> C. G. Darshan Raj , B. K. Sarojini , S. Hegde , S. Sreenivasa , Y. S. Ravikumar , V. Bhanuprakash , Y. Revanaiah , R. Ragavendra; In vitro biological activities of new heterocyclic chalcones derivatives; *Medicinal Chemistry Research*; 2013; 22; 2079–2087
- <sup>30</sup> Anto. R, Sukumaran. K, Kunter.G, Rao.M, Subbaraju. V, Kuttan. R; Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds; *Cancer Letters*; 1995; 97; 33-37
- <sup>31</sup> M.L. Go, X. Wu, X.L. Liu; Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties, *Current Medicinal Chemistry*; 2005; 12 (4); 481-499
- <sup>32</sup> Nowakowska Z; A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones; *European Journal of Medicinal Chemistry*. ; 2007; 42 (2); 125-137.
- <sup>33</sup> Ming Chen, Thor G. Theander, Soren Brogger Christensen, Lars Hviid, Lin Zhai, And Arsalan Kharazmil; Licochalcone A, A New Antimalarial Agent, Inhibits In Vitro Growth Of The Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum And Protects Mice From P. Yoelii Infection; *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*; 1994; 1470-1475
- <sup>34</sup> Kharazmi, A., M. Chen, T. Theander, and S. B. Christensen; Discovery of oxygenated chalcones as novel antimalarial agents; *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*; 1997; 91; S91-S95.
- <sup>35</sup> J.C. Aponte, M. Varestegui, E.Malaga, M.Zinic, M.Quiliano, A.J.Vaisberg, R.H. Gilman, G.B. Hammoud; Synthesis, cytotoxicity, and anti-*trypanosoma cruzi* activity of new chalcones; *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008; 51; 6230-6234
- <sup>36</sup> J.C. Aponte, M. Varestegui, E.Malaga, M.Zinic, M.Quiliano, A.J.Vaisberg, R.H. Gilman, G.B. Hammoud; Synthesis, cytotoxicity, and anti-*trypanosoma cruzi* activity of new chalcones; *Journal of Medicinal Chemistry*; 2008; 51,6230-6234.

- <sup>37</sup> F. Azzouni, A. Godoy, Y. Li, J. Mohler; The 5 alpha-reductase isoenzyme family: a review of basic biology and their role in human diseases; *Advances in Urology*; 2012; 530121; 1-18.
- <sup>38</sup> K. Shimizu, R. Kondo, K. Sakai, S. Buabarn, U. Dilokkunanant; A geranylated chalcone with 5 $\alpha$ -reductase inhibitory properties from *Artocarpus incises*; *Phytochemistry*; 2000; 54; 737-739.
- <sup>39</sup> Debarshi Kar Mahapatra, Sanjay Kumar Bharti, Vivek Asati ; Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives ; *European Journal of Medicinal Chemistry*; 2015; 98 ; 69-114
- <sup>40</sup> N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress; *Endocrine Reviews*; 2004; 25 (4); 581-611.
- <sup>41</sup> A.M. Duffy, D.J. Bouchier-Hayes, J.H. Harmey; Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF; *Madame Curie Bioscience Database*
- <sup>42</sup> A. Hoeben, B. Landuyt, M.S. Highley, H. Wildiers, A.T. Van Oosterom, E.A. de Bruijn; Vascular endothelial growth factor and angiogenesis; *Pharmacological Reviews*; 2004; 56; 549-580.
- <sup>43</sup> X. Zhu, B. Xie, J. Zhou, G. Feng, Z. Liu, X. Wei, F. Zhang, M. Liu, Y. Zeng; Blockade of vascular endothelial growth factor receptor signal pathway and antitumor activity of on-III (2',4'- dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone), a component from chinese herbal medicine; *Molecular Pharmacology*; 2005; 67 (5); 1444-1450.
- <sup>44</sup> Y.S. Lee, S.S. Lim, K.H. Shin, Y.S. Kim, K. Ohuchi, S.H. Jung; Anti-angiogenic and anti-tumor activities of 2'-Hydroxy-4'-methoxychalcone; *Biological Pharmaceutical Bulletin*; 2006; 29 (5); 1028-1031.
- <sup>45</sup> J.T. Zilfou, S.W. Lowe; Tumor suppressive functions of p53, *Cold Spring Harbor Perspectives Biology* ; 2009; 1(5); a001883.

<sup>46</sup> D.P. Lane, C.F. Cheok, S. Lain; p53-based Cancer Therapy, *Cold Spring Harbor Perspectives Biology* ; 2010; 2 (9) ; a001222.

<sup>47</sup> R. Stoll, C. Renner, S. Hansen, S. Palme, C. Klein, A. Belling, W. Zeslawski, M. Kamionka, T. Rehm, P. Muhlhahn, R. Schumacher, F. Hesse, B. Kaluza, W. Voelter, R.A. Engh, T.A. Holak; Chalcone derivatives antagonize interactions between the human oncoprotein MDM2 and p53; *Biochemistry*; 2001 ; 40; 336-344.

<sup>48</sup> S.K. Kumar, E. Hager, C. Pettit, H. Gurulingappa, N.E. Davidson, S.R. Khan; Design, synthesis, and evaluation of novel boronic-chalcone derivatives as antitumor agents, *Journal of Medicinal Chemistry*; 2003; Vol 46; pages: 2813-2815.

<sup>49</sup> K.V. Sashidhara, A. Kumar, M. Kumar, J. Sarkar, S.K. Sinha; *Patent WO017454A1*; 2012; Coumarin-chalcones as anticancer agents

<sup>50</sup> Medizinische Universite at Wien assignee; *Patent WO2012013725 A1*; 2012; Vinylogous chalcone derivatives and their medical use

<sup>51</sup> Vivek R. Yadav, Sahdeo Prasad, Bokyung Sung, and Bharat B. Aggarwal; The Role of Chalcones in Suppression of NF- $\kappa$ B-Mediated Inflammation and Cancer; *International Immunopharmacology*; 2011; 11(3); 295–309.

<sup>52</sup> Retno Arianingrum ; Chalcones: The Promising Compounds To Provide New Ways For Cancer Treatment; *Proceeding Of International Conference On Research, Implementation And Education Of Mathematics And Sciences, Yogyakarta State University*, 18-20 may 2014

## **Références du Chapitre II: Résultats et Discussion Chimique**

<sup>53</sup> Bana, E., Sibille, E., Valente, S., Cerella, C., Chaimbault, P., Kirsch, G., Dicato, M., Diederich, M., Bagrel, D; A novel coumarin-quinone derivative SV37 inhibits CDC25 phosphatases, impairs proliferation, and induces cell death; *Molecular Carcinogenesis*; 2015; doi:10.1002/mc.22094

<sup>54</sup> Valente, S., Bana, E., Viry, E., Bagrel, D., Kirsch, G; Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases; *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letter*; 2010; 20; 5827–5830. doi:10.1016/j.bmcl.2010.07.130

<sup>55</sup> Valente, S., Xu, Z., Bana, E., Zwergel, C., Mai, A., Jacob, C., Meiser, P., Bagrel, D., Silva, A.M.S., Kirsch, G; Reactivity of 4-Vinyl-2 H -1-benzopyran-2-ones in Diels-Alder Cycloaddition Reactions: Access to Coumarin-Based Polycycles with Cdc25 Phosphatase-Inhibiting Activity; *European Journal of Organic Chemistry*; 2013; 2869–2877. doi:10.1002/ejoc.201201736.

<sup>56</sup> Daniela Secci, Simone Carradori , Adriana Bolasco , Paola Chimenti , Matilde Yáñez Francesco Ortuso, Stefano Alcaro; Synthesis and selective human monoamine oxidase inhibition of 3-carbonyl,3-acyl, and 3-carboxyhydrazido coumarin derivatives; *European Journal of Medicinal Chemistry* ; 2011; 46; 4846-4852.

<sup>57</sup> Jinbing Liu , Fengyan Wu, Lingjuan Chen , Liangzhong Zhao , Zibing Zhao , Min Wang , Sulan Lei ; Biological evaluation of coumarin derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors; *Food Chemistry*; 2012; 135; pages 2872–2878.

<sup>58</sup> Wafaa S. Hamama, Maged A. Berghot, Eman A. Baz, and Moustafa A. Gouda; Synthesis and Antioxidant Evaluation of Some New 3-Substituted Coumarins; *Archiv Der Pharmazie Chemistry in Life Sciences*; 2011; 344 ; 710–718.

<sup>59</sup> Emil Knoevenagel; Condensation von Malonsäure mit Aromatischen Aldehyden durch Ammoniak und Amine ; *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* ; 1898; 31 (3); 2596–2619.doi:10.1002/cber.18980310308.

