



UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE
FACULTE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES
BÉNI MELLAL



THESE DE DOCTORAT NATIONAL

CED : Sciences et Techniques

Spécialité : Chimie Bioorganique

Présentée par

HAKIMA CHICHA

**Evaluation Pharmacologique de Nouvelles Molécules
Hétérocycliques Synthétiques et Naturelles Extraites du Caroubier**

Soutenue publiquement le 20/09/2014, devant le Jury composé de :

B. MERNARI	PES	Président de l'Université Sultan Moulay Slimane	Président
M. AKSSIRA	PES	Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia	Rapporteur
F. OUZZANI	PES	Faculté des Sciences et Techniques Fès	Rapporteur
M. BAKASSE	PES	Faculté des Sciences El Jadida	Rapporteur
A. HANNIOUI	PH	Faculté des Sciences et Techniques Béni-Mellal	Examineur
M. ALAOUI	PH	Faculté des Sciences et Techniques Béni-Mellal	Examineur
E.M. RAKIB	PES	Faculté des Sciences et Techniques Béni-Mellal	Directeur de thèse
A. BOULI	PES	Faculté des Sciences et Techniques Béni-Mellal	Codirecteur de thèse

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été effectuée au Laboratoire de Chimie Organique et Analytique (LCOA) de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal sous la direction du Professeur El Mostapha RAKIB.

Le présent travail a fait l'objet de **seize publications** et **cinq communications** internationales.

A- Liste des publications :

- 1) **H. Chicha**, E. M. Rakib, A. Hannioui, M. Saadi, L. El Ammari. *N*-(3-Chloro-4-ethoxy-1-methyl-1*H*-indazol-5-yl)-4-methoxybenzenesulfonamide. *Acta Cryst Section E*, **2014**, *E70*, 679.
- 2) **H. Chicha**, E. M. Rakib, L. Bouissane, M. Saadi, L. El Ammari. *N*-(1-Allyl-3-chloro-4-ethoxy-1*H*-indazol-5-yl)-4-methyl-benzenesulfonamide. *Acta Cryst Section E*, **2014**, *E70*, 653.
- 3) **H. Chicha**, E. M. Rakib, L. Bouissane, M. Viale, M. Saadi, L. El Ammari. *N*-(2-Allyl-4-ethoxy-2*H*-indazol-5-yl)-4-methyl-benzenesulfonamide. *Acta Cryst Section E*, **2014**, *E70*, 624.
- 4) **H. Chicha**, E. M. Rakib, O. Amiri, M. Saadi, L. El Ammari. *N*-(3-Chloro-1-methyl-1*H*-indazol-5-yl)-4-methylbenzenesulfonamide. *Acta Cryst Section E*, **2014**, *E70*, 181.
- 5) N. Abbassi, E. M. Rakib, **H. Chicha**, L. Bouissane, A. Hannioui, C. Aiello, R. Gangemi, P. Castagnola, C. Rosano, M. Viale. Synthesis and antitumor activity of some substituted indazole derivatives. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2014**, 347, 423-431.
- 6) **H. Chicha**, A. Kouakou, E. M. Rakib, M. Saadi, L. El Ammari. *N*-(2-Allyl-4-chloro-2*H*-indazol-5-yl)-4-methoxybenzenesulfonamide hemihydrate. *Acta Cryst Section E*, **2013**, *E69*, 1353.
- 7) **H. Chicha**, E. M. Rakib, H. Abderrafia, M. Saadi, L. El Ammari. *N*-(1-Allyl-1*H*-indazol-5-yl)-4-methylbenzenesulfonamide. *Acta Cryst Section E*, **2013**, *E69*, 1847.
- 8) **H. Chicha**, N. Abbassi, E. M. Rakib, M. Khouili, L. El Ammari, D. Spinelli. Reduction of 3-nitrophthalic anhydride by SnCl₂ in different alcohols: a simple synthesis of alkyl 3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzoxazole-4-carboxylates. *Tetrahedron Letters*, **2013**, 54, 1569–1571
- 9) **H. Chicha**, E. M. Rakib, L. Bouissane, M. Saadi, L. El Ammari. *N*-(1*H*-Indazol-5-yl)-4-methoxybenzenesulfonamide. *Acta Cryst Section E*, **2013**, *E69*, 1702.
- 10) **H. Chicha**, E. M. Rakib, L. Bouissane, M. Saadi, L. El Ammari. *N*-(3-Chloro-1*H*-indazol-5-yl)-4-methoxybenzenesulfonamide. *Acta Cryst Section E*, **2013**, *E69*, 1632.

- 11) **H. Chicha**, E. M. Rakib, D. Geffken, M. Saadi, L. El Ammari. N-(1-Allyl-1H-indazol-5-yl)-4-methoxybenzenesulfonamide hemihydrate. *Acta Cryst Section E*, **2013**, E69, 1589.
- 12) **H. Chicha**, B. oulemda, E. M. Rakib, M. Saadi, L. El Ammari. 4-Methyl-N-(1-methyl-1H-indazol-5-yl)-benzenesulfonamide. *Acta Cryst Section E*, **2013**, E69, 1471.
- 13) **H. Chicha**, E. M. Rakib, D. Geffken, M. Saadi, L. El Ammari. 4-Methoxy-N-(1-methyl-1H-indazol-5-yl)benzenesulfonamide. *Acta Cryst Section E*, **2013**, E69, 1398.
- 14) **H. Chicha**, E. M. Rakib, D. Spinelli, M. Saadi, L. El Ammari. 1-Allyl-3-chloro-5-nitro-1H-indazole. *Acta Cryst Section E*, **2013**, E69, 1410.
- 15) N. Abbassi, **H. Chicha**, E. M. Rakib, A. Hannioui, M. Alaoui, A. Hajjaji, D. Geffken, C. Aiello, R. Gangemi, C. Rosano, M. Viale. Synthesis, antiproliferative and apoptotic activities of N-(6(4)-indazolyl)-benzenesulfonamide derivatives as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 57, 240-249.
- 16) E.M. Rakib, **H. Chicha**, S. Abouricha, M. Alaoui, A. Bouli, M. Hansali, R.W. Owen. Determination of Phenolic Composition of Carob pods Grown in Different Regions of Morocco. *Journal of Natural Products*, **2010**, Vol. 3, 134-140.

B- Liste des communications

- 1) **H. Chicha**, N. Abbassi, A. Hannioui, E.M. Rakib, M. Saadi, L. El Ammari, M. Benchidmi, E.M. Essassi. New synthesis of substituted indazoles induced by reduction of N-alkyl-5-nitroindazoles with stannous chloride. **Communication-Poster** au Colloque Transméditerranéen de chimie Hétérocyclique (TRAMECH VII), **27-30** novembre **2013**, Faculté des sciences Rabat, Maroc.
- 2) N. Abbassi, E. M. Rakib, **H Chicha**, A. Hannioui, C. Aiello, R. Gangemi, M. Viale. Synthesis and antitumor activity of some N-[6-indazolyl]arylsulfonamides. **Communication-Poster** au Colloque Transméditerranéen de chimie Hétérocyclique (TRAMECH VII), **27-30** novembre **2013**, Faculté des sciences Rabat, Maroc.
- 3) A. Kouakou, **H Chicha**, N. Abbassi, A. Hannioui, E. M. Rakib, M. Benchidmi, E.M. Essassi. Studies on the reduction of N-alkyl-nitroindazoles with indium and stannous chloride in ethanol. **Communication-Poster** au Colloque Transméditerranéen de chimie Hétérocyclique (TRAMECH VII), **27-30** novembre **2013**, Faculté des sciences Rabat, Maroc.
- 4) N. Abbassi, E.M. Rakib, **H. Chicha**, A. Hannioui, M. Alaoui, A. El Malki, D. Geffken, C. Aiello, M. Viale. Synthesis, Antiproliferative and Apoptotic Activities of New N-(Ethoxy-1H-Indazol-4(6)-yl)-Arylsulfonamide Derivatives. **Communication-Poster** au 1^{ère} Edition Internationale de Chimie Médicinale au Maroc, **24-25** Mai **2012**, Faculté des Sciences et Techniques, Béni-Mellal, Maroc.
- 5) **H. Chicha**, E. M. Rakib, M. Alaoui, A. Hafid, A. Bouli, R. W. Owen, M. Viale. Phenolic Concentrations and Anticancer Activity of Ethanolic Extracts of Carob Pods Grown in Morocco. **Communication-Poster** au 1^{ère} Edition Internationale de Chimie Médicinale au Maroc, **24-25** Mai **2012**, Faculté des Sciences et Techniques, Béni-Mellal, Maroc.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Organique et Analytique de la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane de Béni-Mellal sous la direction du Professeur **El Mostapha RAKIB**.

J'adresse mes premiers remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur **El Mostapha RAKIB**, directeur du Laboratoire de Chimie Organique et Analytique à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal, pour son encadrement exemplaire, pour la confiance qu'il m'a toujours accordée, pour ses brillantes idées et pour son étonnante disponibilité malgré son emploi du temps plus que chargé ! Je souhaite à tous les futurs doctorants d'avoir un encadrant de cette envergure ! Ces quelques lignes sont peu de choses par rapport à tout ce qu'il m'a apporté.

Mes vifs remerciements s'adressent au Professeur **A. BOULLI** qui a co-encadré cette thèse dans ses débuts.

J'adresse mes vifs remerciements au professeur **B. MERNARI** Président de l'Université Sultan Moulay Slimane, d'avoir accepté de me faire l'honneur d'évaluer ce travail et présider le jury. Je tiens encore à lui exprimer ma profonde gratitude pour son aide et son soutien de la recherche scientifique à tous les structures de l'USMS.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Monsieur **M. AKSSIRA** Professeur à l'Université Hassan II, Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia, à Monsieur **F. OUZZANI** Professeur à l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences et Techniques Fès et à Madame **M. BAKASSE** Professeur à l'Université Chouaib Doukkali, Faculté des Sciences El Jadida, qui en tant que rapporteurs ont accepté d'évaluer mon travail de thèse et ont consacré un temps précieux à l'étude de ce manuscrit.

Je remercie également les membres du Laboratoire de Chimie Organique et Analytique, la Faculté des Sciences et Techniques Béni-Mellal, plus particulièrement le Professeur **A. ALAOUI Mdaghri** et le Professeur **A. HANNIOUI** pour leurs soutiens,

leurs conseils et leurs aides au cours de ces dernières années et pour l'honneur qu'ils m'ont fait pour examiner ce travail de thèse et de participer au jury.

Mes vifs remerciements vont également au Professeur **Robert W. Owen**, de l'Université de Heidelberg, Allemagne pour l'identification et la caractérisation des composés phénoliques de l'extrait de la poudre de la caroube par les techniques spectroscopiques et chromatographiques et au Professeur **Maurizio Viale**, pour la réalisation des tests d'activité biologique au sein de son laboratoire à l'Institut National de Recherche sur le cancer, Genova, Italie.

Mes remerciements vont également aux Professeurs: Monsieur **M. Khouili**, Monsieur **A. Hafid** et à tous les Professeurs du département de chimie et environnement à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon profond respect.

J'adresse mes remerciements au Professeur **A. ZEGHAL** Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni-Mellal, pour son soutien et son aide à la réalisation de ce travail de thèse.

Mes remerciements sont adressés aux membres du Centre National de la Recherche Scientifique et Technique à Rabat, pour la réalisation des analyses spectroscopiques RMN, RX, IR et Analyse élémentaire.

Mes remerciements vont également au Professeur **L. El Ammari** de la Faculté des Sciences de Rabat, qui m'a permis de confirmer certaines structures par radiocristallographie.

J'exprime également mes remerciements à mes collègues de laboratoire qui participent au bon fonctionnement de notre laboratoire, avec lesquels il est possible d'échanger conseils et informations.

Que tous ceux qui ont aidé de loin ou de près à la réalisation de ce travail, reçoive l'expression de ma sincère reconnaissance.

Abréviations et Symboles

CPG-SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CLHP-SM-IES : Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse en mode Ionisation Electro Spray

g: gramme

CLHP: Chromatographie Liquide à Haute Performance

CL/SM-ESI : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en mode Ionisation Electro Spray

ml: millilitre

Å: Angström

cm: centimètre

L: Litre

µm: micromètre

mm: millimètre

CCM : Chromatographie sur couche mince

UV: Ultraviolet

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

nm: nanomètre

min : minute

µl: microlitre

λ_{\max} : longueur d'onde maximale

mM: millimole

h: heure

BSTFA: *N,O*-bis(triméthylsilyl)trifluoro acétamide

m: mètre

s: seconde

IE : Impact électronique

eV: électron volt

µA: micro ampère

V: Volt

CL-ESI : Chromatographie Liquide en mode Ionisation Electro Spray

D: Dalton

mg: milligramme

µg: microgramme

Rdt: Rendement

MTT: Sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)

CI₅₀ : Concentration inhibitrice

µM: micromole

RMN¹H: Résonance Magnétique Nucléaire du proton

RMN¹³C: Résonance Magnétique Nucléaire du carbon

ORTEP: Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot

In: Indium

TA: Température ambiante

MHz: Mégahertz

δ: Déplacement chimique

ppm: partie par million

TMS: Triméthylsilane

J: Constante de couplage

Hz: Hertz

s: singulet

d: doublet

t: triplet

q: quadruplet

m: massif

dd: doublet de doublet

DRX: Diffractométrie de rayons X

PF : Point de fusion

DMSO-d₆: Diméthylsulfoxyde deutérié

SM: Spectrométrie de Masse

I₂: Diiode

SOMMAIRE

Introduction générale	1
 Chapitre I : Identification Chimique et Evaluation Biologique des Extraits Ethanoliques de la Cosse du Caroubier Marocain	
Introduction.....	5
Partie I : Détermination de la composition phénolique des cosses de caroube spontanée dans différentes régions du Maroc	7
I-1. La composition chimique des cosses du caroubier	7
I-2. Extraction, identification et quantification des composés phénoliques présents dans la pulpe de caroube recueillie de différentes régions marocaines.....	13
I-2-1. Matériels et Méthodes	14
I-2-2. Méthode d'extraction.....	14
I-2-3. Méthodes d'analyse	16
I-2-4. Résultats et discussions	19
I-2-5. Conclusion.....	24
Partie II : Evaluation biologique des extraits phénoliques des cosses de caroube spontanée dans différentes régions du Maroc	37
II-1. Quelques activités biologiques de l'extrait de la gousse du caroubier	37
II-2. Activité antiproliférative des extraits phénoliques de la cosse de la caroube Marocaine.....	38
II-2-1. Evaluation de l'activité antiproliférative des extraits éthanoliques de quatre régions Marocaines.....	39
II-2-2. Evaluation de l'activité antiproliférative des fractions séparées de l'extrait brut du caroubier de la région d'Essaouira.....	41
II-3. Conclusion.....	42
III- Conclusion générale du chapitre I.....	42
 Chapitre II : Synthèse et Evaluation Pharmacologique de Nouveaux Dérivés de N- (5-Indazolyl)-aryl sulfonamide	
I. Etude bibliographique	45
II. Synthèse des N-(1H-indazol-5-yl)-arylsulfonamides	48
II-1. Préparation des dérivés de N-(1H-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzènesulfonamide.....	48
II-2. Préparation des dérivés de N-(1H-indazol-5-yl)-4-méthoxy-benzènesulfonamide.....	54

II-3. Etude de l'effet du catalyseur sur la réaction de réduction.....	59
III. Synthèse des <i>N</i> -(alkyl-indazol-5-yl)-arylsulfonamides	60
III-1.Préparation des dérivés <i>N</i> -alkylés de 5-nitroindazole	60
III-2.Préparation des <i>N</i> -(alkyl-indazol-5-yl)-arylsulfonamides.....	65
IV. Synthèse des <i>N</i> -(3-chloro-1 <i>H</i> -indazol-5-yl)-arylsulfonamides.....	74
V. Synthèse des <i>N</i> -(1-alkyl-3-chloro-1 <i>H</i> -indazol-5-yl)arylsulfonamides.....	77
VI. Evaluation anticancéreuse de nouvelle famille de <i>N</i> -(5-indazolyl)-arylsulfonamide.....	82
VI-1. Evaluation pharmacologique de la première série de <i>N</i> -(5-indazolyl)aryl sulfonamides.....	85
VI-2. Evaluation pharmacologique de la deuxième série de <i>N</i> -(5-indazolyl)aryl sulfonamides....	87
VII. Conclusion	89
Partie expérimentale	92
Chapitre III : Etude de la Réduction du 3-Nitrophthalique Anhydride avec SnCl₂ Dans Différents Alcools: Synthèse de Nouveaux Dérivés de 2,1-Benzisoxazole	
I. Synthèse de nouveaux 2,1-benzisoxazoles via la réduction du 3-nitrophthalique anhydride par SnCl ₂ dans différents alcools.....	133
I-1. Réduction du 3-nitrophthalique anhydride par SnCl ₂ dans différents alcools.....	137
I-2. Synthèse des 1-arylsulfonyl-3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzisoxazoles.....	143
II. Evaluation anticancéreuse de quelques dérivés de la 2,1-benzisoxazole.....	146
III. Conclusion.....	147
Partie expérimentale.....	148
Conclusion générale.....	157
Résumé.....	160

Introduction générale

Les molécules bioactives sont des molécules, chimiquement définies, pouvant être « naturelles » lorsqu'extraites de plantes ou « identiques aux naturelles » lorsqu'on synthétise chimiquement une substance déjà présente dans une source naturelle. Enfin, elles peuvent aussi être « artificielles » lorsqu'on synthétise des molécules qui ne sont pas présentes dans la nature.

L'application des substances naturelles dans le domaine biologique et même pharmacologique est un secteur très prometteur et en plein développement. Cela a conduit à des recherches de plus en plus nombreuses, destinées à diversifier les ressources de ces substances et à améliorer leurs voies de récupération et de purification.

Le fruit du caroubier «*Ceratonia siliqua* L. » est un fruit à des intérêts médicaux multiples. Il est utilisé dans la médecine traditionnelle en raison de ses propriétés antioxydantes [1], anti-carcinogéniques [2], anti-mutagènes [3] et anti-oestrogéniques [4]. Les propriétés de la caroube sont attribuées principalement à la fibre et aux composés phénoliques.

Les polyphénols sont quantitativement les plus importants métabolites secondaires des plantes. Ils possèdent une grande variété de structures allant de composés contenant un simple noyau phénolique (acides phénoliques) à des composés polymériques complexes comme les tanins (obtenus par polymérisation des flavonoïdes). La nature de la fonction chimique de ces composés joue un rôle prépondérant dans l'efficacité de leurs activités biologiques.

Pour cette raison, nous décrivons dans le premier chapitre de notre mémoire une étude détaillée de la composition phénolique de la pulpe de la caroube marocaine et leurs propriétés pharmacologiques.

1. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, P. G. Bolwell, P. M. Bramley, J. B. Pridham,, *Free Radic. Res.*, **1995**, 22, 377–383.

2. H. Mukthar, Z. Y. Wang, S. K. Katiyar, R. Agarwal, *Prev. Med.*, **1992**, 21, 351–360.

3. M. Yamagishi, M. Natsume, A. Nagaki, T. Adachi, N. Osakabe, T. Takizawa, H. Kumon, T. Osawa, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 5074–5078.

4. M. Messina, S. Barnes, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1991**, 83, 541–546.

Le deuxième et le troisième chapitre de notre mémoire seront consacrés à la synthèse et l'évaluation pharmacologique de nouveaux systèmes hétérocycliques.

L'étude des systèmes hétérocycliques a connu un développement considérable, dû à la mise en évidence de leurs activités biologiques. L'indazole et le 2,1-benzoxazole sont parmi une large variété des hétérocycles étudiés pour accéder aux nouvelles molécules actives. A titre d'exemple, dans la figure suivante, nous présentons quelques dérivés de l'indazole préparés par notre équipe de recherche et qui ont montré des activités anticancéreuses très importantes [5-7].

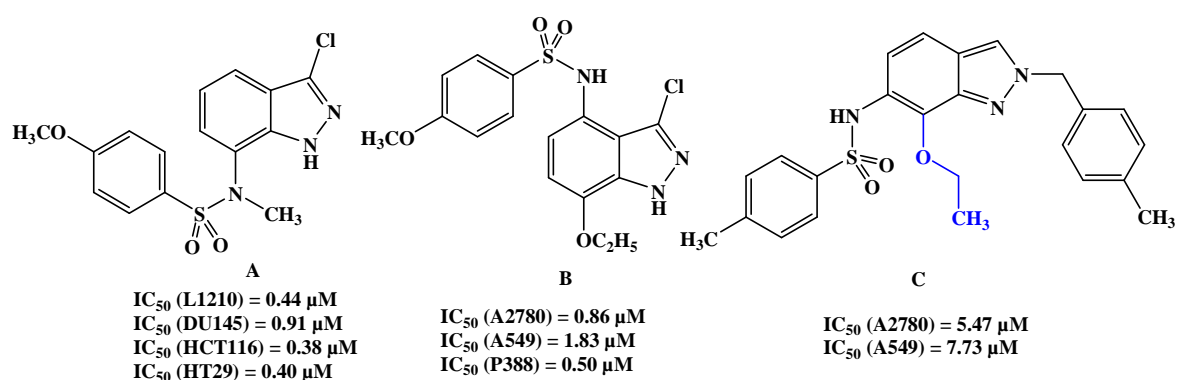


Figure : Activité antiproliférative des dérivés de *N*-(7,4,6-indazolyl)-arylsulfonamide.

Vu les activités pharmacologiques importantes que présentent ces hétérocycles, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux systèmes hétérocycliques polyfonctionnels dérivés de l'indazole et des 2,1-benzisoxazole, en faisant appel aux différentes réactions (Réactions de réduction, d'alkylation, d'halogénéation...). Les composés ainsi synthétisés, seront évalués pour leurs propriétés biologiques.

Le deuxième chapitre traitera la synthèse et l'évaluation pharmacologique des dérivés de *N*-(5-indazolyl)-arylsulfonamide.

Le dernier chapitre sera consacré à la synthèse de nouveaux systèmes hétérocycliques de type 2,1-benzisoxazole à partir de l'étude de la réduction du 3-nitroptalique anhydride par le chlorure stanneux dans différents alcools.

5. L. Bouissane, S. El Kazzouli, S. Léonce, B. Pfeiffer, E. M. Rakib, M. Khouili, G. Guillaumet. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 1078–1088

6. N. Abbassi, H. Chicha, E. M. Rakib, A. Hannioui, M. Alaoui, A. Hajjaji, D. Geffken, C. Aiello, R. Gangemi, C. Rosano, M. Viale. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 57, 240-249.

7. N. Abbassi, E.M. Rakib, H. Chicha, L. Bouissane, A. Hannioui, C. Aiello, R. Gangemi, P. Castagnola, C. Rosano, M. Viale. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*, **2014**, 347, 423-431.

L'ensemble de notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules d'origine naturelle, en particulier les polyphénols de l'extrait éthanolique de la cosse du caroubier, et des molécules hétérocycliques issues de la synthèse chimique afin d'évaluer leurs activités biologiques.

Chapitre I
Identification Chimique et Evaluation
Biologique des Extraits Ethanoliques de la
Cosse du Caroubier Marocain

Introduction

Au Maroc, les plantes médicinales ont toujours été associées à un comportement culturel et aux connaissances traditionnelles. Elles sont fréquemment utilisées pour traiter une grande variété de maladies et symptômes, comme la fièvre, l'inflammation et la douleur [1].

Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) fait partie des espèces anciennes à grand potentiel mais très peu utilisé dans les efforts de reboisement entrepris au Maroc. Il occupe une superficie d'environ 30 000 ha et est localisé dans les montagnes du Rif, du Moyen Atlas, du Haut Atlas et de l'Anti-Atlas, sous des bioclimats de type semi-aride et aride côtier à variantes chaude et tempérée [2]. Il est exploité sous forme spontanée et cultivée pour son fruit, la caroube (gousse). C'est un arbre de la famille des Césalpinales (Superfamille des légumineuses) et se développe largement dans la région méditerranéenne [3, 4] (principalement en Espagne, au Maroc, en Italie et au Portugal). Il est très exploité au Maroc pour l'extraction de la gomme alimentaire et comme fourrage pour le bétail.

La farine ou la poudre de caroube est obtenue en séchant, torréfiant et moulant les gousses (se composent d'une cosse appelée pulpe de caroube enveloppant des graines) après les avoir débarrassées de leurs graines [4]. Elle est utilisée comme un substitut au cacao parce qu'elle ne contient ni caféine, ni théobromine [5], deux alcaloïdes à l'action excitante sur l'organisme. Le contenu de ce fruit en composés polyphénoliques a suscité l'attention considérable en raison de leurs activités biologiques. Pour cela, notre étude est centrée sur les polyphénols abondants dans la pulpe de la caroube marocaine.

-
1. M. R. González-Tejero, M. Casares-Porcel, C. P. Sanchez-Rojas, J. M. Ramiro-Gutierrez, J. Molero-Mesa, A. Pieroni, M. E. Giusti, E. Censorii, C. de Pasquale, A. Della, D. Paraskeva-Hadijchambi, A. Hadjichambis, Z. Houmani, M. El-Demerdash, M. El-Zayat, M. Hmamouchi, S. El Johrig. *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, 116, 341–357
 2. M. M. Sidina, M. El Hansali, N. Wahid, A. Ouatmane, A. Boulli, A. Haddioui. *Sci. Hortic.*, **2009**, 123, 110–116.
 3. I. Batlle, J. Tous. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, **1997**, Rome.
 4. A. K. Yousif, H. M. Alghzawi, *Food Chem.*, **2000**, 69, 283–287.
 5. W. J. Craig, T. T. Nguyen, *J. Food Sci.*, **1984**, 49, 302 - 306.

Dans la première partie de ce chapitre, nous présenterons un rappel bibliographique sur la composition chimique de la gousse du caroubier suivi par une étude détaillée de l'extraction, de la séparation, de l'identification et de la quantification des composés phénoliques présents dans des cosses de la caroube recueillie de différentes régions marocaines. Les composés sont identifiés et quantifiés grâce à un couplage entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse (CPG-SM) et entre la chromatographie liquide à haute performance et la spectrométrie de masse en mode ionisation électro spray (CLHP-SM-IES). Dans la deuxième partie, nous présenterons un aperçu bibliographique sur les activités biologiques de l'extrait de la caroube, et les résultats expérimentaux des tests antiprolifératives réalisés sur les extraits éthanoliques de la caroube spontanée dans différentes régions marocaines.

Partie I : Détermination de la composition phénolique des cosses de caroube recueillies de différentes régions marocaines

I-1. La composition chimique des cosses du caroubier

Nous reprenons, ci-dessous, les principaux travaux relatifs à l'étude de la composition chimique des cosses du caroubier. Selon plusieurs auteurs, la composition chimique de la pulpe de la caroube dépend, en général, de la variété, de l'origine et du temps de récolte des gousses du caroubier [1, 2, 3, 4].

La pulpe est très utilisée comme aliment diététique. Elle est très riche en sucre (48-56%), en particulier, saccharose, glucose, fructose et maltose (Tableau 1), mais pauvre en lipides (0,2-0,6%) [5].

Tableau 1 : Composition moyenne de la pulpe de caroube

Constituants	Taux (%)
Sucres totaux	48-56
Saccharose	32-38
Glucose	5-6
Fructose	5-7
Pinitol	5-7
Tannins	18-20
Polysaccharides non amines	18
Cendres	2-3
Lipides	0,2-0,6

-
1. P. I. Orphanos, J. Papaconstantinou. Cyprus Agricultural Research Institute. Ministry of Agriculture and Natural Resource, **1969**, Nicosia.
 2. Y. Vardar, Ö. Seçurenand, M. Ahmed *Qual. Plant Mater Veg*, **1972**, XXI (4): 318- 327.
 3. F. S. Calixto, J. Cañellas *J. Sci. Food Agric*, **1982**, 33: 1319- 1323.
 4. E. Albanell, G. Caja, J. Plaixats *Options Méditerranéennes*, **1991**, 16, 135- 136.