<sup>60</sup> Karade, Nandkishor.N; Gampawar,Sumit.V; Shinde,Sandeep.V, Jadhav,Wamanrao.N; 16Proline Catalyzed Solvent-Free Knoevenagel Condensation for synthesis of 3-substituted coumarins; *Chinese Journal of Chemistry*; 2007; 25; 1686-1689.

<sup>61</sup> H. v. Pechmann ; Neue Bildungsweise der Cumarine. Synthese des Daphnetins ; *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* ; 1884 ; 17 (1); 929–936; doi:10.1002/cber.188401701248.

<sup>62</sup> Kok Tong Wong & Norazah Basar; Coumarins via Knoevenagel condensation reaction (KCR) and Pechmann Condensation reaction; *Journal Teknologi*; 2012; 57(Sciences and Engineering) suppl1; 83-98.

<sup>63</sup> Pier Lucio Anelli, Carlo Biffi, Fernando Montanari, and Silvio Quici ; Fast and Selective Oxidation of Primary Alcohols to Aldehydes or to Carboxylic Acids and of Secondary Alcohols to Ketones Mediated by Oxoammonium Salts under Two-Phase Conditions; *Journal of Organic Chemistry*; 1987 ; 52 (12); 2559-2562

<sup>64</sup> Jin Soon Cha, Jong Mi Kim, Joong Hyun Chun, Oh Oun Kwon and Jae Cheol Lee; Conversion of carboxylic acids into aldehydes by oxidation of alkoxylium intermediate with pyridinium chloromate or pyridinium dichromate; *Bulletin of Korean Chemical Society* ; 1998; 19 (7); 730-732

<sup>65</sup> Ji-Dong Lou, Miao Wang 1, Li-Yun Zhu, Zhi-Gang Fang ; Solvent free oxidation of alcohols catalyzed by  $\text{KMnO}_4$  adsorbed on Kieselguhr; *Catalysis Communications*; 2003 ; 4; 647–649.

<sup>66</sup> Tapan.K.Lai, Julie Banerji, Asima Chatterjee and Bidyut Basak; Dielectric activation of  $\text{MnO}_2$ : Part1-Oxidation of conjugated unsaturated alcohols; *Indian Journal of chemistry*; 2005; 44B; 1309-1311.

<sup>67</sup> Christopher M.A. Parletta, Lee J. Durndella, Andreia Machado, Giannantonio Cibinc, Duncan W. Bruceb, Nicole S. Hondowd, Karen Wilson, Adam F. Leea,f; Alumina-grafted SBA-15 as a high performance support for Pd-catalysed cinnamyl alcohol selective oxidation; *Catalysis Today*; 2014; 229 ; 46–55

<sup>68</sup> Mojtaba Mahyari, Ahmad Shaabani, Mohammad Behbahani and Akbar Bagheri; Thiol-functionalized fructose-derived nanoporous carbon as a support for gold nanoparticles and its application for aerobic oxidation of alcohols in water; *Applied Organometallic Chemistry*; 2014; 28; 576–583.

<sup>69</sup> Xueshun Jia,<sup>a</sup> Xiaotao Liu,<sup>a</sup> Jian Li,<sup>a</sup> Peichao Zhao<sup>a</sup> and Yongmin Zhang<sup>b,c</sup>; A general and efficient reduction of acyl chlorides to aldehydes by Sm(0)/Bu<sub>3</sub>P; *Tetrahedron Letters*; 2007; 48; 971–974.

<sup>70</sup> Masahito Yoshida, Hiroyuki Otaka and Takayuki; An Efficient Partial Reduction of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Esters Using DIBAL-H in Flow ; *European Journal of Organic Chemistry*.; 2014 ; pages 6010–6016

<sup>71</sup> Jin Soon Cha, Dae Yon Lee And Jong Mi Kim; Reductive Oxidation Of Carboxylic Acids To Aldehydes With Sodium Borohydride And Pyridinium Chlorochromate ; *Organic Preparations And Procedures International*; 1999; 31 (6); 694-697.

<sup>72</sup> Wittig, G., Schollkopf, U; Über Triphenyl-phosphinmethylene als olefinbildende Reagenzien (I. Mitteil.); *Chemische Berichte*; 1954; 87; 1318–1330; doi:10.1002/cber.19540870919

<sup>73</sup> Abraham A. Wubea, Antje Hufner, Christina Thomaschitz, Martina Blunder, Manfred Kollroser, Rudolf Bauer, Franz Bucar ; Design, synthesis and antimycobacterial activities of 1-methyl-2-alkenyl-4(1H)-quinolones ; *Bioorganic and Medicinal Chemistry*; 2011; 19; 567–579

<sup>74</sup> Vedernikov, A.I., Gromov, S.P; Convenient Method for the Preparation of Crown Ether Cinnamaldehydes. *Synthesis* (Stuttg); 2001; 0889–0892. doi:10.1055/s-2001-13417

<sup>75</sup> Wade, L. G.; Upper Saddle River, Prentice Hall; *Organic Chemistry*; 2005 ; 1056-1066

<sup>76</sup> Smith, M. B.; March, J., *Advanced Organic Chemistry*; John wiley and sons; USA 2001; 1218–1223

<sup>77</sup> Mahrwald, R.; *Modern Aldol Reactions* Volumes 1 et 2 ; 2004; pages : 1218–1223

<sup>78</sup> V. Glover, J. M. Halket, P. J. Watkins, A. Clow, B. L. Goddwin and M. J. Sandler; Isatin-identity with the purified endogenous monoamine oxidase inhibitor tribulin; *Neurochemistry*; 1988; 51; 656–659.



<sup>79</sup> S. N. Pandeya and D. Sriram; Synthesis and screening of antibacterial activity of Schiff and Mannich bases of isatin derivatives; *Acta. Pharm. Turc*; 1998; 40; 33–36.

<sup>80</sup> S. N. Pandeya, D. Sriram, G. Nath and E. De Clercq; Synthesis, antibacterial antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derivatives from isatin derivatives and N-[4-(4'-chlorophenyl) thiazol-2-yl] thiosemicarbazides; *European Journal Pharmaceutical Sciences*; 1999 ; 9; 25–31.

<sup>81</sup> Tanushree Ratan Bal, Balasubramani Anand, Perumal Yogeewari & Dharmarajan Sriram ; Synthesis and evaluation of anti-HIV activity of isatin  $\beta$ -thiosemicarbazone derivatives ; *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*; 2005; 15; 4451–4455

<sup>82</sup> F.L.Ansari, S. Umbreen, L.Hussain, T.Makhmoor, S.A. Nawaz, M.A.Lodhi, S.N. Khan, F.Shaheen, M.I. Chhoudhary, A.Rahman ; Synthesis and biological activities of chalcone and 1 ?5-Benzothiazepine derivatives :Promising new free-radical scavengers, and Esterase, Urease, and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors; *Journal Of Chemistry and Biodiversity*; 2005; 2; 487-496.

<sup>83</sup> S.S.Mokele, Y.B.Vibhute; Synthesis of some new biologically active chalcones and flavones; *Der Pharma Chemica*; 2009; 1 (2), 145-152

<sup>84</sup> Khalid M. Khan, Nida Ambreen , Uzma Rasool Mughal , Saima Jalil , Shahnaz Perveen ,M. Iqbal Choudhary; 3-Formylchromones: Potential antiinflammatory agents; *European Journal of Medicinal Chemistry*; 2010; 45; 4058-4064

<sup>85</sup> Yi Sup Shim, Ki Chul Kim, Dae Yoon Chi, Keun-Hyeung Lee and Hyeongjin Cho; Formylchromone Derivatives as a Novel Class of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors; *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*; 2003; 13; 2561–2563

<sup>86</sup> Siddiqui ZN<sup>1</sup>, Praveen S, Musthafa TN, Ahmad A, Khan AU.; Thermal solvent-free synthesis of chromonyl chalcones, pyrazolines and their in vitro antibacterial, antifungal activities; *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry* ; 2012; 27; 84-91.

<sup>87</sup> Anton Vilsmeier; Haack, A ; The Vilsmeier–Haack reaction ; *Chemische Berichte*.; 1927; 60; 119.

<sup>88</sup> Akira Nohara, Tomonobu Umetani and Yasushi Sanno ;; A Facile Synthesis Of Chromone-3-carboxaldehyde, Chromone-3-carboxylic Acid And 3-Hydroxymethylchromone; *Tetrahedron Letters*; 1973; 22, 1995 - 1998

<sup>89</sup> Sommen.G ; Synthèse de thiophènes, sélénophènes, pyrroles et de leurs systèmes condensés à partir de cétènes-S,S et N,S-acétals ; Thèse de doctorat ; UPVM ; 2007

<sup>90</sup> G. Sommen, A. Comel, G. Kirsch; "A Convenient Synthesis of 2,3,4,5-Functionalised thieno[2,3-b]thiophenes.", *Synthesis*; 2003; 5; 735-741.