En plus, la pulpe présente également une teneur très élevée en fibres (27-50%) et une quantité non négligeable en tanins (18-20%) [5,6]. Par ailleurs, l'analyse minéralogique faite, par Puhan et Wielinga [5], sur la pulpe, a révélé une composition (en mg/100g de pulpe) de: K= 1100, Ca= 307, Mg= 42, Na= 13, Cu= 0.23, Fe= 104, Mn= 0,4 et Zn= 0,59.

L'isolement et la quantification individuelle des composés phénoliques présents dans la pulpe de caroube ne sont pas étudiés profondément. Cependant, Avallone et coll. [7], ont déterminé la composition chimique générale des cosses du caroubier.

Une haute teneur en carbohydrates (45%, plus de 30% de saccharose), des quantités appréciables des protéines (3%) et une faible teneur en matière grasse (0,6%) ont été détectées. Les cosses de caroube contiennent aussi une valeur moyenne de 19 mg/g de polyphénols totaux, de 2,75 mg/g de tannins concentrés (pro anthocyanidines) et de 0,95 mg/g de tannins hydrolysables (gallo et éllagitannins).

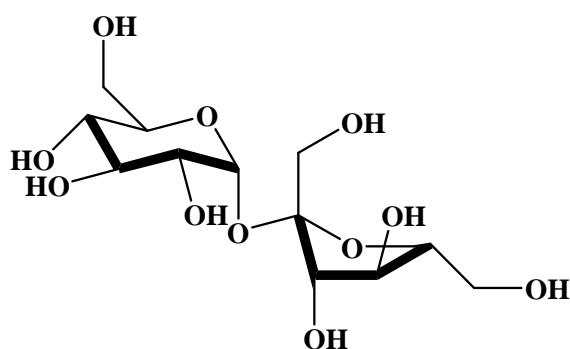


Schéma 1 : Structure chimique du saccharose

Yousif et Alghzawi [8], ont étudié les mêmes paramètres qu'Avalone et coll. Ils ont trouvé presque le même pourcentage des carbohydrates (38,7%) et des tannins (3,75%) et un taux un peu élevé des lipides (2,84%). Ils ont détecté aussi 9% d'humidité, 7,24% des fibres et 5,82% des cendres.

5. Z. Puhan, M. W. Wielinga *Report Technical Committee of INEC*, **1996**.

6. F. J. Saura-Calixto, *Anales de Bromatologia*, **1987**, XXXIX: 81- 93.

7. R. Avallone, M. Plessi, M. Baraldi, A. Monzani. *J. Food Compos. Anal.*, **1997**, 10, 166-172.

8. A. K. Yousif, H. M. Alghzawi, *Food Chem.*, **2000**, 69, 283–287.

Les études précédentes ce sont concentrées sur la détermination du taux de polyphénols avec peu de structures élucidées.

Corsi et coll [9], ont étudié la fraction phénolique de la poudre de caroube, par la perfusion dans l'eau bouillante pendant 2 à 15 min. Une concentration de 1,36 mg/g de polyphénols a été détectée. La composition phénolique est dominée par l'acide gallique (88%) avec des traces des catéchines, épigallocatechine et gallate d'épicatéchine.

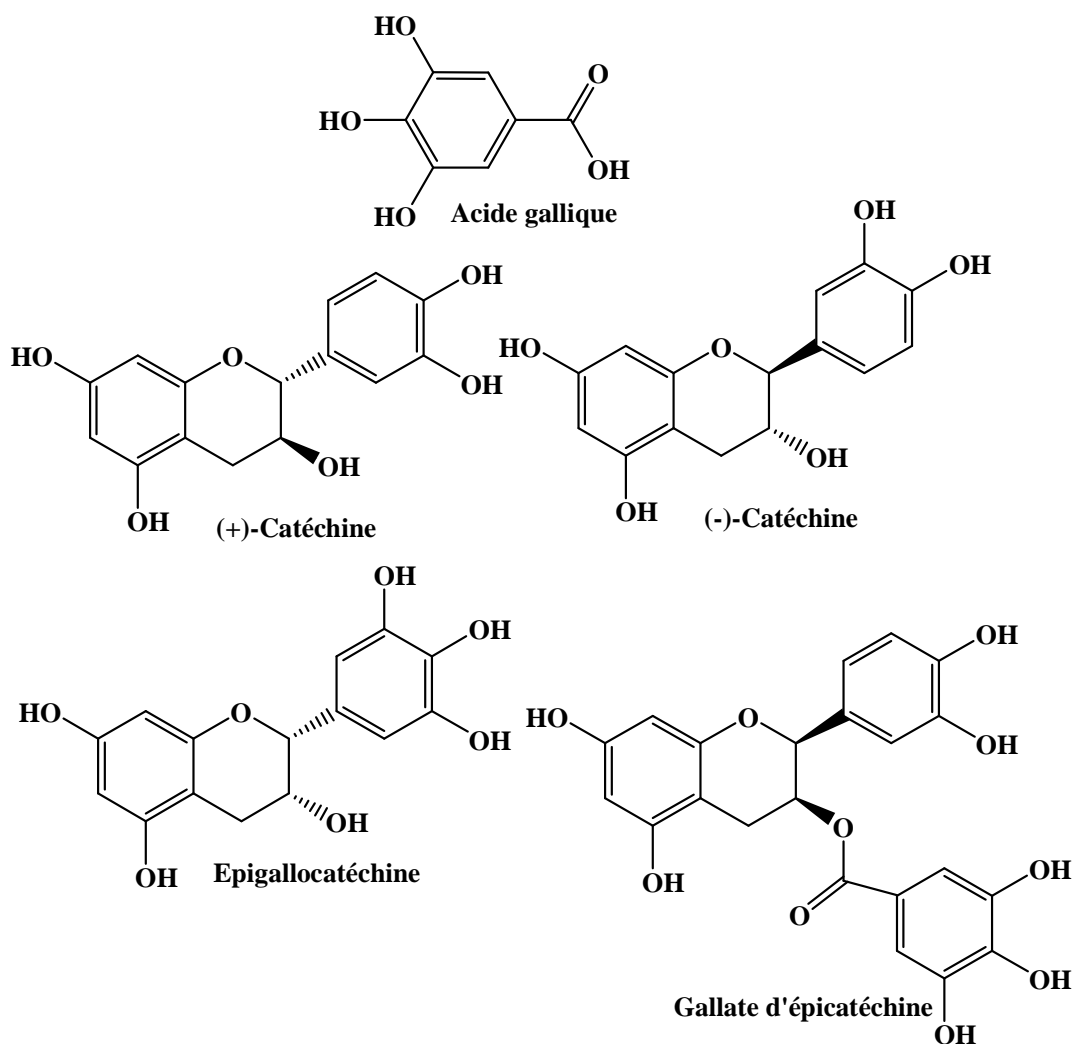


Schéma 2 : Structure chimique d'acide gallique, des catéchines, d'épigallocatechine et de gallate d'épicatéchine

Sakakibara et coll. [10], ont utilisé le méthanol comme solvant d'extraction. Ils ont fait plusieurs extractions durant une très courte période (1 à 3 min). Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par Corsi et Coll., mais avec une concentration faible des composés phénoliques totaux (0,23 mg/g). La composition phénolique est dominée de nouveau par l'acide gallique (91%) avec présence des traces de la quercétine glucoside, les catéchines et l'acide éllagique. Les deux nouveaux composés sont :

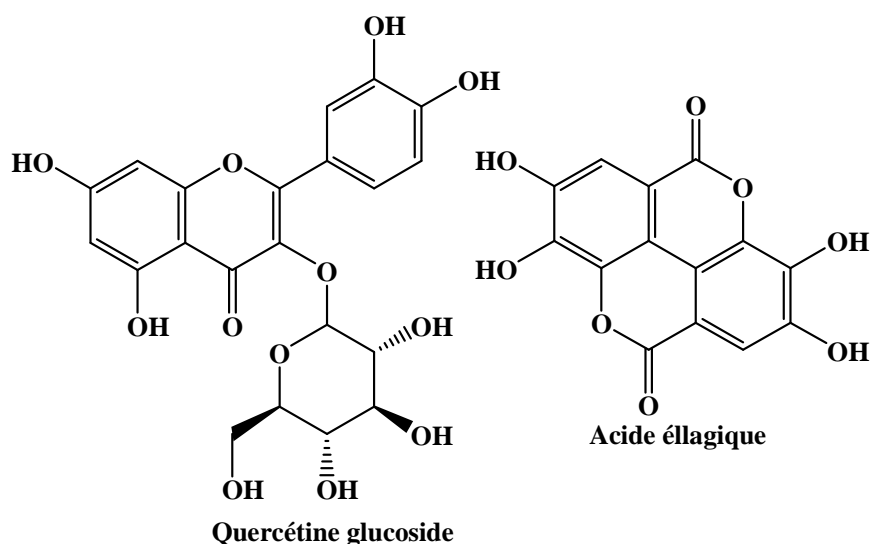


Schéma 3 : Structure chimique d'acide éllagique et de quercétine glucoside

Owen et Coll. [11] ont décrit l'identification des composés phénoliques à partir de l'extraction avec le méthanol de la poudre de caroube en utilisant l'appareil de Soxhlet comme technique d'extraction. Vingt quatre composés phénoliques ont été identifiés avec une concentration totale de 3,94 mg/g du poids sec. La composition phénolique est dominée aussi par l'acide gallique sous diverses formes: l'acide gallique libre représente 42% des polyphénols en poids, les gallos tannins 29%, et le gallate méthylique 1%. L'acide cinnamique en tant que phénol simple représente environ 2% du poids total. Les flavonoïdes représentent 26% des polyphénols, les autres polyphénols tels que le myricétine glycoside et le quercétine-3-O- α -L-rhamnoside représentent respectivement 9% et 10%.

10. H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, K. Kanazawa. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 571–581.

11. R. W. Owen, R. Haubner, W. E. Hull, G. Erben, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, B. Haber. *Food chem. toxicol.*, **2003**, 41, 1727-1738.

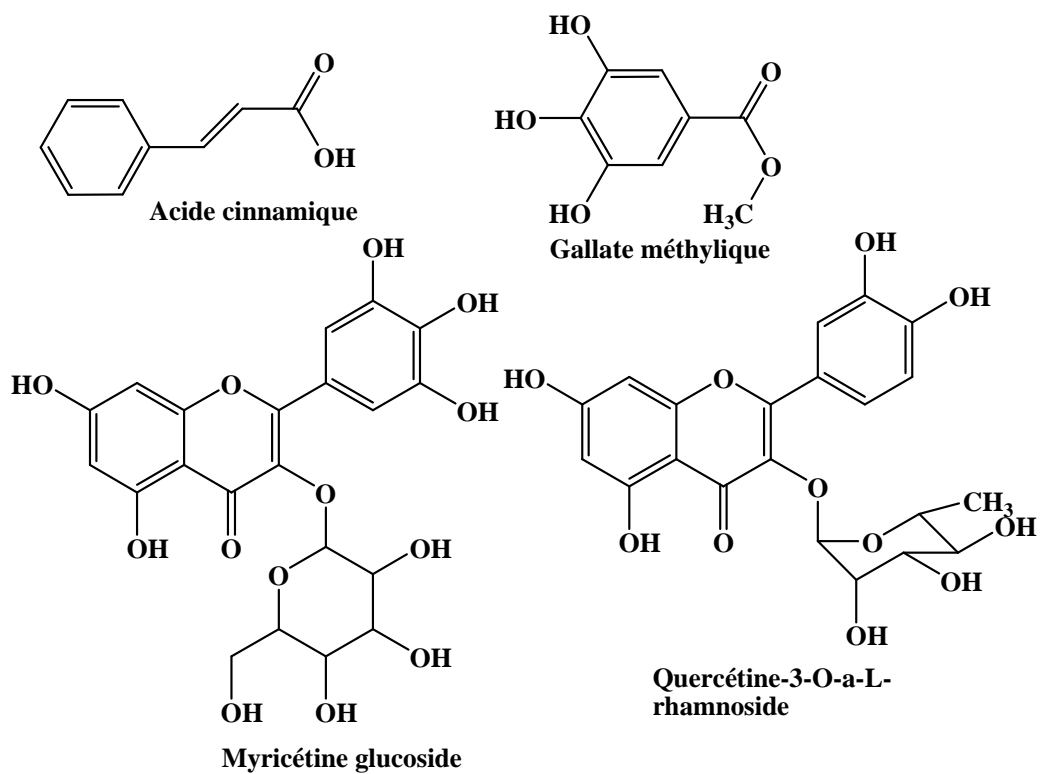


Schéma 4 : Structure chimique d'acide cinnamique, de gallate méthylique, de myricétine glucoside et de quercétine-3-O- α -L-rhamnoside

Le rendement et la concentration de chaque composé phénolique de la fibre de caroube de cette étude sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2: Contenu en composés phénoliques dans la fibre de caroube

Antioxydant phénolique		Rendement (mg/Kg)	% Total phénolique
I	Acide cinnamique	49.3	1.25
II	Acide p-coumarique	11.3	0.29
III	Acide férulique	16.3	0.41
IV	Acide syringique	2.4	0.06
V	Acide gallique	1647.5	41.76
VI	Méthyle Gallate	40.6	1.03
VII	Apigénine	12.8	0.32
VIII	Chrysoeriol	29.9	0.76
IX	Tricétine-3,5-méthyle éther	3.1	0.08
X	Lutéoline	37.8	0.96
XI	Quercétine	12.1	0.31
XII	Isorhamnetin	20.1	0.51
XIII	Myricétine	14.4	0.37
XIV	Kaempferol	1.4	0.04
XV	Kaempferol rhamnoside	19.1	0.048
XVI	Quercétine rhamnoside	403.4	10.23
XVII	Quercétine arabinoside	27.8	0.7
XVIII	Myricétine rhamnoside	366.1	9.28
XIX	Myricétine glucoside	62.2	1.58
XX	Naringénine	18.9	0.48
XXI	Génistéine	0.5	0.01
XXII	1,6-di-O-galloyl- β -D-glucose	157.4	3.99
XXIII	1,2,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose	418.9	10.62
XXIV	1,2,3,6-tétra-O-galloyl- β -D-glucose	571.4	14.49

Cette étude a montré que la poudre de caroube est riche en substances phénoliques anti-oxydantes. Par conséquent, son inclusion dans l'alimentation journalière, peut jouer un rôle important dans la prévention et la réduction de certaines maladies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires...