<sup>91</sup> Augustin.M ; Rudolf. W. D, Schmidt.U ; Thiophene durch S-alkylierung ; *Tetrahedron* ; 1976 ; 32 (24); 3055-3061.

## **Références du Chapitre IV: Tests Biologiques Sur Les Chalcones Synthétisées**

<sup>92</sup> Strausfeld U, Labbé JC, Fesquet D et al; "Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein"; *Nature* ; 1991; Vol 351 ; issue 6323; pages: 242–245

<sup>93</sup> Rudolph,J; CDC25 phosphatases: Structure, Specificity and Mecanism; *Biochemistry*; 2007; 46 (12); 3595-3604

<sup>94</sup> Annette K. Brenner, Håkon Reikvam, Antonio Lavecchia and Øystein Bruserud, *Molecules* ; 2014 ; 19(11), 18414-18447; doi:10.3390/molecules191118414

<sup>95</sup> Reynolds, R.A et al ; Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G2/M phase transition of the cell cycle; *Molecular Biology* ; 1999 ; 293 ; 559-568

<sup>96</sup> Rudolph ; Targeting the Neighbor's Pool ; *Journal of Molecular Pharmacology* ; 2004 ; 66 ; 780-782

<sup>97</sup> Kristjansdottir, K., Rudolph, J., Kristja, K. & Carolina, N.; CDC25 phosphatases and cancer; *Chemistry and Biology*; 2004; 11 (8)

<sup>98</sup> Wang, Z. ; Trope, C.G. ; Florens, V.A. ; Suo, Z. ; Nesland, J.M. ; & Holm, R., Overexpression of CDC25B, CDC25C, and phospho-CDC25C (Ser216) in vulvar squamous cell carcinomas are associated with malignant features and aggressive cancer phenotypes, *BMC cancer*, 2010, Vol10

<sup>99</sup> Rose Boutros, Valérie Lobjois et Bernard Ducommun; CDC25 phosphatases in cancer cells: Key players? Good target. *Nature Reviews Cancer*; 2007; 7 (7), 495-507

<sup>100</sup> Chen, W. et al; Dual-specific Cdc25B phosphatase: in search of the catalytic acid ; *Biochemistry*; 2000, 39, 10781-10789

<sup>101</sup> Ham S.W. & Carr B.I. 2004, Cell division cycle 25 (CDC25) phosphatase inhibitors as antitumor agent, *Drug Design Reviews-Online*; 2004; 1 (2).

<sup>102</sup> Contour-Galceran, M.O, Sidhu, A, Prevost, G, Bigg, D, Ducommun, B; What's new on CDC25 phosphatase inhibitors; *Pharmacology and therapeutics*; 2007; 115 (1).

<sup>103</sup> Brault, L. ; Denancé, M. ; Banaszak, E. ; El Maadidi, S. ; Battaglia, E. ; Bagrel, D ; & Samadi, M, Synthesis and Biological evaluation of dialkylsubstituted maleic anhydrides as novel inhibitors of CDC25 dual specificity phosphatases; *European Journal of Medicinal Chemistry*; 2007; 42 (2).

<sup>104</sup> Foster, C ; Lazo, J.S ; & Kingston, D.G.I, Sesterpenoids and an alkaloid from a *Thorectandra* sp. as inhibitors of the phosphatase CDC25B; *Bioorganic and Medicinal Chemistry*; 2005a; 13 (17)

<sup>105</sup> Viry, E, Anwar, A, Kirch, G, Jacob, C, Diedrich, M, Bagrel, D, Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases; *International Journal of Oncology*; 2011; 38 (4)

<sup>106</sup> Breza, M.C, Quaranta, M, Contour-Galceran, M.O, Lavergne, O, Modest, O, Auvary, P, Kasprzyk, P.G, Prevost, G.P, Ducommun, B; Inhibition of human tumor cell growth *in-vivo* by

an orally bioavailable inhibitor of CDC25 phosphatases; *Molecular Cancer Therapeutics*; 2005; 4 (9)

<sup>107</sup> Sarkis, M. ; Tran, D.N. ; Kolb, S. ; Miteva, M.A. ; Villoutreix, B.O. ; Garbay, C. ;& Braud, E., Design and synthesis of novel bis-thiazolone derivatives as micromolar CDC25 phosphatase inhibitors: effect of dimerization on phosphatase inhibition; *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*; 2012; 22 (24)

<sup>108</sup> Monks. T.J, Hanzlik.R.P, Cohen.G.M, Ross.D, Graham.D.G, Quinone chemistry and toxicity; *Toxicology and Applied Pharmacology*; 1992; 112 (1)

<sup>109</sup> Kim, K.S, Kawasaki, I, Chong, Y, Shim, Y.-H, Inhibition of overexpressed CDC25.1 phosphatase activity by flavone in *Caenorhabditis elegans*; *Molecules and Cells*; 2009; 27 (3)

<sup>110</sup> Lacy, A & O'Kennedy, R; Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer; *Current Pharmaceutical Design*, 2004; 10 (30)

<sup>111</sup> Lopez-Gonzalez. J.S, Prado-Garcia. H, Aguilar-Cazares. D, Molina-Guarneros. J.A, Morales-Fuentes. J, Mandoki. J.J; Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines; *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*; 2004; 43 (3)

<sup>112</sup> Valente, S.; Bana, E.; Viry, E.; Bagrel, D.; Kirsch, G ; Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases; *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* ; 2010; 20 (19); 5827-5830.

<sup>113</sup> Chao Xie, Yuan Sun, Cheng-Yan Pan, Li-Ming Tang, Li-Ping Guan; 2,4-Dihydroxychalcone derivatives as novel potent cell division cycle 25B phosphatase inhibitors; and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors; *Pharmazie*; 2014; 69; 257–262

<sup>114</sup> J. Zhang, F. Ji, Y. Gu, X. Zhan, S. Qiao; Chalcones derivatives as potent cell division cycle 25B phosphatase inhibitors, *Pharmacological Reports*; 2014; 66; 515-519.

<sup>115</sup> X. Yuan, T. Li, E. Xiao, H. Zhao, Y. Li, S. Fu, L. Gand, Z. Wang, Q. Zheng, Z. Wang; Licochalcone B inhibits growth of bladder cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis, *Food and Chemical Toxicology*; 2014; 65; 242-251.

<sup>116</sup> Shui-Lian Zhao, Zhou Peng, Xing-Hua Zhen, Hong-Guo Jin Yan Han, You-Le Qu, Li-Ping Guan; Potent CDC25B and PTP1B phosphatase inhibitors: 2',4',6'-trihydroxylchalcone derivatives; *Medicinal Chemistry Research*; 2015; 24; 2573–2579

<sup>117</sup> THESE de Alban ARRAULT ; Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma ; 2007;

<sup>118</sup> <http://sts.bioengr.uic.edu/castp/>

<sup>119</sup> Lee, B.; Richards, F.M. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *Journal Molecular Biology*, 1971, 55, 379-400.

<sup>120</sup> Connolly, M. L. Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic-acids, *Science*, 1983, 221, 709-713.

<sup>121</sup> Maréchal, Y. The hydrogen bond and the water molecule, *Elsevier Science and Technology* 2007.

<sup>122</sup> Sathyapriya Rajagopal & Saraswathi Vishveshwara, Short hydrogen bonds in proteins; *FEBS Journal*; 2005; 272; 1819–1832

<sup>123</sup> Lavecchia, A. et al, Cdc25B Phosphatase Inhibitors in Cancer Therapy: Latest Developments, Trends and Medicinal Chemistry Perspective *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2008, 8, 843-856.

<sup>124</sup> Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F; Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules; *Analytical Chemistry*; ;198557; 9-2935

<sup>125</sup> Karas, M.; Bachman, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F., Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds, *International Journal of Mass Spectrometry Ion Proc*; 1987; 78; 53-68

<sup>126</sup> Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T., Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*; 1988; 2 (20), 151-3

<sup>127</sup> Karas M, Hillenkamp F, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons , *Analytical Chemistry*.; 1988, 60 (20), 2299-301

<sup>128</sup> Karas, M.; Bahr, U., Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Large Biomolecules, *Trends in Analytical Chemistry*; 1990; 9; 321-5

<sup>129</sup> K Markides, Gräslund, A, *Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry*; 2002

<sup>130</sup> Beavis RC, Chait BT, Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*; 1989; 3 (12); 436-9

<sup>131</sup> Cotter, R.J, Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Structural Analysis of Biological Molecules; *Analytical Chemistry*; 1992; 64(21); 1027A-1039A

<sup>132</sup> E. Sibille , E. Bana , W. Chaouni , M. Diederich , D. Bagrel , P. Chaimbault; Development of a matrix-assisted laser desorption/ionization–mass spectrometry screening test to evidence reversible and irreversible inhibitors of CDC25 phosphatases; *Analytical Biochemistry*; 2012; 430; 83–91

<sup>133</sup> Blois M.S; Antioxidant determinations by the use of stable free radical; *Nature*; 1958; 181; 1199-1200.

<sup>134</sup> Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity; *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*; 1995; 28; 25-30

<sup>135</sup> Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 1841-1856.

<sup>136</sup> Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996, 21(6), 895-902

<sup>137</sup> Molyneux P., The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 2004, 26 (2), 211-219.

<sup>138</sup> Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A, Saura-Calixto F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1998, 76(2), 270-276.

**Participations Scientifiques, Modules De Formations Et  
Articles**



## Participations Scientifiques:

- DOC SCILOR (6 Juin 2013, Pont-à-Mousson): Présentation Poster: Caractérisation spectrophotométriques et étude quantitative des huiles extraites du persil de deux origines différentes
- Journée Scientifique de Printemps (25 Juin 2013, Nancy): Présentation Orale: Synthèse des flavonoïdes modifiés
- Journée Scientifique de rentrée (22 Novembre 2013, Campus Bridoux-Metz): Présentation Poster : Synthesis of New Modified Flavonoïds
- RICT (Rouen, 2-4 Juillet 2014) et NUTRIOX (Metz, Octobre 2014): Présentation Poster: Synthesis A Series Of New Chalcones Derivatives Of Biological Interest
- Bioheterocycles (Metz, 7-11 Juin 2015): Présentation Poster: Synthesis of new chalcones from substituted 3-Acetyl Coumarins
- RICT (Avignon, 1-3 Juillet 2015): Présentation Poster: Synthesis Of New Derivatives Compounds From Substituted Acetyl-Coumarines
- The Expanding Toolbox of Medicinal Chemistry (16 Octobre 2015, Dijon)

## Modules de formations

- Anglais: Présentation de conférences (session été Juin 2013, Metz)
- Anglais: Le poster (16 Juin 2014)
- Anglais: Présentations de Conférences (session printemps Juin2014, Metz)

## Préparation à l'Après thèse

- Visites d'entreprises (11 juin 2015)

# Synthesis and Molecular modeling of some new chalcones derived from coumarine as CDC25 phosphatases inhibitors

Delel Dridi <sup>(1,2)</sup>, Ahmed B. Abdelwahab <sup>(1)</sup>, Emilie Bana <sup>(1)</sup>, Patrick Chaimbault <sup>(1)</sup>, Faouzi Meganem <sup>(2)</sup>, Gilbert Kirsch <sup>(1)\*</sup>

1) Université de Lorraine, Laboratoire de Synthèse et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes  
UMR-SRSMC 7565, Equipe Hécrin, 1 boulevard Arago, 57070 Metz Technopôle-France

2) Laboratoire de Synthèse Organique, Faculté des Sciences de Bizerte, Jarzouna 7021-Bizerte-Tunisie

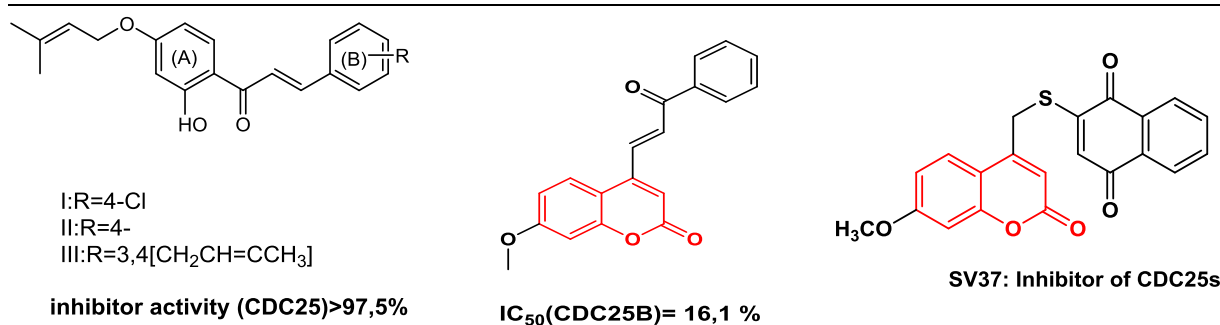
**Abstract:** New chalcones derived from coumarines were synthesized and tested as CDC25 phosphatase inhibitors. Molecular modeling of these new compounds was also presented in aim to study the mode of compounds orientation within CDC25 A and B. The reversibility of compounds 3, 4 and 5 was confirmed by application of MALDI-TOFMS technique.

**Keywords:** Chalcones, Coumarines, CDC25 phosphatase, MALDI-TOFMS, Molecular Modeling

## Introduction

CDC25 (Cell Division Cycle) are dual specificity phosphatase that play critical role in the division of eukaryotic cells. Up to date, three CDC25 isoforms were identified: A, B and C <sup>1-4</sup>. They dephosphorylate CDK/cyclin protein complexes which are key regulator of cell division. Noteworthy, CDC25B is needed for checkpoint recovery to repair DNA before mitosis <sup>3,5</sup>.

CDC25A and CDC25B are overexpressed in many different human cancers: (e.g.: breast cancer: 70% and 57%, colorectal cancer: 47-53% esophageal cancer: 46-66% and 48-79% respectively) <sup>1</sup>. Consequently, they appear as potential target in cancer therapy. Wide range of different scaffolds has been reported as CDC25 phosphatase inhibitors including quinoids, dysidiolide and large collection of miscellaneous structures <sup>6,7</sup>. Chalcones has numerous biological activities containing antihypertensive, antifungal, anticonvulsant, antiviral, antioxidant, anti-inflammatory, antimalarial, anti-HIV, antiprotozoal, antimicrobial, antifilarial, <sup>8,9</sup> they also proved their antitumor activities through their action against many molecular targets <sup>10</sup>. The substituted chalcones in position 4 of ring (B) was even reported as CDC25 inhibitors with considerable activity (**Figure 1**) <sup>11</sup>. Coumarines are well known as anticancer <sup>12</sup> with many different mechanisms like kinase inhibitors, apoptosis induction, angiogenetic inhibition, HSP90 inhibitors, telomerase inhibitor and antimitotic. <sup>13</sup> Some coumarines have anticoagulant and cardiovascular properties (dicoumarol and warfarin) others have antibiotic activities as novobiocin and clorobiocin which are naturally occurring. <sup>14</sup> Geiparvarin is another example of coumarine with dual activities: MAO-B inhibitory and antitumor. <sup>15</sup> Comarine has been combined with different pharmacophores, and showed antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, and antimicrobial activities. <sup>16</sup> Some of them, hybridized with quinones <sup>17,18</sup> or dimerized thanks to a sulfide bond of various lengths (**Figure 1**) <sup>19</sup> are particularly active.



**Figure 1:** Examples of substituted and coumarin based chalcones inhibitors of CDC25s

Synergistically, coumarin and chalcones combined structure appeared as promising anticancer molecules; it showed their capabilities against number of human cell lines,<sup>20</sup> hence, series of novel chalcones derived from coumarin were synthesized by aldol condensation. The obtained structures were investigated by docking simulation and then evaluated on cell free CDC25A and B.

## Results and Discussion

### Chemistry

All compounds were synthesized by well-known base-catalyzed aldol condensation<sup>21</sup> between 3-acetyl coumarins and cinnamaldehyde. Previously, in our laboratory, substituted 3-acetyl coumarins were prepared starting from salicylaldehyde<sup>22</sup> and ethylacetoacetate (Finnegan et al., 1960; Starčević et al., 2011). Commercially available cinnamaldehyde and other synthesized derivatives have been introduced as condensed partner. In addition cinnamaldehydes compounds were synthesized with two different methods:

Method A consists in the reduction of a cinnamic acid using LiAlH(OtBu)<sub>4</sub><sup>25</sup> Method B consists in a Wittig reaction<sup>26</sup> between a benzaldehyde and an acetal<sup>27</sup>. All compounds prepared were purified by column chromatography (cyclohexane: ethyl acetate 9:1).