Récemment, Faik et Coll. [12] ont étudié l'identification et la quantification des composés phénoliques présents dans le fruit du caroubier de la Turquie. Cette étude a révélé la présence d'une concentration élevée des composés phénoliques 17,49 mg/g du poids sec par rapport à celle obtenue par Owen et ses collaborateurs. L'acide gallique (3,27 mg/g du poids sec) est l'acide phénolique le plus abondant. Il est présent dans les trois fractions phénoliques isolées de la poudre de la caroube de la Turquie.

Les résultats de la littérature montrent une différence importante au niveau de la variation de la concentration des composés phénoliques de la poudre de caroube. Cette variation diffère selon l'origine géographique et l'espèce de la caroube, le climat et les conditions de l'extraction (la température, la méthode et le temps d'extraction et la nature du solvant utilisé).

Actuellement, aucune étude de l'identification de la composition phénolique de la pulpe de la caroube marocaine n'est rapportée. Dans le but d'identifier cette composition phénolique, nous nous sommes intéressés à l'extraction, l'isolement, l'identification et la quantification des composés phénoliques présents dans la poudre de la pulpe de la caroube recueillie de différentes régions marocaines.

I-2. Extraction, identification et quantification des composés phénoliques présents dans la pulpe de caroube recueillie de différentes régions marocaines

L'analyse des composés phénoliques est d'autant plus complexe que le nombre de molécules est important. L'analyse qualitative et quantitative nécessite un appareillage sophistiqué mettant en œuvre différents couplages tel le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse ou le couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse.

Nous décrivons tout d'abord l'origine et la méthode de préparation des échantillons ainsi que la méthode d'extraction de la poudre de la pulpe de la caroube. Ensuite, nous explicitons les méthodes utilisées pour l'isolement, l'identification et la quantification des composés phénoliques contenus dans ce fruit, puis nous discuterons les résultats obtenus et nous terminerons par une conclusion.

12. A. A. Faik, T. Hülya, A. Sema, J. C. Pedro, A. Manuel, S. Carlos, G. Jiri, S. Miroslav *J. Food Qual.*, **2007**, 30, 1040-1055.

I-2-1. Matériels et Méthodes

Le matériel végétal (gousses du caroubier) a été récolté au cours de l'été 2002. Dans chacune des régions marocaines où pousse le caroubier de façon spontanée, une trentaine d'arbres a été échantillonné à raison de 2 à 5 kilogramme de gousses par arbre.

I-2-2. Méthode d'extraction

Dans le présent travail, six régions ont été étudiées (Figure 1 ci-dessous). Un mélange de gousses représentant chaque région a été prélevé, séché et broyé dans un moulin après avoir débarrasser les gousses de leurs graines.

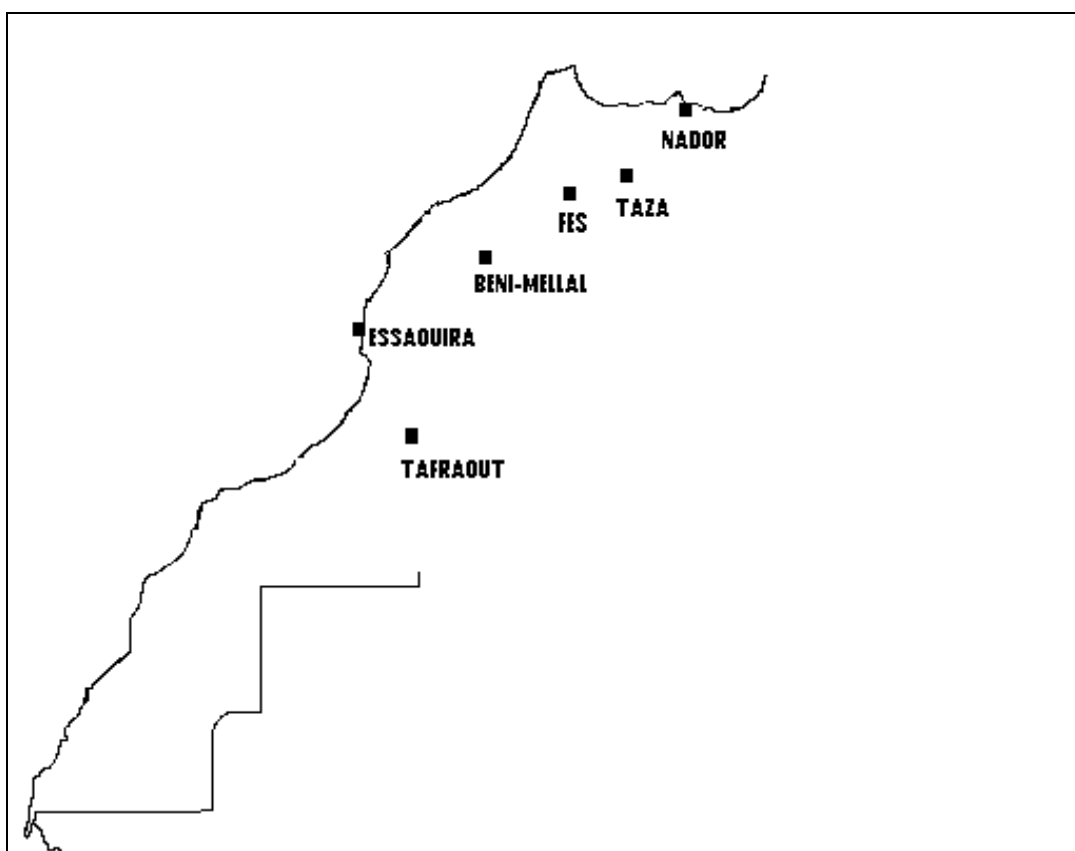


Figure 1 : Carte géographique des différentes régions étudiées.

L'extraction des principes actifs à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leur pouvoir antioxydant, est une étape très importante dans l'isolement aussi bien dans l'identification des composés phénoliques. A travers notre étude bibliographique, nous avons choisi la méthode d'extraction utilisée par Owen et coll. [11] car elle donne l'accès à un nombre important de composés phénoliques avec des rendements meilleurs.

L'extraction par appareil Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. Dans cette étude, l'extraction au Soxhlet a été utilisée pour extraire les composés phénoliques présents dans la pulpe de la caroube marocaine.

L'appareil Soxhlet représenté sur la figure 2 est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant.

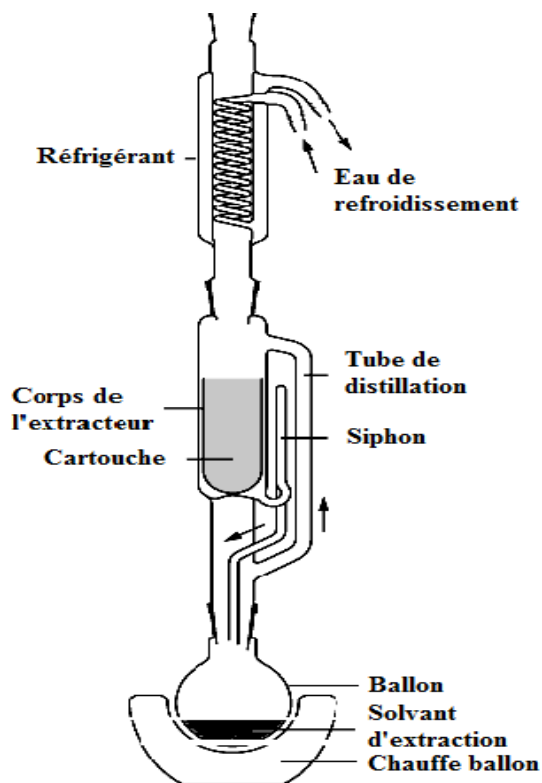


Figure 2 : Schéma de l'extracteur Soxhlet

Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à l'ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant pour être liquéfiées. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur

jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné des substances extraites. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en composants solubles. L'extraction continue jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche.

La poudre issue de pulpe après broyage (70 g) est extraite deux fois dans cet appareil, la première fois avec l'hexane pendant 4 heures, comme une étape de prétraitement pour l'élimination des lipides et la deuxième fois avec l'éthanol pendant 5 heures pour extraire les composés phénoliques. La séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C sous une pression réduite.

Après l'extraction à l'éthanol, l'extrait passe dans une colonne chromatographique ouverte pour l'isolement des molécules. Les fractions ainsi récoltées sont soumises à des analyses chromatographiques et spectroscopiques.

I-2-3. Méthodes d'analyse

L'identification et la quantification des constituants est une opération délicate nécessitant l'utilisation, l'adaptation et le perfectionnement constant des techniques d'analyse, ainsi que la mise en œuvre d'une méthodologie rigoureuse.

L'analyse des composés phénoliques des extraits éthanoliques obtenus est faite par la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode ionisation électrospray (CL/SM-ESI), au sein du département de spectroscopie, Association Helmholtz, Heidelberg, en Allemagne sous la direction du professeur Robert W. Owen.

- **Chromatographie sur colonne d'acide silicique**

L'extrait brut est suspendu dans le méthanol (50 ml), ensuite immobilisé sur l'acide silicique par lyophilisation avant d'être soumis à la séparation par la chromatographie sur colonne, en utilisant une colonne de verre (38 x 4.5 cm) remplie par le gel de silice 60 Å (Maille : 70-230) dans le dichlorométhane (DCM). L'extrait immobilisé a été ajouté au volume libre en tête de la colonne. Le fractionnement a été réalisé par des applications successives du méthanol (1, 2, 5, 10, 20 et 30%) dans du dichlorométhane DCM (1 L).

Des fractions de 200 ml ont été collectées et le solvant a été éliminé par l'évaporation sous vide à une température de 35°C. Les fractions sèches ont été suspendues dans le méthanol (5 ml) et diluées -si nécessaire- avant l'analyse par CLHP. Les composés

phénoliques des fractions concernées ont été purifiés par la CLHP semi préparative avant l'analyse spectroscopique

- **Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) analytique**

L'analyse a été effectuée sur un appareil Hewlett-Packard (HP) 1090, équipé d'une colonne C-18 en phase inverse (5 μm) (Latex, Eppenheim, Allemagne, 25 cm \times 4 mm de diamètre) et couplé à un détecteur UV à barrettes de diodes (HP 1040 M) fixé à 250, 278 et 340 nm. La phase mobile est constituée d'acide acétique (2% dans l'eau bidistillée) et de méthanol. Son débit était de 1 ml/min. Les fractions obtenues par chromatographie sur colonne ont été diluées dans le méthanol (5 ml) et injectées (20 μl) dans la CLHP.

Les quantités de composés phénoliques dans les fractions injectées sont déterminées en utilisant des courbes d'étalonnage générées avec des normes authentiques, en mesurant l'absorption UV à λ_{max} en fonction de la concentration, la gamme varie de 0,025 à 4,0 mM.

- **CLHP semi-préparative**

CLHP semi-préparative a été réalisée sur un chromatographe (Agilent liquide 1100) équipé d'une colonne en phase inverse C18 (10 mm de diamètre, Latek, Eppenheim, Allemagne), similaire à celle utilisée pour l'analyse CLHP. L'acétonitrile est utilisé à la place du méthanol dans la composition de la phase mobile (le débit est égale à 3 ml/min). Les pics d'éluion ont été recueillis sur un échantillonneur de microplaques (Agilent HP 220). Les échantillons ont été mis en commun et le solvant a été éliminé par lyophilisation.

- **L'hydrolyse alcaline**

50 μl de la suspension méthanolique de chaque fraction collectée par chromatographie sur colonne ont été séchés sous un flux d'azote et un volume de KOH (10% dans le méthanol) a été ajouté à chaque fraction. Les solutions ont été incubées à 100°C pendant 1 h. 1 ml de l'eau bidistillée a été ajouté et les solutions ont été acidifiées par addition de 20 μl d'acide chlorhydrique concentré HCl et extraites deux fois avec de l'éther diéthylique (2 ml). Les échantillons ont été séchés sur sulfate de sodium anhydre et l'éther diéthylique a été éliminé sous un courant d'azote. Le résidu est encore dissous dans 500 μl du méthanol. 100 μl de ces solutions a de nouveau été séché sous un courant d'azote, le BSTFA a été ajouté et les solutions préparées (100 μl) ont été incubées à 37 °C pendant 30 min. Les dérivés formés des éthers de triméthylsilyle vont être analysés par CPG-SM.

- **L'hydrolyse acide**

Cette manipulation est similaire à celle décrite pour l'hydrolyse alcaline, sauf que la solution de KOH (10% dans le méthanol) est remplacée par H₂SO₄ (0,5 M) dans de l'eau bidistillée et l'incubation a été faite à 37 °C pendant 1 h. L'eau bidistillée (1 ml) a été ajoutée et les échantillons ont été extraits deux fois avec l'éther diéthylique (2 ml). Le reste de la manipulation est identique à celui décrit ci-dessus.

- **Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)**

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre de masse HP 5973 couplé à un chromatographe en phase gazeuse HP 6890.