### Biological evaluation

#### Fluorimetric analysis

Compounds **1** to **8** were evaluated *in-vitro* against recombinant human CDC25 phosphatases by fluorimetric method. (**Table 1**)

**Table 1:** Inhibitory activity of product **1-8** with CDC25A and B (concentration of compounds 20 μM)

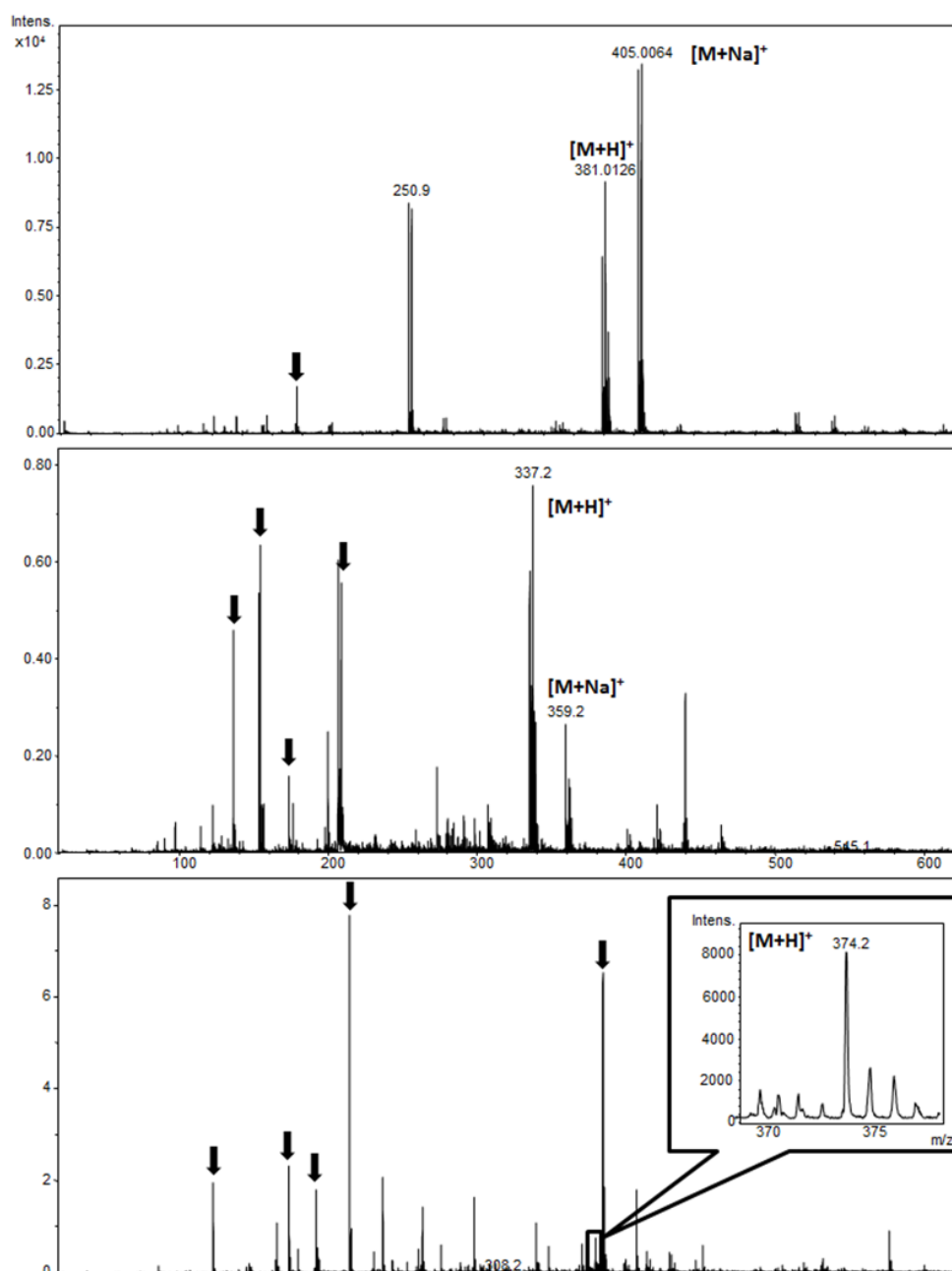
compounds	CDC25A (%)	CDC25B (%)
DMSO	0±3.81	0±1.25
1	24.02±3.98	30.42±2.66
2	16.59±5.59	28.32±3.95
3	28.65±3.23	18.39±1.29
4	35.95±1.29	16.42±1.13
5	40.64±0.92	54.94±1.13
6	32.72±3.97	34.63±2.31
7	28.56±2.38	32.89±1.09
8	7.34±1.77	28.94±3.43
Naphtoquinone	99.68±4.52	99.41±3.12

The electrophilic substitution: Cl and Br on position 6 of the coumarine part; led to inhibit CDC25A in more extent than methoxy substituted analogue, the order of activity of these compounds was **4**>**3**>**2**. This order was inversed in the case of CDC25B. Introduction of methoxy group on the phenyl moiety increase the activity of compound **4** toward CDC25B but it diminished with CDC25A (from 35.95% to 7.34%). Furthermore, comparing the activities of compounds **1**, **6** and **7**; it showed that the methoxy group substitution on the phenyl ring increased the activity against both isoforms. The substitution on position 7 of coumarine with N, N-diethylamine (compound **5**) increased the inhibitory activity on CDC25A: 40.64±0.92% and CDC25B: 54.94±1.13%). This compound is finally corresponding to the most potent candidate among all tested structures (table 1).

### ***MALDI-TOFMS***

Matrix-assisted laser desorption/ionization– time-of-flight mass spectrometry (MALDI–TOFMS) was applied to check if the synthesized structures may be candidate to CDC25 inhibition. In case of inhibition, the applied procedure is also able to inform about its reversibility or irreversibility.<sup>28</sup>

Compounds with the highest values in biological analysis as inhibitor (**3**, **4** and **5**) gave a positive results in MALDI-TOFMS Their protonated molecular ion directly appeared in the mass spectrum meaning that they behaves as reversible inhibitors as described by *Sibille et al.*<sup>29</sup> and *Bana et al.*<sup>17</sup>



**Figure 2:** MALDI-TOF mass spectra (reflectron mode) of compounds **3**, **4** and **5** from up chart to down (DHB matrix for compound **3** and HCCA matrix for compounds **4** and **5**,  $C = 2 \times 10^{-4}$  M) and CDC25A incubated with them. The ion  $m/z=381.01$ ,  $m/z=337.2$  and  $m/z=374.2$  corresponding to  $[M+H]^+$  of **3**, **4** and **5** respectively.

### ***Molecular modelling***

The molecular surface scanning of CDC25B reveals that its 3D structure exhibits a large groove just close to active cysteine<sup>30</sup>. Thus, this site called swimming pool also appears as an interesting target for inhibiting CDC25 by the binding of small molecules.<sup>31</sup>

Hence, the binding inside this catalytic site cannot only be taken into account as a dependable mode of inhibition. We suggested designing of chalcones derived from coumarine and investigating the designed products by docking simulation to test the mode of orientation of each moiety in relation to active and inhibitory sites. Possibility of formyl pyranone ring to surrogate the phosphate group of the native substrate was presumed<sup>6</sup>.

The surface structure of the CDC25B catalytic domain (1QB0)<sup>32</sup>, indicated that the distance between the shallow active site and the large groove is  $\sim 7.3$  Å. This distance must correspond to the linker length between the position 3 of the coumarine and the position 1 of the ring (B) of the chalcone-like moiety for inhibitor in 3D model.

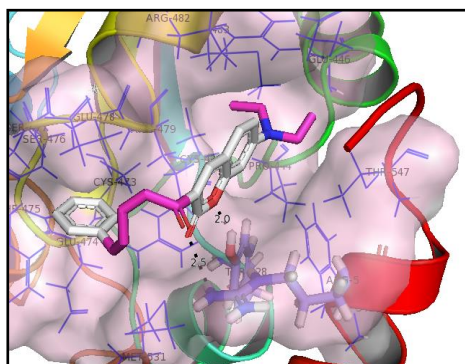
Using CDC25B as key model, it we found that conjugating ketone-diene chain (n=2) afforded provide a better linker length than a single double bond (n=1) for our approach. Coumarine was one of the counterparts of choice while the other was substituted aromatic ring, and they were intended to be hybridized.

**Table 2:** synthesized derivatives and their molecular modeling interaction scores with CDC25 phosphatase A and B indicating hydrogen bonds (number and length) and energy.

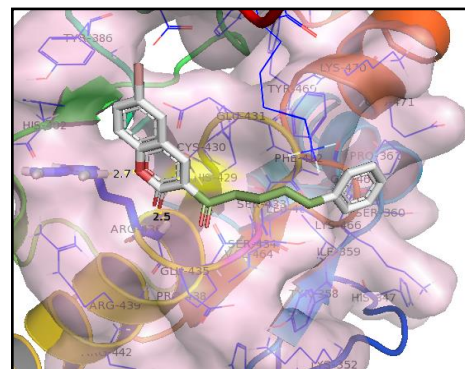
Compounds	R1	R2	CDC25A			CDC25B		
			Energy (Kcal/mol)	HB no°	Length (Å°)	Energy (Kcal/mol)	HB no°	Length (Å°)
1	H	H	-4.5	3	2.4; 2.6; 2.9	-6.9	1	2.8
2	6-OMe	H	-5,6	1	2	-7.3	1	2.6
3	6-Br	H	-5,4	2	2 ; 2.5	-6.5	1	2.7
4	6-Cl	H	-5,6	2	2.5 ; 2.6	-7.5	1	2.7
5	7-N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	H	-3.9	2	2.7	-7.7	2	2.5; 2.6
6	H	2,4-OMe	-6.2	1	2.9	-7.6	2	2; 2.7
7	H	2,5-OMe	-6.1	2	2.6; 2.9	-7.8	2	2.3; 2.7
8	6-Cl	2,4-OMe	-5,9	2	2.7; 2.9	-7.4	1	2.2

The docking study was achieved using AUTODOCK Vina<sup>33</sup>. We assumed that a coumarine compound is able to bind the cysteine of the catalytic site of CDC25B. Our docking study has shown that, for the half of the structures tested, the coumarine part rather fitted inside the swimming pool of CDC25B, while the chalcone part entered the active site. This is observed for compounds **1**, **4**, **5** (**Figure 3**) and **6** blocked whereas it is the contrary for compounds **2**, **3**, **7** and **8**.

The docking with CDC25A was more challenging as the catalytic cysteine is located inside very shallow groove, with a very small cavity appearing unsuitable for fitting neither coumarine nor phenyl moiety of the compounds series. The docking results show that the most of molecular poses are oriented in a way that the coumarine was toward the catalytic cysteine (cys430) which complying with phosphates group simulation assumption (**1**, **2**, **3** (**Figure 4**), **4**, **5**, **6**). (**Table 1**) This orientations similar to phosphate cradling model of the native substrate<sup>34</sup>. Compounds **7** and **8** had their binding mode in the opposite direction.



**Figure 3:** Compound 5 docking orientation with CDC25B interacting by two hydrogen bonds with Tyr428 and Arg544



**Figure 4:** Docking of compound 3 with CDC25A forming two Hydrogen bonds with Arg436

Even if a docking itself could not give of the explanation of the inhibitory activity<sup>29,35–47</sup>, so it will be necessary to synthesize these molecules and evaluated their biological activities with CDC25A and B their verification of their reversibility.

The CDC25s have two interest sites: the active site and the swimming pool which can play an important role, so it will be efficient if both of them are tested in same time.

It has been suggested that the hybrid structure may be more efficient at inhibiting CDC25s. Indeed, the first moiety of the inhibitor could fit the binding pocket (i.e. the swimming pool) while the other part dejectedly could bind the active cysteine<sup>48</sup>.

## Conclusion

The antitumor characteristics of both coumarine and chalcones inspired our approach to design hybrid structures could block both grooves of the protein (active and inhibitory) highlighting the lack of toxicity in the same time.

Several chalcones derived from coumarine were synthesized, the binding modes of them were tested by molecular modelling simulation, the probability of phosphate surrogating by coumarine ring has been shown by certain derivatives. Biological evaluation revealed some activity of the compounds. N, N-diethylamine substitution on position 7 of coumarine (compound **5**) augmenting the inhibitory activity on both isoforms of CDC25. The derivatives proved to perform reversible inhibition by MALDI-TOF analysis (compounds **3**, **4** and **5**). The designed scaffold could be considered as a basis of further lead optimization in order to obtain better inhibition.

## Experimental Section

### Chemistry

All solvents were used as purchased unless otherwise noted.

Melting points were determined on a Buchi 530 digital melting point apparatus. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 400 MHz and 100 MHz, respectively, using Me<sub>4</sub>Si as the internal standard. Hydrogen coupling patterns are described as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), multiplet (m).

High resolution mass spectra were measured using a MicroTof-Q98 instrument in ESI mode. Column chromatography was performed using silica gel (60M, 0.04-0.063 mm). Thin layer chromatography (TLC) was performed using silica gel plates (POLYGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>, 0,20mm). For the visualization, TLC plates were placed under UV light.

## General procedure for synthesis of compounds 1 to 8

In round bottom flask, 1.1 mmole of cinnamaldehydes and 1 mmole of substituted 3-acetyl coumarine were mixed in ethanol, and stirred under reflux till dissolving of coumarine derivatives. Afterward, 5% mole of piperidine was added and the reaction retained under reflux for 24 h. When the reaction completed, the solution allowed to be cooled, and the product started to precipitate. The obtained solid was filtered and recrystallized using ethanol.

### 3-(1-Oxo-5-phenyl-2Z,4Z-pentadien-1-yl)-2H-1-benzopyran-2-one (1)

Yellow powder; Yield: 52%; Mp: 184°C. <sup>49</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)=7.07 (d, 1H, *J*=6Hz); 7.08 (d, 1H, *J*=8Hz); 7.35- 7.42 (m, 5H); 7.68-7.70 (d, 1H, *J*=8Hz); 7.67-7.69(dd, 1H, *J*=8Hz, *J*=1.6Hz); 7.52-7.54(dd, 1H, *J*=8.4Hz; *J*=1.6 Hz); 7.51-7.34(d,1H, *J*=9.6Hz); 7.49-7.52(d, 1H, *J*=10Hz); 7.72 (d,1H, *J*=2.4Hz); 8.60 (s,1H ); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)=116.7, 118.6, 124.9, 125.39, 127.3, 127.4, 128.9, 129.3, 130, 134.1, 136.1, 142.7, 145.2, 147.8, 155.2, 186.3.

HRMS (ESI): *m/z* [ M+Na]<sup>+</sup> calculated for C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>: 302,32; found : 325,085

### 6-Methoxy- 3-(1-Oxo-5-phenyl-2E,4E-pentadien-1-yl)-2H-1-benzopyran-2-one (2)

Yellow powder; Yield: 24%; Mp: 190°C.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)= 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 7.07 (s, 1H); 7.09 (dd, 2H, *J*=5.6Hz and *J*=2.5Hz ); 7.24 (d, 1H, *J*=6Hz) ; 7.32-7.35 (d, 1H, *J*=14.4Hz) ; 7.33-7.38(dd, 1H, *J*=18Hz); 7.36-7.40 (d, 1H, *J*=14.4Hz) ; 7.50 (d, 1H, *J*=6.8Hz); 7.53 (dd,2H, *J*=8Hz); 7.60 (t,1H); 7.68 (dd, 1H, *J*=18Hz); 8.50 (s,1H) ; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)= 55.9, 111.0, 117.8, 118.9, 122.6, 125.5, 127.3, 127.4, 127.5, 128.9, 129.3, 136.1, 142.7, 145.1, 147.7, 149.9, 156.4, 159.4, 186.4.

HRMS (ESI): *m/z* [ M+Na]<sup>+</sup> calculated for C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>: 332.35; found 355.095

### 6-Bromo-3-(1-Oxo-5-phenyl-2E,4E-pentadien-1-yl)-2H-1-benzopyran-2-one (3)

Yellow-orange powder; Yield: 54%; Mp: 237°C. <sup>50</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)= 7.08 (d, 1H, *J*=6Hz) ; 7.30 (d, 1H, *J*=16Hz) ; 7.38 (m, 3H) ; 7.46 (d, H, *J*=16Hz) ; 7.53 (d, 2H, *J*=9.2Hz); 7.68 (dd, 1H, *J*=16.8Hz); 7.71 (dd,1H,*J*=16.8Hz); 7.73 (dd, 1H, *J*=2.4 Hz and *J*=8Hz); 7.81 (d, 1H, *J*=2.4Hz); 8.48 (s,1H) ; 8.47 (s,1H) ; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)=117.5, 118.4, 119.7, 125.5, 127.5, 128.9, 132.2, 137, 145.9, 154.1, 158.5, 194.9.

HRMS (ESI): *m/z* [ M+Na]<sup>+</sup> calculated for C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>3</sub>: 380,9; found: 402,994

### 6-Chloro-3-(1-Oxo-5-phenyl-2E,4E-pentadien-1-yl)-2H-1-benzopyran-2-one (4)

Yellow-orange powder; Yield: 70%; Mp: 244°C <sup>50</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)= 7.08 (d, 2H, *J*=6Hz) ; 7.34 (d, 1H, 14Hz) ; 7.36 (d, 1H, *J*=8.8Hz) ; 7.41 (m,2H); 7.46 (d, H, *J*=14.4Hz); 7.53 (d,1H, *J*=6.8Hz); 7.61(dd, 1H, *J*=14Hz); 7.55 (d, 1H, *J*=1.2Hz); 7.7 (dd, 1H, *J*=14Hz); 8.50 (s,1H) ; 8.47(s,1H) ; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)= 118.1 ; 119.2 ; 125.5 ; 127.1 ; 127.2 ; 127.5 ; 128.9 ; 129.1 ; 129.5 ; 130.3 ; 133.9 ; 134.2 ; 143.1 ; 145.6 ; 146 ; 158.6 ; 195.