1 µl des dérivés des éthers de triméthylsilyle obtenus par l'hydrolyse alcaline et acide a été injecté dans le chromatographe en phase gazeuse. La séparation des analytes a été réalisée en utilisant une colonne capillaire HP 5MS (30 m×0,25 mm de diamètre, épaisseur de film 0,25 µm). L'hélium est utilisé comme gaz porteur avec une vitesse linéaire de 0,9 ml/s. Le programme de température du four était : température initiale 100 °C, 100-270 °C à 4 °C /min et 270 °C pendant 20 min. La température de l'injecteur est de 250 °C, la température de la ligne de transfert a eu lieu à 280 °C. Les paramètres du spectromètre de masse en mode IE étaient: température de la source d'ions: 230 °C, énergie des électrons: 70 eV, courant de filament 34,6 µA, tension de multiplicateur d'électrons: 1200 V.

- **Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode Ionisation Electro Spray (CL/SM-ESI)**

CL-ESI a été menée sur un Agilent 1100 CLHP couplée à une CL/MSD Agilent (HP 1101). La séparation chromatographique des échantillons a été effectuée à l'aide d'une colonne C-18, en phase inverse (5µm) (250 cm×4 mm de diamètre, Latex, Eppelheim, Allemagne) en utilisant la même phase mobile et le même gradient que l'analyse CLHP mais avec un débit de 0,5 ml/min. Les analyses ont été effectuées dans le mode ions négatifs dans les conditions suivantes: débit de gaz de séchage (azote) = 10 L/min, pression nébuliseur = 30 psi (2.07 bars), température de séchage de gaz = 350 °C; tension capillaire = 2500 V; tension de fragmentation = 100 V; gamme de masse maximale = 50-3000 D.

I-2-4. Résultats et discussions

Les résultats des extraits analysés de la poudre de caroube de six régions marocaines (Essaouira, Béni-Mellal, Tafraout, Nador, Fès et Taza) sont regroupés dans les tableaux (3 à 8).

L'analyse de l'extrait de la poudre de caroube de la région d'Essaouira montre la présence de 41 composés phénoliques (Tableau 3) identifiés avec une concentration égale à 32,81 mg/g d'extrait. La teneur en composés phénoliques est assez élevée par rapport aux données de la littérature. Les résultats de l'analyse des composés phénoliques de l'extrait de la poudre de la caroube de la région d'Essaouira révèlent des teneurs élevées en acide gallique (27,03%) et gallate glucoside (22,02%). Les teneurs des dérivés de gallate sont plus variables, le tétra gallate (11,59%), le tri gallate (7,52%) et le digallate (7,11%).

Tableau 3 : Les composés phénoliques identifiés dans la région d'Essaouira.

Essaouira		
Composés	µg/g d'extrait	%
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque	30.3	0.09
Apigénine	3.7	0.01
Acide benzoïque	203.2	0.62
Chrysoeriol	36.5	0.11
Acide cinnamique	6.9	0.02
cis-p- acide coumarique	16.4	0.05
Di gallate	2334.7	7.11
Dihydroxyflavone	5.8	0.02
Diméthoxy-p-hydroxy-benzaldéhyde	2.1	0.01
Eriodictyol glucoside	424.8	1.29
Eriodicyiol	2.2	0.01
Ethyle gallate	215.6	0.66
Acide férulique	5.2	0.02
Gallate glucoside	7227.9	22.02
Acide gallique	8869.4	27.03
Acide gallique glucoside	132.3	0.40
Génistéine	16.5	0.05
Génistéine glucoside	106.7	0.32
Génistéine -4,7-diméthyle éther	15.9	0.05
Isorhamnétine	237.1	0.72
Liquiritigénine	10.4	0.03
Méthoxy Genkwanine	145.1	0.44
Méthoxy-p-hydroxy benzaldéhyde	24.7	0.07
Myricétine glucoside	1411.2	4.30
Myricétine rhamnoside	1451.2	4.42
Naringénine	34.1	0.10
Naringénine glucoside	240.0	0.73
p- acide coumarique	60.7	0.18
Acide p-hydroxybenzoïque	2.0	0.01
p-hydroxy-benzaldéhyde	33.1	0.10
Quercétine	31.2	0.09

Quercétine arabinoside	162.0	0.49
Quercétine glucoside	578.7	1.76
Quercétine rhamnoside	2314.8	7.05
Acide syringique	1.3	0.01
Taxifoline	38.3	0.12
Tétra gallate	3803.1	11.59
Tricétine-3',5'-diméthyle éther	83.3	0.25
Tri gallate	2466.7	7.52
Trihydroxy trimethoxy flavone	23.8	0.07
Acide vanilique	7.0	0.02
Total	32816.3	100

La poudre de caroube de la région de Béni-Mellal contient 32 composés phénoliques (Tableau 4) identifiés avec une concentration totale égale à 47,73 mg/g d'extrait. Les principaux composés sont: le gallate glucoside (36,70%), l'acide gallique (17,96%), le tétra gallate (20,30%), le tri gallate (9,11%) et le digallate (6,52%). Nous avons remarqué une amélioration du rendement de tétra gallate dans cette région par rapport à la région d'Essaouira.

Tableau 4 : Les composés phénoliques identifiés dans la région de Béni-Mellal.

Béni-Mellal		
Composés	µg/g d'extrait	%
3, 4,7-Trihydroxyflavone	11.6	0.02
Apigénine	7.4	0.02
Acide benzoïque	154.3	0.32
Acide cinnamique	38.1	0.08
Di gallate	3114.3	6.52
Dihydroxy flavone	18.3	0.04
Acide éllagique	331.8	0.70
Eriodictyol	9.4	0.02
Ethyle gallate	173.4	0.36
Acide férulique	20.0	0.04
Gallate glucoside	17517.4	36.70
Acide gallique	8573.6	17.96
Génistéine diméthyle éther	6.6	0.01
Génistéine glucoside	53.3	0.11
Isorhamnétine	200.6	0.42
Méthoxy Genkwanine	97.2	0.20
Méthoxy-p-hydroxy-benzaldéhyde	9.6	0.02
Méthyle gallate	40.4	0.08
Myricétine glucoside	644.5	1.35
Myricétine rhamnoside	1160.4	2.43
Naringénine	10.5	0.02
Naringénine glucoside	58.6	0.12
p- acide coumarique	30.5	0.06
Acide p-hydroxybenzoïque	18.6	0.04
p-hydroxy-benzaldéhyde	8.5	0.02
Quercétine rhamnoside	1254.8	2.63

Acide syringique	6.1	0.01
Taxifoline	23.6	0.05
Tétra gallate	9689.9	20.30
Tricétine	81.3	0.17
Tri gallate	4348.0	9.11
Acide vanilique	15.8	0.03
Total	47728.2	100

Dans la région de Tafraout, 18 composés phénoliques (Tableau 5) sont détectés dans l'extrait de la poudre de caroube de cette région avec une concentration égale à 16,52 mg/g d'extrait.

La teneur de l'acide gallique glucoside représente presque la moitié par rapport au nombre total des composés phénoliques identifiés avec un rendement égale à 57,03%. L'acide gallique représente seulement 18,87% de polyphénols.

Le nombre des composés phénoliques est faible par rapport aux autres régions. Les conditions climatiques jouent un rôle important à ce niveau.

Tableau 5 : Les composés phénoliques identifiés dans la région de Tafraout.

Tafraout		
Composés	µg/g d'extrait	%
p-hydroxy-benzaldéhyde	5.5	0.03
Méthoxy-p-hydroxy-benzaldéhyde	2.7	0.02
Naringénine	5.1	0.03
Tricétine	16.3	0.10
Apigénine	4.7	0.03
Acide gallique	3118.1	18.87
Ethyle gallate	15.5	0.09
p-acide coumarique	11.3	0.07
Isorhamnétine	35.2	0.21
Quercétine rhamnoside	714.0	4.32
Myricétine glucoside	369.5	2.24
Myricétine rhamnoside	568.7	3.44
Quercétine glucoside	123.7	0.75
Acide gallique glucoside	9424.8	57.03
Di gallate	908.8	5.50
Tri gallate	693.8	4.20
Tétra gallate	470.6	2.85
Acide éllagique	36.6	0.22
Total	16524.9	100

La poudre de caroube de la région de Nador contient 28 composés phénoliques (Tableau 6) avec une concentration égale à 9,14 mg/g d'extrait. On note, en plus de l'acide gallique et de l'acide gallique glucoside qui apparaissent à des proportions respectives de 32,92% et 23,07%, l'apparition des dérivés de flavonols glucosides avec des proportions

notables. Le quercétine rhamnoside représente 9,08% et le myricétine rhamnoside représente 7,79%.

Tableau 6 : Les composés phénoliques identifiés dans la région de Nador.

Nador		
Composés	µg/g d'extrait	%
7,4'-dihydroxyflavone	15.2	0.17
Acide benzoïque	168.9	1.85
Acide cinnamique	68.5	0.75
Digallate	361.5	3.95
Acide éllagique	14.4	0.16
Eriodyctiol	15.7	0.17
Eriodyctiol glucoside	13.8	0.15
Ethyle gallate	17.7	0.19
Acide férulique	27.9	0.30
Acide gallique	3011.5	32.92
Acide gallique glucoside	2109.9	23.07
Génistéine	5.1	0.05
Génistéine glucoside	38.7	0.42
Méthoxy Genkwanine	73.3	0.80
Méthoxy benzaldéhyde	4.7	0.05
Myricétine glucoside	276.9	3.03
Myricétine rhamnoside	712.2	7.79
Naringénine	18.9	0.21
p-acide coumarique	29.7	0.32
Acide p-hydroxybenzoïque	5.7	0.06
p-hydroxy-benzaldéhyde	6.9	0.07
Quercétine	9.8	0.11
Quercétine glucoside	115.5	1.26
Quercétine rhamnoside	830.6	9.08
Tétra gallate	487.5	5.33
Tri cétine	174.4	1.91
Tri gallate	516.6	5.65
Acide vanillique	15.4	0.17
Total	9146.9	100

L'extrait de la poudre de caroube de Fès contient 20 composés phénoliques (Tableau 7) avec une concentration égale à 18,75 mg/g d'extrait. L'acide gallique glucoside est le composé le plus abondant avec un pourcentage égal à 43,89%, alors que l'acide gallique représente 20,48%. Le digallate et le tétra gallate représentent respectivement 10,94% et 7,12% dans cette composition phénolique.

Tableau 7 : Les composés phénoliques identifiés dans la région de Fès.

Fès		
Composés	µg/g d'extrait	%
7, 4'-Dihydroxy flavone	18.7	0.10
Apigénine	8.7	0.05
Acide benzoïque	90.5	0.48
Acide cinnamique	44.3	0.24
Di gallate	2052.1	10.94
Acide éllagique	26.9	0.14
Eriodictyol glucoside	40.5	0.22
Ethyle gallate	198.0	1.06
Acide gallique	3840.4	20.48
Acide gallique glucoside	8232.2	43.89
Génistéine glucoside	105.1	0.56
Isorhamnétine	289.9	1.55
Myricétine rhamnoside	546.9	2.92
Naringénine glucoside	43.9	0.23
p-acide coumarique	11.6	0.06
Quercétine glucoside	118.6	0.63
Quercétine rhamnoside	634.5	3.38
Tétra gallate	1335.8	7.12
Tricétine-3',5'-diméthyle éther	79.2	0.42
Tri gallate	1037.1	5.53
Total	18755.0	100

La poudre de caroube de la région de Taza contient 39 composés phénoliques (Tableau 8) identifiés avec une proportion élevée des composés phénoliques égale à 55.73 mg/g d'extrait.

Les composés principaux identifiés dans cette région sont: l'acide gallique glucoside (29,84%) et l'acide gallique (18,72%). Les dérivés de gallate: tétra gallate, tri gallate et digallate représentent respectivement 17,90%, 10,20% et 8,57% dans ce contenu phénolique.

Tableau 8 : Les composés phénoliques identifiés dans la région de Taza.

Taza		
Composés	µg/g d'extrait	%
3, 4,7-Trihydroxy flavone	22.6	0.04
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque	25.2	0.04
Acide benzoïque	73.3	0.13
Chrysoeriol	21.3	0.04
Acide Cinnamique	111.0	0.20
Di gallate	4774.4	8.57
Diméthoxy benzaldéhyde	8.4	0.02
Acide éllagique	205.8	0.37
Eriodyctiol glucoside	259.6	0.47
Ethyle gallate	210.2	0.38
Acide férulique	38.9	0.07

Acide gallique	10434.0	18.72
Acide gallique diglucoside	928.3	1.66
Acide gallique glucoside	16629.2	29.84
Génistéine	4.5	0.01
Génistéine glucoside	114.9	0.21
Isorhamnétine	224.2	0.40
Kaempferol rhamnoside	82.8	0.15
Méthoxy Genkwanine	57.5	0.10
Méthoxy Genkwanine glucoside	59.1	0.11
Méthoxy-p-hydroxy-benzaldéhyde	23.2	0.04
Méthyle gallate	25.7	0.05
Myricétine glucoside	1082.2	1.94
Myricétine rhamnoside	1672.6	3.00
Naringénine	14.0	0.03
Naringénine glucoside	146.6	0.26
p- acide coumarique	31.2	0.06
Acide p-hydroxybenzoïque	22.2	0.04
p-hydroxy-benzaldéhyde	6.1	0.01
Quercétine	50.2	0.09
Quercétine arabinoside	138.6	0.25
Quercétine glucoside	462.9	0.83
Quercétine rhamnoside	1950.5	3.50
Acide syringique	15.0	0.03
Taxifoline	39.4	0.07
Tétra gallate	9975.0	17.90
Tricétine	82.8	0.15
Trigallate	5683.8	10.20
Acide vanillique	28.8	0.05
Total	55735.8	100

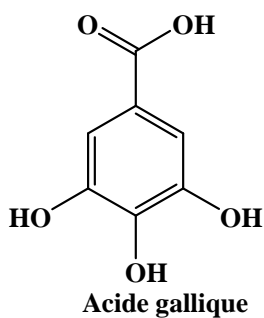
I-2-5. Conclusion

Cinquante-deux composés phénoliques d'extrait de poudre de caroube ont été identifiés dans six régions différentes au Maroc.

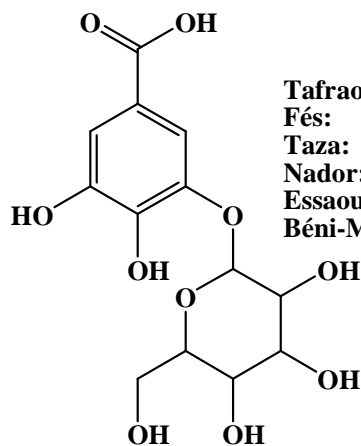
Les proportions totales des composés phénoliques identifiés dans chaque région sont : Essaouira (32,81 mg/g d'extrait), Béni-Mellal (47,73 mg/g d'extrait), Tafraout (16,52 mg/g d'extrait), Nador (9,14 mg/g d'extrait), Fès (18,75 mg/g d'extrait) et Taza (55,73 mg/g d'extrait).

Taza, Béni-Mellal et Essaouira présentent une proportion élevée en composés phénoliques identifiés par rapport aux autres régions.

Nous avons observé une différence quantitative dans la composition phénolique de la poudre de caroube entre les échantillons analysés. L'acide gallique, le gallate glucoside et l'acide gallique glucoside constituent les principaux composés dans la composition phénolique.



	<u>Rdt %</u>
Nador:	32,92%
Essaouira:	27,03%
Fés:	20,48%
Tafraout:	18,87%
Taza:	18,72%
Béni-Mellal:	17,96%

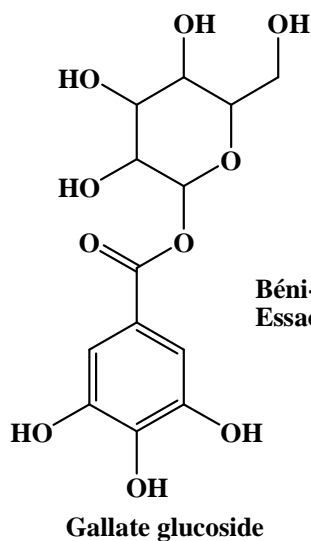


	<u>Rdt %</u>
Tafraout:	57,03%
Fés:	43,89%
Taza:	29,84%
Nador:	23,07%
Essaouira:	0,40%
Béni-Mellal:	0,00%

Acide gallique glucoside

Schéma 5 : Les rendements de l'acide gallique et de l'acide gallique glucoside dans les extraits analysés de six régions marocaines

Le gallate glucoside est détecté seulement dans deux régions: Béni-Mellal et Essaouira. Il est présent en concentration élevée (17.5 mg/g d'extrait) à Béni-Mellal.



	<u>Rdt %</u>
Béni-Mellal:	36,70%
Essaouira:	22,02%

Schéma 6 : rendement du gallate glucoside détecté dans deux régions: Béni-Mellal et Essaouira

Les dérivés de gallate, à savoir le digallate, trigallate et tétragallate ont été détectés dans la région de Taza en fortes concentrations (4,8 mg/g d'extrait), (5,7 mg/g d'extrait) et (9,9 mg/g d'extrait) respectivement.

Les résultats de cette étude montrent que la pulpe de caroube marocaine contient une variété riche de composés phénoliques, la majorité sont des acides phénoliques et des flavonoïdes (tableau 9).

Tableau 9 : Le nombre et le rendement total des classes et sous classes des polyphénols isolés des extraits analysés.

Composés	Essaouira	Béni-Mellal	Tafraout	Nador	Fès	Taza
	Rdt mg/g d'extrait					
Phénoliques 21	55.1% 18.08mg/g	55.6% 26.57mg/g	31.8% 5.26mg/g	51.8% 4.56mg/g	46.1% 8.54mg/g	56.8% 31.61mg/g
Flavones 08	0.88% 0.29mg/g	0.41% 0.2mg/g	0.13% 0.02mg/g	2.88% 0.26mg/g	0.57% 0.11mg/g	0.33% 0.19mg/g
Flavonols 03	0.83% 0.27mg/g	0.46% 0.22mg/g	0.21% 0.04mg/g	0.11% 0.01mg/g	1.55% 0.29mg/g	0.49% 0.27mg/g
Flavonol glycosides 06	18.02% 5.92mg/g	6.41% 3.06mg/g	10.75% 1.77mg/g	21.16% 1.93mg/g	6.93% 1.30mg/g	9.63% 5.45mg/g
Isoflavones 03	0.10% 0.03mg/g	0.01% 0.01mg/g	--	0.05% 0.01mg/g	--	0.01% 0.01mg/g
Isoflavone glucoside 01	0.32% 0.11mg/g	0.11% 0.05mg/g	--	0.42% 0.04mg/g	0.56% 0.10mg/g	0.21% 0.11mg/g
Flavanones 03	0.14% 0.05mg/g	0.04% 0.02mg/g	0.03% 0.01mg/g	0.38% 0.03mg/g	--	0.10% 0.05mg/g
Flavanone glucoside 02	2.02% 0.66mg/g	0.12% 0.06mg/g	--	0.15% 0.01mg/g	0.45% 0.04mg/g	0.73% 0.41mg/g
Flavanol 01	0.12% 0.04mg/g	0.05% 0.02mg/g	--	--	--	0.07% 0.04mg/g
Flavone glucoside 01	--	--	--	--	--	0.11% 0.06mg/g
Acidesphénoliques glucosides 03	22.42% 7.36mg/g	36.70% 17.52mg/g	57.03% 9.42mg/g	23.07% 2.11mg/g	43.89% 8.23mg/g	31.50% 17.56mg/g

Les phénols simples sont présents en grandes quantités dans toutes les régions suivis par les acides phénoliques glucosides.

Les flavonols glucosides sont présents dans toutes les régions, mais ils sont plus abondants à Essaouira (5,92 mg/g d'extrait) et à Taza (5,45 mg/g d'extrait).

Les composés des autres sous classes sont soit absents, soit présents mais avec des faibles concentrations (au dessous de 0,66 mg/g d'extrait).

La nomenclature de ces composés identifiés est définie comme suit:

Phénols : 1. Acide benzoïque, 2. Acide p-hydroxybenzoïque (p-HBA), 3. Acide 3,4-dihydroxybenzoïque (3,4-DHBA), 4. Acide gallique, 5. Ethyle gallate, 6. Méthyle gallate, 7. Acide vanillique, 8. Acide syringique, 9. Digallate, 10. Trigallate, 11. Tétragallate, 12. Acide cinnamique, 13. p-acide coumarique, 14. Cis-p-acide coumarique, 15. Acide férulique, 16. p-hydroxy benzaldéhyde, 17. Méthoxy benzaldéhyde, 18. Méthoxy-p-hydroxy benzaldéhyde, 19. Diméthoxy benzaldéhyde, 20. Diméthoxy-p-hydroxy benzaldéhyde, 21. Acide éllagique.

Flavones : 22. 7,4'-dihydroxyflavone, 23. Apigénine, 24. 7,3',4'-Trihydroxy flavone, 25. Tricétine, 26. Chrysoeriol, 27. Tricétine-3',5'-diméthyle éther, 28. Méthoxy genkwanine, 29. Trihydroxy triméthoxy flavone.

Flavonols : 30. Dihydroxy flavone, 31. Quercétine, 32. Isorhamnétine.

Flavonol glucosides : 33. Kaempferol rhamnoside, 34. Quercétine rhamnoside, 35. Quercétine glucoside, 36. Quercétine arabinoside, 37. Myricétine glucoside, 38. Myricétine rhamnoside.

Isoflavones : 39. Génistéine, 40. Génistéine-7,4'-diméthyle éther, 41. Génistéine diméthyle éther.

Isoflavone glucoside : 42. Génistéine glucoside.

Flavanones : 43. liquiritégénine, 44. Naringénine, 45. Eriodictyol.

Flavanone glucosides : 46. Naringénine glucoside, 47. Eriodictyol glucoside.

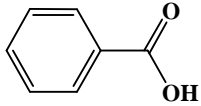
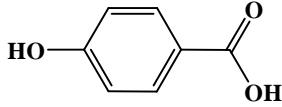
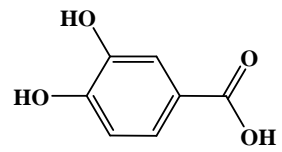
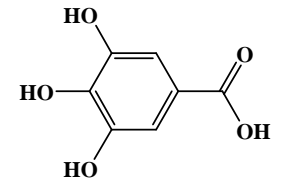
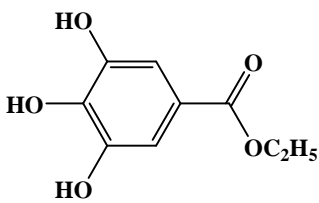
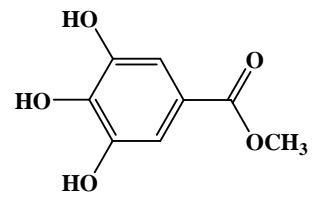
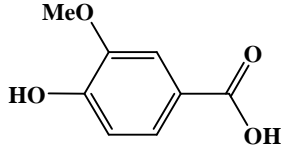
Flavanol : 48. Taxifoline.

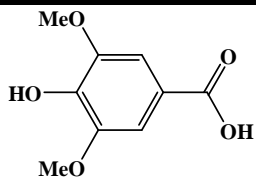
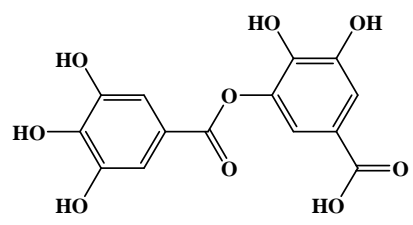
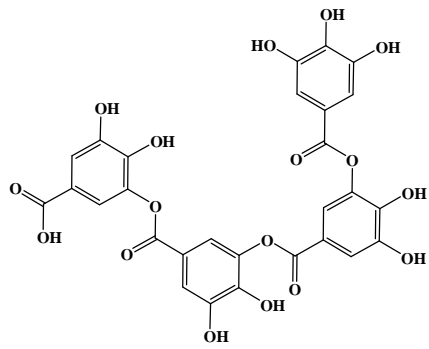
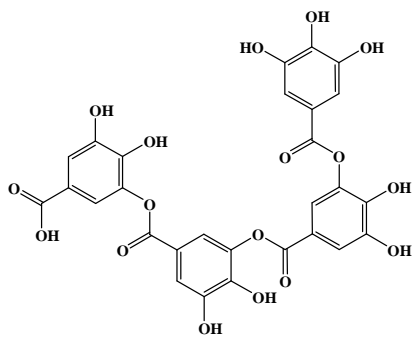
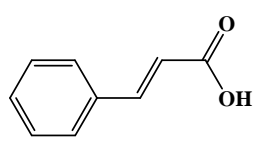
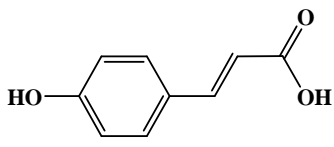
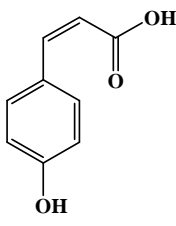
Acides phénoliques glucosides : 49. Gallate glucoside, 50. Acide gallique glucoside, 51. Acide gallique diglucoside.

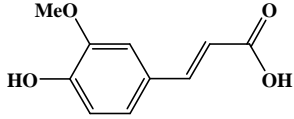
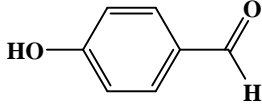
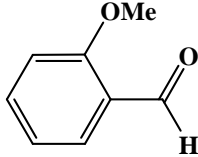
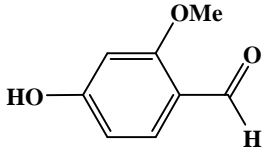
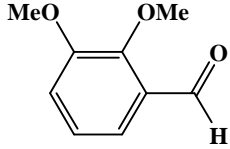
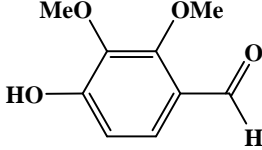
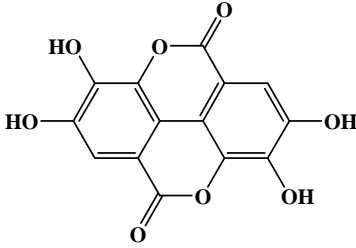
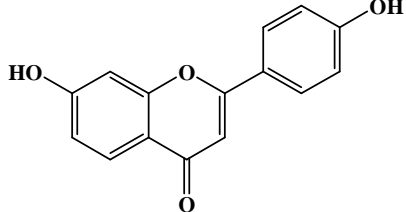
Flavone glucoside: 52. Méthoxy genkwanine glucoside.