HRMS (ESI): *m/z* [ M+Na]<sup>+</sup> calculated for C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>3</sub>: 336,06; found: 359,045



**7-N,N-diethylamino-3-(1-Oxo-5-phenyl-2Z,4Z-pentadien-1-yl)-2H-1-benzopyran-2-one (5)**

Orange powder; Yield: 33% ; Mp: 166°C<sup>51</sup>

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)=1.17 (t,6H); 3.38 (q,4H); 6.40 (d, 1H, J=1.6Hz); 6.54 (dd, 1H, J=2.5Hz and 9.2Hz); 6.98 (d,1H, J= 10Hz) ; 7.08 (dd,1H, J= 10Hz and 10.8Hz) ; 7.23 (d,1H ) ; 7.31 (m,5 H ) ; 7.33 (d, H,J=9.2Hz); 7.57 (d ,1H, J= 9.6Hz) ; 7.60 (dd,1H ,J= 9.6Hz);8.45 (s:1H) ; <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 12.5 ; 30.6 ; 96.7 ; 108.7 ; 109.8 ; 116.8 ; 127.3 ; 127.8 ; 128.8 ; 131.8 ; 136.4 ; 141.2 ; 143.5 ; 148.6 ; 153.0 ; 158.6 ; 160.9 ; 186.4.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculated for C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>: 373,17; found: 396,158

**3-[1-Oxo-5-(2,4-diméthoxyphenyl)-2E,4E-pentadien-1-yl]-2H-1-benzopyran-2-one (6)**

Red Powder; Yield: 31%; Mp: 195°C

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 3.88 (s ,3H); 3.92 (s,3H); 6.54-6.56 (2d, 2H, J=2.4Hz and J=8Hz), 6.48 (d,1H, J=2Hz), 7.34-7.43 (m,3H), 7.63 (s,1H), 7.66- 7.69 (dd,2H, J=18Hz), 7.89 (d,1H, J=16Hz), 8.17 (d ,1H, J=16Hz), 8.56 (s,1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 55.5, 98.4, 105.6, 116.6, 117.2, 118.7, 122, 124.8, 126.1, 129.8, 131.1, 133.8, 140.7, 147.3, 155.1, 159.3, 160.7, 163.5, 186.8.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculated for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>: 362.12; found 385.015

**3-[1-Oxo-5-(2,5-diméthoxyphenyl)-2E,4E-pentadien-1-yl]-2H-1-benzopyran-2-one (7)**

Yellow powder; Yield: 36%; Mp: 132°C.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)= 3.75 (s,3H, OMe), 3.81 (s,3H, OMe), 6.48 (d,1H, J=8Hz); 6.79(d,1H, J=8.8Hz); 6.88 (dd,1H, J<sub>1</sub>=6Hz, J<sub>2</sub>=2.4Hz), 7.14 (d,1H, J=3.2Hz), 7.36 (dd,1H, J=14.4Hz); 7.38(dd,1H, J=14.4Hz); 7.58 (m,2H); 7.86 (d,1H, J=16Hz), 8.10 (d, 1H, J=16Hz); 8.17(d,1H,J=7.2Hz); 8.48 (s,1H). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm)= 55.9, 56.2, 112.6, 113.4, 116.7, 118.2, 118.6, 124.4, 124.6, 124.9, 125.7, 129.9, 134.0, 140, 147.7, 153.6, 153.7, 155.2, 159.3.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculated for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>: 362.12; found 385.015

**6-Chloro-3-[1-Oxo-5-(2,4-diméthoxyphenyl)-2E,4E-pentadien-1-yl]-2H-1-benzopyran-2-one (8)**

Colorless solid, Yield: 20%; Mp: 80°C

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 3.77 (s,3H); 3.88 (s ,3H), 6.34(s1H); 6.38(dd,2H, J=8Hz); 6.4(dd,1H, J=16Hz); 6.7(d,1H,J=15.5Hz); 7.36(d,1H, J=16Hz);7.43 (dd, 2H, J=8.4Hz); 7.57 (dd,1H, J=15.5Hz ) ; 7.24 (d, H) ; 7.99 (s,1H) ; 8.47 (s,1H); <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ(ppm)= 55.4, 60.1, 98.5, 105.2, 116.2, 116.7, 130.4, 139.9, 145, 153, 159.8, 162.6, 167.9, 182.49, 199.13.

HRMS (ESI): m/z [ M+Na]<sup>+</sup> calculated for C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>ClO<sub>5</sub>: 396.08; found 418.9755

### ***Docking simulation***

3D structures of all compounds were designed and the best conformer picked by VEGA ZZ 2.3.1 software<sup>52</sup>. It was also used for adjusting the force field of the molecule as AMBER, and atomic charge which applied as Gasteiger, products was energetically minimized using MOPAC and finally introduced as PDB format.

CDC25B (1QB0) and CDC25A (1C25)<sup>53</sup> phosphatase catalytic domain was obtained from the Protein Data Bank. AutoDock Tools was employed to remove unwanted elements and water. It transformed to PDBQT file format, to make them ready for docking which was processed using AUTODOCK Vina. Docking parameters was adjusted as the following

CDC25B: Grid box centered in X= 18.3, Y= 4.6, Z= 16.3, Volume = 23\*23\*23 Å

CDC25A: Grid box center: X= 11.6, Y= 40.2, Z= 69.3, Volume = 16\*16\*18 Å

Pymol software<sup>54</sup> was used for visualization and determination of the interaction of compounds with enzyme.

### ***Biological evaluation***

Recombinant human CDC25 phosphatases were prepared by previously described method<sup>19</sup>. Assay took place in 96-well plates; buffer solution was adjusted in the following quantities: 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.1% Bovine Serum Albumine, pH 8.1. Incubation period of substrate 3-O-methylfluorescein phosphate with enzyme was 2 h in 30°C. Enzyme was exposed to the inhibitors for 20 min and the residual activity of the enzyme has been determined by fluorimetric method.

### ***MALDI/TOFMS***

All compounds were dissolved in ethanol at a concentration of 10<sup>-2</sup> M. The solution were then further diluted to 2.10<sup>-3</sup> M with ultrapure water. Phosphatases CDC25A was solubilized in Tris A buffer (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1 mM dithiothreitol [DTT], pH 8.0) at a concentration of 8.10<sup>-5</sup>M. One hundred and fifty µl of CDC25A was incubated with 40 µl of compounds for 1 h. Solution was ultracentrifugated on Microcon filter unit with a mass cutoff of 30 kDa (Millipore). The unbound material was eliminated by centrifugation during 10 min at 12,000 rpm and washed three times by 100 µL of ultrapure water. The retentate was then dissolved in 20 µL of ultrapure water. Two µl of the retentate was spotted on the MALDI plate (2 spot for sample in two line) , evaporated to dryness at room temperature. Then one µl of saturated solution of DHB (dihydroxybenzoic acid) was deposited for one of spot and HCCA (α-hydroxycinnamic acid) was deposited for the second spot of each sample on the plate to evaluate the response of each compound with both of matrix, and conserved the spectrum which had the intense response.

The presence of the protonated molecular ion in the MS spectrum is corresponding to a reversible inhibitor activity.

---

**References**

1. R Boutros, V Lobjois, B Ducommun; CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? ; *Nat Rev Cancer*; **2007**;7(7);495-507.
2. B Baratte, L Meijer, K Galaktionov, D Beach; Screening for antimitotic compounds using the cdc25 tyrosine phosphatase, an activator of the mitosis-inducing p34cdc2/cyclin Bcd13 protein kinase; *Anticancer Res*; **1992**;12(3);873-880.
3. SW Ham, BI Carr; Cell Division Cycle 25 (Cdc25) Phosphatase Inhibitors as Antitumor Agents; *Drug Des Rev - Online*; **2004**;1(2);10.
4. P Kaldis; The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals; *Cell Mol Life Sci C*. **1999**;55(2);284-296.
5. B Bugler *et al.* Genotoxic-activated G2-M checkpoint exit is dependent on CDC25B phosphatase expression; *Mol Cancer Ther*; **2006**;5(6);1446-1451.
6. MO Contour-Galcerá, A Sidhu, G Prévost, D Bigg, B Ducommun; What's new on CDC25 phosphatase inhibitors; *Pharmacol Ther*; **2007**;115(1);1-12.
7. A Lavecchia., C Di Giovanni, E Novellino; CDC25 Phosphatase Inhibitors: An Update. *Mini Rev Med Chem*; **2012**;12(1);62-73.
8. BP Bandgar, SA Patil, BL Korbád, SH Nile, CN Khobragade; Synthesis and biological evaluation of beta-chloro vinyl chalcones as inhibitors of TNF-alpha and IL-6 with antimicrobial activity; *Eur J Med Chem*; **2010**;45(6);2629-2633.
9. Singh P, Anand A, Kumar V; Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review; *Eur J Med Chem*; **2014**;85C;758-777.
10. DK Mahapatra, SK Bharti, V Asati; Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives; *Eur J Med Chem*; **2015**;98; 69-114.
11. J Zhang, F-J Ji, Y Gu, X-Y Zhang, S-X Qiao; Chalcones derivatives as potent Cell division cycle 25B phosphatase inhibitors; *Pharmacol Rep*; **2014**;66(3);515-519.
12. ME Riveiro, *et al*; Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives; *Curr Med Chem*; **2010**;17;1325-1338.
13. A Thakur, R Singla, V Jaitak; Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies; *Eur J Med Chem*; **2015**;101;476-495.
14. F Borges, F Roleira, N Milhazes, L Santana, E Uriarte; Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity; *Curr Med Chem.*; **2005**; 12(8);887-916.
15. A Carotti, *et al*; Natural and synthetic geiparvarins are strong and selective MAO-B inhibitors. Synthesis and SAR studies; *Bioorganic Med Chem Lett*; **2002**;12(24);3551-3555.
16. S Sandhu, Y Bansal, O Silakari, G Bansal; Coumarin hybrids as novel therapeutic agents; *Bioorg Med Chem*; **2014**;22(15);3806-3814.
17. E Bana, *et al.*; A novel coumarin-quinone derivative SV37 inhibits CDC25

- phosphatases, impairs proliferation, and induces cell death; *Mol Carcinog*; **2015**;54(3); 229-241.
18. S Valente, *et al.*; Reactivity of 4-Vinyl-2 H -1-benzopyran-2-ones in Diels-Alder Cycloaddition Reactions: Access to Coumarin-Based Polycycles with Cdc25 Phosphatase-Inhibiting Activity; *European J Org Chem*; **2013**(14):2869-2877.
  19. S Valente, E Bana, E Viry, D Bagrel, G Kirsch; Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases; *Bioorg Med Chem Lett*. **2010**;20(19):5827-5830.
  20. KV Sashidhara, A Kumar, Kumar M, Sarkar J, Sinha S; Synthesis and in vitro evaluation of novel coumarin-chalcone hybrids as potential anticancer agents; *Bioorg Med Chem Lett*; **2010**;20(24);7205-7211.
  21. A Wurtz.; Ueber einen Aldehyd-Alkohol; *J für Prakt Chemie*; **1872**;5(1);457-464.
  22. T Hirai, H Togo; Preparation and Synthetic Use of Polymer-Supported Acetoacetate Reagent; *Synthesis (Stuttg)*; **2005**; (16);2664-2668.
  23. Š Starčević, *et al.*; Synthesis and biological evaluation of (6- and 7-Phenyl) coumarin derivatives as selective nonsteroidal inhibitors of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; *J Med Chem*; **2011**;54(1);248-261.
  24. Ra Finnegan, B Gilbert, Ej Eisenbraun, C Djerassi; Naturally Occurring Oxygen Heterocyclics. VIII. 1 Synthesis of Some Coumarins Related to Mammecin 2; *J Org Chem*; **1960**;25(12);2169-2173.
  25. A I Vedernikov, S P Gromov; Convenient Method for the Preparation of Crown Ether Cinnamaldehydes; *Synthesis (Stuttg)*; **2001**(06);0889-0892.
  26. G Wittig, U Schollkopf; Über Triphenyl-phosphinmethylene als olefinbildende Reagenzien (I. Mitteil.); *Chem Ber.*; **1954**;87(9);1318-1330.
  27. A a Wube, *et al.*; Design, synthesis and antimycobacterial activities of 1-methyl-2-alkenyl-4(1H)-quinolones; *Bioorg Med Chem*; **2011**;19(1);567-579.
  28. E Sibille, *et al.* Development of a matrix-assisted laser desorption / ionization – mass spectrometry screening test to evidence reversible and irreversible inhibitors of CDC25 phosphatases; *Anal Biochem*; **2012**;430(1);83-91.
  29. H Park, *et al.*; Discovery of Novel and Potent Cdc25 Phosphatase Inhibitors Based on the Structure-Based De Novo Design; *Bull Korean Chem Soc*; **2009**;30(6);1313-1316.
  30. J Rudolph.; Cdc25 phosphatases: structure, specificity, and mechanism; *Biochemistry*. **2007**;46(12);3595-3604.
  31. J Rudolph.; Targeting the Neighbor's Pool.; *Mol Pharmacol*; **2004**;66(4):780-782.
  32. PDB code:1QB0, <http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do>.
  33. O Trott, AJ Olson; AutoDock Vina; *J Comput Chem*; **2010**;31;445-461.
  34. J Sohn, *et al.* Experimental validation of the docking orientation of Cdc25 with its Cdk2-CycA protein substrate; *Biochemistry*; **2005**;44(50);16563-16573.

- 
35. J Markovits, *et al.*; Differential effects of two growth inhibitory K vitamin analogs on cell cycle regulating proteins in human hepatoma cells; *Life Sci*; **2003**;72(24);2769-2784.
  36. E Braud, *et al.*; Novel naphthoquinone and quinolinedione inhibitors of CDC25 phosphatase activity with antiproliferative properties; *Bioorg Med Chem*; **2008**;16(19);9040-9049.
  37. M Sarkis, *et al.*; Design and synthesis of novel bis-thiazolone derivatives as micromolar CDC25 phosphatase inhibitors: Effect of dimerisation on phosphatase inhibition; *Bioorganic Med Chem Lett*; **2012**;22(24);7345-7350.
  38. S Kar, M Wang, SW Ham, BI Carr; H32, a non-quinone sulfone analog of vitamin K3, inhibits human hepatoma cell growth by inhibiting Cdc25 and activating ERK; *Cancer Biol Ther*; **2006**;5(10);1340-1347.
  39. JW Yang, *et al.*; A unique and rapid approach toward the efficient development of novel protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibitors based on “clicked” pseudo-glycopeptides; *Bioorganic Med Chem Lett*; **2011**;21(4);1092-1096.
  40. XP He, *et al.*; Facile fabrication of promising protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibitor entities based on “clicked” serine/threonine-monosaccharide hybrids; *Bioorganic Med Chem*; **2011**;19(13);3892-3900.
  41. XP He, *et al.*; Discovering the distinct inhibitory effects between C4-epimeric glycosyl amino acids: new insight into the development of protein tyrosine phosphatase inhibitors; *Glycoconj J*; **2011**;28(7);493-497.
  42. S Kolb, *et al.*; Development of novel thiazolopyrimidines as CDC25B phosphatase inhibitors; *ChemMedChem*; **2009**;4(4);633-648.
  43. A Lavecchia, S Cosconati, V Limongelli, E Novellino; Modeling of Cdc25B dual specificity protein phosphatase inhibitors: Docking of ligands and enzymatic inhibition mechanism; *ChemMedChem*; **2006**;1(5);540-550.
  44. H Park, YH Jeon; Toward the virtual screening of Cdc25A phosphatase inhibitors with the homology modeled protein structure; *J Mol Model*; **2008**;14(9);833-841.
  45. M Montes, *et al.*; Receptor-based virtual ligand screening for the identification of novel CDC25 phosphatase inhibitors; *J Chem Inf Model*; **2008**;48(1);157-165..
  46. H Park, *et al.*; Discovery of novel Cdc25 phosphatase inhibitors with micromolar activity based on the structure-based virtual screening; *J Med Chem*; **2008**;51(18);5533-5541.
  47. JC Collins, *et al.*; Prospective use of molecular field points in ligand-based virtual screening: efficient identification of new reversible Cdc25 inhibitors; *Medchemcomm*. **2013**;4;1148.
  48. T Besset, *et al.*; Preparation and evaluation of a set of bis(methoxycarbonylmethylthio) heteroquinones as CDC25B phosphatase inhibitors; *Eur J Chem*; **2011**;2(4);433-440.

- 
49. OO Ajani, OC Nwinyi; Microwave-assisted synthesis and evaluation of antimicrobial activity of 3-{3-(s-aryl and s-heteroaromatic)acryloyl}-2 H -chromen-2-one derivatives; *J Heterocycl Chem*; **2010**;47(1);179–187.
  50. BS Jayashree, S Arora, KN Venugopala; Microwave Assisted Synthesis of Substituted Coumarinyl Chalcones as Reaction Intermediates for Biologically Important Coumarinyl Heterocycles; *Asian J Chem*; **2008**;20(1);1-7.
  51. DP Specht, SY Farid, KL Payne, CG Houle; Co-initiator compositions for photopolymerization containing 3-keto-substituted coumarins, photopolymerizable composition and photographic element; European Patent EP 22188 A2 ; **1981**;Eur. Pat. Appl.; **1981**; Jan 14, **1981**
  52. A Pedretti, L Villa, G Vistoli; VEGA - An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming; *J Comput Aided Mol Des*; **2004**;18(3);167-173.
  53. PDB code:1C25, <http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do>.
  54. WL DeLano; The PyMOL Molecular Graphics System; *Schrödinger LLC* [www.pymol.org](http://www.pymol.org); **2002**;Version 1.:<http://www.pymol.org>.