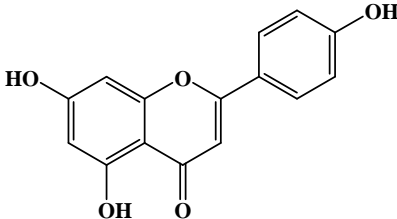
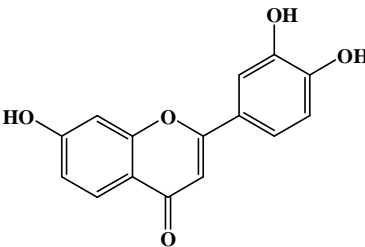
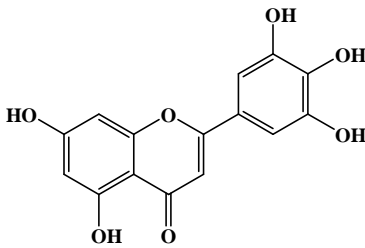
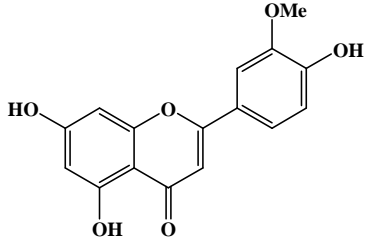
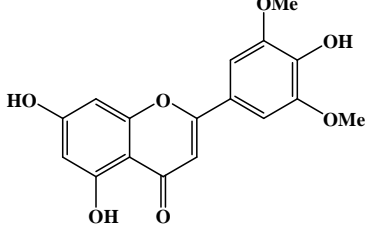
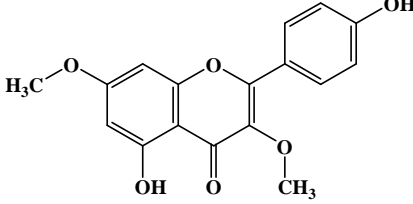
Les structures de l'ensemble des composés phénoliques figurent dans le tableau 10 :

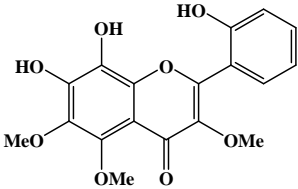
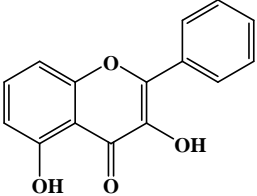
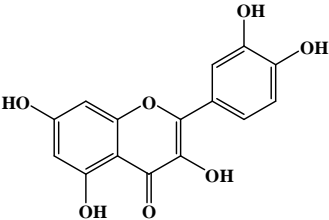
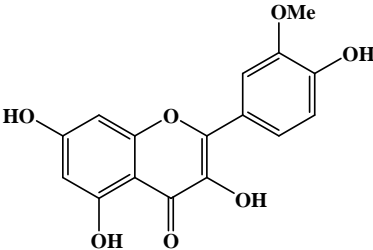
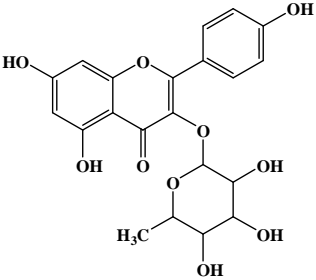
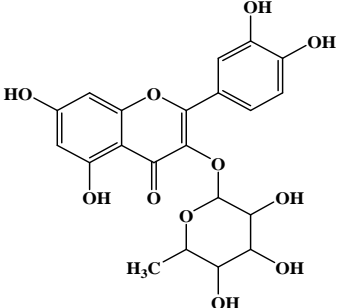
Tableau 10 : Structures chimiques et rendements de tous les composés phénoliques identifiés dans les extraits éthanoliques analysés.

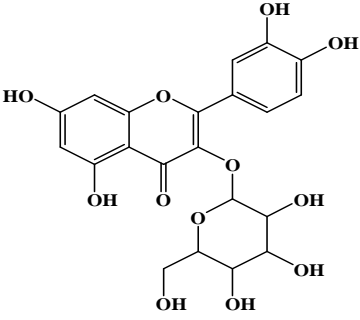
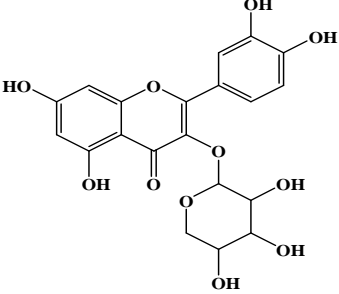
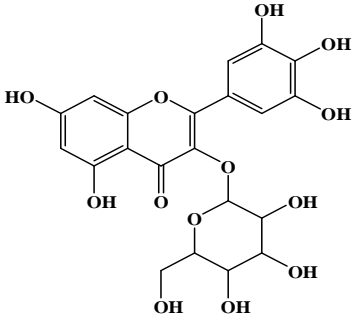
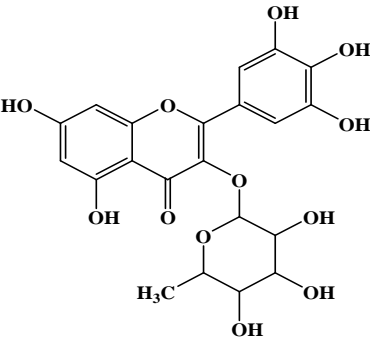
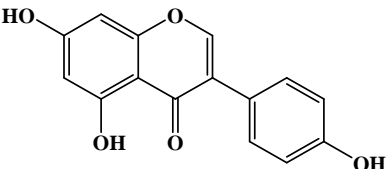
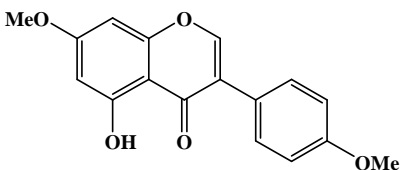
N°	Nom	Structure chimique	Rendement (%)					
			Essaouira	Béni-Mellal	tafraout	Nador	Fès	Taza
1	Acide benzoïque		0.62	0.32	-	1.85	0.48	0.13
2	Acide p-hydroxybenzoïque		0.01	0.04	-	0.06	-	0.04
3	Acide 3,4-dihydroxybenzoïque		0.09	-	-	-	-	0.04
4	Acide gallique		27.03	17.96	18.87	32.92	20.48	18.72
5	Ethyle gallate		0.66	0.36	0.09	0.19	1.06	0.38
6	Méthyle gallate		-	0.08	-	-	-	0.05
7	Acide vanillique		0.02	0.03	-	0.17	-	0.05

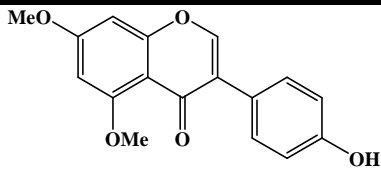
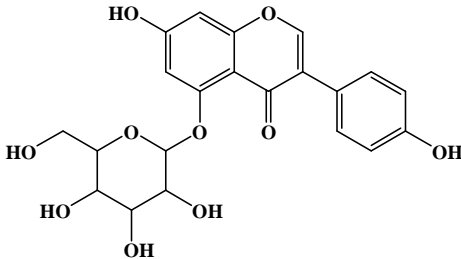
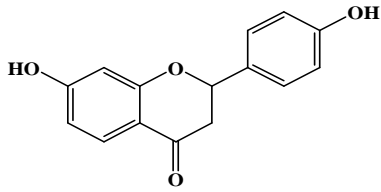
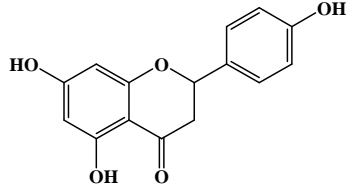
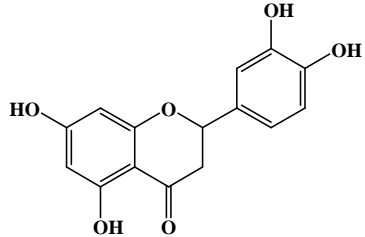
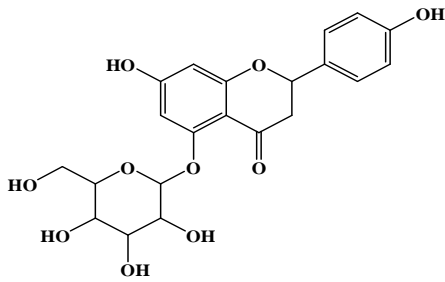
8	Acide syringique		0.01	0.01	-	-	-	0.03
9	Di gallate		7.11	6.52	5.50	3.95	10.94	8.57
10	Tri gallate		7.52	9.11	4.20	5.65	5.53	10.20
11	Tétra gallate		11.59	20.30	2.85	5.33	7.12	17.90
12	Acide cinnamique		0.02	0.08	-	0.75	0.24	0.20
13	p-acide coumarique		0.18	0.06	0.07	0.32	0.06	0.06
14	Cis-p-acide coumarique		0.05	-	-	-	-	-

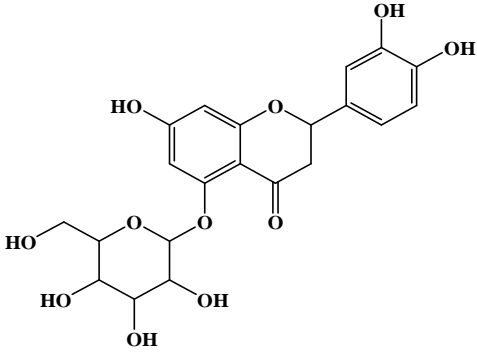
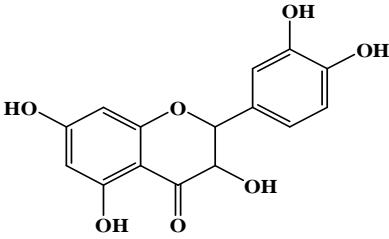
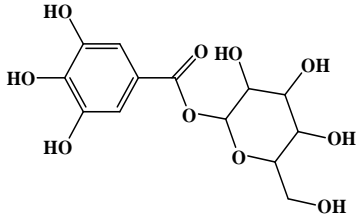
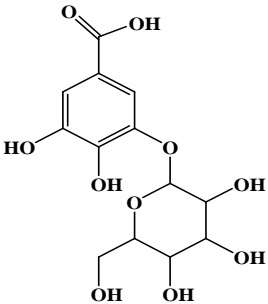
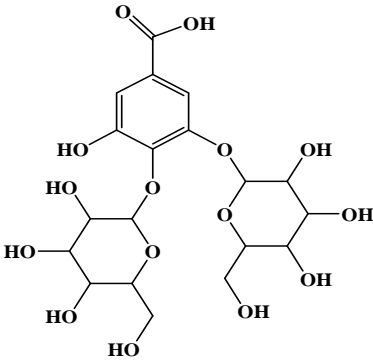
15	Acide férulique		0.02	0.04	-	0.30	-	0.07
16	p-hydroxy benzaldéhyde		0.10	0.02	0.03	0.07	-	0.01
17	Méthoxy benzaldéhyde		-	-	-	0.05	-	-
18	Méthoxy-p-hydroxy benzaldéhyde		0.07	0.02	0.02	-	-	0.04
19	Diméthoxy benzaldéhyde		-	-	-	-	-	0.02
20	Diméthoxy-p-hydroxy benzaldéhyde		0.01	-	-	-	-	-
21	Acide éllagique		-	0.70	0.22	0.16	0.14	0.37
22	7,4'-dihydroxyflavone		-	-	-	0.17	0.10	-

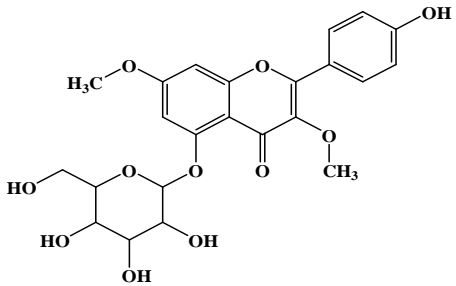
23	Apigénine		0.01	0.02	0.03	-	0.05	-
24	7,3',4'- Trihydroxy flavone		-	0.02	-	-	-	0.04
25	Tricétine		-	0.17	0.10	1.91	-	0.15
26	Chrysoeriol		0.11	-	-	-	-	0.04
27	Tricétine-3',5'- diméthyle éther		0.25	-	-	-	0.42	-
28	Méthoxy genkwanine		0.44	0.20	-	0.80	-	0.10

29	Trihydroxy triméthoxy flavone		0.07	-	-	-	-	-
30	Dihydroxy flavone		0.02	0.04	-	-	-	-
31	Quercétine		0.09	-	-	0.11	-	0.09
32	Isorhamnétine		0.72	0.42	0.21	-	1.55	0.40
33	kaempferol rhamnoside		-	-	-	-	-	0.15
34	Quercétine rhamnoside		7.05	2.63	4.32	9.08	3.38	3.50

35	Quercétine glucoside		1.76	-	0.75	1.26	0.63	0.83
36	Quercétine arabinoside		0.49	-	-	-	-	0.25
37	Myricétine glucoside		4.30	1.35	2.24	3.03	-	1.94
38	Myricétine rhamnoside		4.42	2.43	3.44	7.79	2.92	3.00
39	Génistéine		0.05	-	-	0.05	-	0.01
40	Génistéine- 7,4'-diméthyle éther		0.05	-	-	-	-	-

41	Génistéine diméthyle éther		-	0.01	-	-	-	-
42	Génistéine glucoside		0.32	0.11	-	0.42	0.56	0.21
43	Liquiritigénine		0.03	-	-	-	-	-
44	Naringénine		0.10	0.02	0.03	0.21	-	0.03
45	Eriodictyol		0.01	0.02	-	0.17	-	-
46	Naringénine glucoside		0.73	0.12	-	-	0.23	0.26

47	Eriodictyol glucoside		1.29	-	-	0.15	0.22	0.47
48	Taxifoline		0.12	0.05	-	-	-	0.07
49	Gallate glucoside		22.02	36.70	-	-	-	-
50	Acide gallique glucoside		0.40	-	57.03	23.07	43.89	29.84
51	Acide gallique diglucoside		-	-	-	-	-	1.66

52	Méthoxy genkwanine glucoside		-	-	-	-	-	0.11
----	------------------------------	---	---	---	---	---	---	------

Partie II : Evaluation biologique des extraits phénoliques des cosses de caroube recueillie de différentes régions du Maroc

II-1. Quelques activités biologiques de l'extrait de la gousse du caroubier

Avant d'aborder nos résultats expérimentaux, nous donnerons un aperçu bibliographique sur quelques activités biologiques de l'extrait des gousses du caroubier.

Les extraits de caroube, la fibre et les poly phénols, sont connus pour exercer une variété d'effets biologiques: amélioration de la digestion [13], atténuation du taux de cholestérol dans le sang [14] et régulation de niveau du glucose dans le sang [15]. La fibre diététique a probablement des effets contre certains cancers, en particulier ceux de la région gastro-intestinale [16]. La fibre et les poly phénols de la caroube peuvent induire des effets biologiques complémentaires (effet syn-énergie). Les tests biologiques de ces derniers, ont montré des activités biologiques encourageantes: anti-oxydantes [17], anti-carcinogéniques [18], anti-mutagènes [19] et anti-oestrogéniques [20].

L'extrait de pulpe de caroube a été testé contre listéria monocytogènes, salmonella enteritidis, staphylococcus aureus S-6 et 722 pseudomonas fragi, shewanella putrefaciens et brochothrix thermosphacta. Cet extrait inhibe à des concentrations différentes l'évolution de ces bactéries sauf salmonella enteritidis qui n'a pas été inhibée même avec des concentrations élevées [21].

-
13. J. H. Cummings, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, **1993**, 263–350.
 14. L. Brown, B. Rosner, W. W. Willett, F. M. Sacks, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1999**, 69, 30–42.
 15. J. W. Anderson, L.D. Allgood, J. Turner, P. R. Oeltgen, B. P. Daggy, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1999**, 70, 466–473.
 16. L. O. Whiteley, D. M. Klurfeld, *Nutr. Cancer*, **2000**, 36, 131–149.
 17. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, P. G. Bolwell, P. M. Bramley, J. B. Pridham, *Free Radic Res.*, **1995**, 22, 377–383.
 18. H. Mukthar, Z. Y. Wang, S. K. Katiyar, R. Agarwal, *Preventive Medicine*, **1992**, 21, 351–360.
 19. M. Yamagishi, M. Natsume, A. Nagaki, T. Adachi, N. Osakabe, T. Takizawa, H. Kumon, T. Osawa, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 5074–5078.
 20. M. Messina, S. Barnes, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1991**, 83, 541–546.
 21. C. C. Tassou, E. Drosinos, G. J. E. Nychas. *Int. Biodeter. Biodegr.*, **1995**, 466-467.

Le traitement des cellules cancéreuses par l'infusion de la poudre des feuilles du caroubier ou celle du fruit inhibe leur prolifération. Ces extraits sont aussi capables d'induire une apoptose (mort cellulaire programmée) après 24 heures du traitement [22]. La gousse et les feuilles du caroubier, en particulier les jeunes feuilles, contiennent des substances pouvant agir sur les récepteurs périphériques des benzodiazépines, suggérant ainsi la possibilité de l'utilisation des extraits foliaires comme agents chemopréventifs [23].

Compte tenu des activités pharmacologiques importantes que présente l'extrait de la caroube, et compte tenu de la teneur élevée en composés phénoliques de la cosse de la caroube marocaine par rapport aux données de la littérature, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antiproliférative, des extraits phénoliques des cosses de caroube recueillies de différentes régions du Maroc.

Dans le but de détecter les composés bioactifs parmi les composés majoritaires identifiés dans les extraits analysés, des tests d'activité antiproliférative ont été effectués sur cinq fractions séparées de l'extrait brut de la région d'Essaouira qu'est composée d'un nombre important de molécules polyphénoliques.

II-2. Activité antiproliférative des extraits phénoliques de la cosse de la caroube Marocaine.

Dans le présent travail, nous étudions l'activité antiproliférative des extraits éthanoliques bruts obtenus précédemment de quatre régions (Essaouira, Nador, Béni-Mellal et Tafraout) ainsi que les fractions séparées sur colonne de l'extrait éthanolique de la région d'Essaouira.

Les activités antiprolifératives *in vitro* ont été évaluées au moyen du test colorimétrique MTT à l'Institut National de Recherche sur le cancer, Unité de Thérapie Immunologique, Italie sous la direction du Docteur Maurizio Viale.

22. L. Corsi, R. Avallone, F. Cosenza, F. Farina, C. Baraldi, M. Baraldi. *Fitoterapia*, **2002**, 73, 674–684.

23. R. Avallone, F. Cosenza, F. Farina, C. Baraldi, M. Baraldi. *Fitoterapia*, **2002**, 73, 390-396.

II-2-1. Evaluation de l'activité antiproliférative des extraits éthanoliques de quatre régions marocaines.

Les extraits testés ont été choisis de manière arbitraire, ce sont les extraits éthanoliques bruts de la région d'Essaouira, de Nador, de Béni-Mellal et de Taфраout.

a. Les lignées cellulaires étudiées :

Il s'agit de deux lignées d'origine humaine et une d'origine murine. Les lignées cellulaires de cancers humains utilisées comprennent : A2780 provient d'un cancer de l'ovaire et A549 provient d'un cancer du poumon. La lignée cellulaire d'origine murine est la lignée leucémique P388.

b. Dilution des extraits :

Tous les extraits sont dissouts dans du DMSO (Diméthyle sulfoxyde) à des concentrations de 100 mM. Ces solutions sont par la suite diluées avec du sérum bovin fœtal pour obtenir 10X solutions de concentrations expérimentales finales. La concentration finale du DMSO a toujours été maintenue à 0.4 % (v/v). Les dilutions suivantes sont réalisées avec du PBS (Phosphate Buffered Saline : Le tampon phosphate salin). Des contrôles appropriés sont toujours réalisés.

c. Protocole expérimentale :

Le test colorimétrique MTT ou bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium est un test qui permet d'évaluer la croissance globale d'une lignée cellulaire donnée. Il est basé sur la réduction du MTT en formazan par la succinate déshydrogénase présente dans la membrane interne des mitochondries. Le formazan est soluble dans le DMSO dans lequel il donne une coloration violette dont l'intensité est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Les trois lignées cellulaires : A2780 (carcinome ovarien), A549 (carcinome pulmonaire) et P388 (Leucémie) utilisées dans cette étude sont placées dans des plaques de microtitration de 96 puits à différentes concentrations par puits allant de 1000 à 2000 / puits. Les plaques sont centrifugées à 275 g pendant 3 min puis maintenues pour environ 6 à 8 h avant le traitement. Les extraits sont ajoutés en double à des concentrations appropriées avec un minimum de 5 concentrations (1:10 série de dilutions). Le volume final par puits est de 200 µl. Des contrôles appropriés sont réalisés pour chaque test.

Après 3 jours de culture, 50 µl d'une solution (2 mg/ml dans du PBS) de 3-(2,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium bromide (MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA) sont ajoutés dans les puits et les plaques sont incubées 4 h à 37 °C. Les microplaques

sont ensuite centrifugé à 275 g pendant 3 min et le milieu de culture est doucement aspiré et remplacé par 100 µl de DMSO à 100 %. Une solubilisation complète et homogène des cristaux de formazan est obtenue après 20 à 30 min d'incubation et d'agitation des plaques. L'intensité de fluorescence est mesurée dans le lecteur de microplaque 400 ATC (SLT Labinstruments, Austria) à 540 nm [24]. Les CI_{50} sont calculées en analysant les courbes dose-réponses individuelles. Chaque valeur finale est la moyenne de 3 à 7 essais.

d. Présentation et interprétation des résultats

Les résultats des tests pharmacologiques des extraits éthanoliques de la cosse de caroube effectués sur trois lignées cellulaires sont répertoriés dans le tableau suivant :

Tableau 11: Valeurs des CI_{50} après l'évaluation de l'activité antiproliférative des extraits éthanoliques de la caroube marocaine par la méthode MTT.

Extrait brut	A2780	A549	P388
	CI_{50} (µM)	CI_{50} (µM)	CI_{50} (µM)
Région d'Essaouira	1369±108	<< 1000	1192±174
Région de Béni-Mellal	1338±420	1022±171	1580±111
Région de Tafraout	1319±309	1179±33	1450±63
Région de Nador	1407±220	<< 1000	1396±348

On constate d'après ces résultats que l'effet cytotoxique varie en fonction des extraits et des lignées cellulaires. Ainsi, l'effet des quatre extraits est plus important sur la lignée cellulaire A549 surtout pour l'extrait de la région d'Essaouira et la région de Nador avec des $CI_{50} << 1000 \mu M$. Par ailleurs, l'effet des quatre extraits sur la lignée A2780 est pratiquement le même tandis que contre la lignée P388, l'extrait de la région d'Essaouira montre une activité cytotoxique sensiblement supérieure aux trois autres extraits.

24. R. F. Hussain, A. M. E. Nouri, R. T. D. olivier, *J. Immunol. Methods*, **1993**, 160, 89-96

II-2-2. Evaluation de l'activité antiproliférative des fractions séparées de l'extrait brut du caroubier de la région d'Essaouira

Vue l'activité biologique significative des extraits bruts de la pulpe de la caroube recueillie de différentes régions marocaines et dans le but d'améliorer l'activité anticancéreuse des extraits phénoliques, nous avons envisagé la séparation sur colonne de l'extrait phénolique brut de la région d'Essaouira qui contient 41 composés phénoliques. La chromatographie sur colonne nous a permis de séparer cinq fractions. La caractérisation chimique et l'identification structurelle des composés phénoliques présents dans les cinq fractions sont en cours d'étude via l'analyse des fractions par des méthodes chromatographiques et spectroscopiques. Cette étude nous permettra d'établir un lien entre la composition en molécules phénoliques et les propriétés bioactives de chaque fraction.

Les cinq fractions obtenues sont testées sur trois lignées cellulaires tumorales : A549 (Cancer du poumon), A2780 (Cancer de l'ovaire) et MDA-MB-231 (Cancer du sein).

Le protocole expérimental est similaire à celui utilisé précédemment.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Activité antiproliférative des fractions séparées de l'extrait phénolique brut de la région d'Essaouira.

Fractions	A2780	A549	MDA-MB-231
	CI ₅₀ (µg/ml)	CI ₅₀ (µg/ml)	CI ₅₀ (µg/ml)
F1	106.1±31.0	125.4±8.8	46.8±22.5
F2	>200	>200	>200
F3	>200	>200	>200
F4	>200	>200	>200
F5	137.9±14.8	142.9±19.4	121.6±3.7

Les données (moyenne ± écart-type) sont exprimées en µg/ml.

On note d'après ces résultats que la cytotoxicité dépend de la composition phénolique de la fraction et du type de la lignée cellulaire tumorale étudiée. En effet, la fraction F₁ présente un effet anticancéreux plus important comparé aux autres fractions

avec des CI_{50} de 106 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$ et de 46 $\mu\text{g/ml}$ respectivement contre les lignées cellulaires : A2780, A549 et MDA-MB-231. On enregistre ici l'effet plus marquant sur la lignée MDA-MB-231. La fraction F_5 de son côté, présente un effet relativement important sur toutes les lignées. Par contre, les fractions F_2 , F_3 , et F_4 n'ont pas montré d'effets intéressants sur aucune des lignées testées, avec des CI_{50} qui dépassent 200 $\mu\text{g/ml}$.

II-3 Conclusion :

L'évaluation pharmacologique des extraits bruts et fractionnés effectués sur les cellules tumorales A2780, A549, P388 et MDA-MB-231, a montré des activités anticancéreuses significatives.

L'extrait brut de la région d'Essaouira et celui de la région de Nador ont un effet important sur la lignée **A549** avec des $CI_{50} \ll 1000 \mu\text{M}$.

Les tests effectués sur les fractions séparées de l'extrait phénolique brut de la région d'Essaouira, ont montré que la fraction F_1 a un effet cytotoxique très important comparé aux autres fractions avec des CI_{50} de 106, 125 et 46 $\mu\text{g/ml}$ respectivement contre les lignées A2780, A549 et MDA-MB-231.

III- Conclusion générale du chapitre I

Dans le chapitre I, nous nous sommes intéressés à l'extraction, la séparation, l'identification et la quantification des composés phénoliques des cosses de la caroube Marocaine ainsi qu'à l'évaluation de l'activité antiproliférative des extraits obtenus. Les composés phénoliques sont identifiés sur la base des données spectroscopiques et chromatographiques : la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP analytique), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) et la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse sous ionisation électrospray (CLHP/SM-ESI).

Dans la première partie, nous avons présenté un rappel bibliographique détaillé sur la composition chimique et l'importance biologique du caroubier. Les principaux constituants du caroubier sont doués des propriétés pharmacologiques très diverses et intéressantes.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons exposé nos résultats expérimentaux sur l'extraction et la caractérisation des composés phénoliques présents

dans la poudre de caroube recueillie de six régions du Maroc. Un total de cinquante-deux composés poly phénoliques a été identifié pour la première fois pour la pulpe de la caroube marocaine. Nous avons aussi observé une différence quantitative dans la composition phénolique de la poudre de caroube entre les échantillons analysés.

Les principaux composés dans les six extraits éthanoliques des cosses de caroube étant l'acide gallique, le gallate glucoside et l'acide gallique glucoside.

Le gallate glucoside est détecté seulement dans deux régions: Béni-Mellal et Essaouira. Il est présent en concentration élevée (17,5 mg/g d'extrait) à Béni-Mellal.

La variabilité des composés chimiques d'extrait de la pulpe de caroube dans les différentes régions étudiées révèle l'extrême adaptation du caroubier aux environnements différents.

Dans la dernière partie de ce chapitre, l'évaluation pharmacologique des extraits bruts et fractionnés effectués sur quelques cellules tumorales ont montré des activités anticancéreuses significatives.

Chapitre II
Synthèse et Evaluation Pharmacologique de
Nouveaux Dérivés de *N*-(5-Indazolyl)-aryl
sulfonamide

I. Etude bibliographique

Les sulfonamides indazoliques constituent une grande famille de composés présentant des activités biologiques intéressantes. Pour cette raison, les efforts de notre laboratoire ont été orientés vers la diversification des dérivés des nitroindazoles dans l'objectif d'optimiser l'activité biologique de cette famille de composés.

A partir du 7-nitro-1*H*-indazole, E. M. Rakib et coll. [1] ont préparé une série des *N*-(7-indazolyl)-benzènesulfonamides. La majorité de ces composés ont été testés *in vitro* sur des cellules tumorales de la lignée cellulaire L1210 (Leucémie murine) pour évaluer leurs propriétés pharmacologiques. Les résultats des tests ont montré que les composés possédant un chlore ou un hydrogène sur la position 3 de l'indazole et un groupement méthoxy sur la position 4 du phényle du sulfonyle présentent une activité cytotoxique intéressante et une bonne spécificité sur le cycle cellulaire [2]. Parmi les composés les plus actifs de cette série, nous citons:

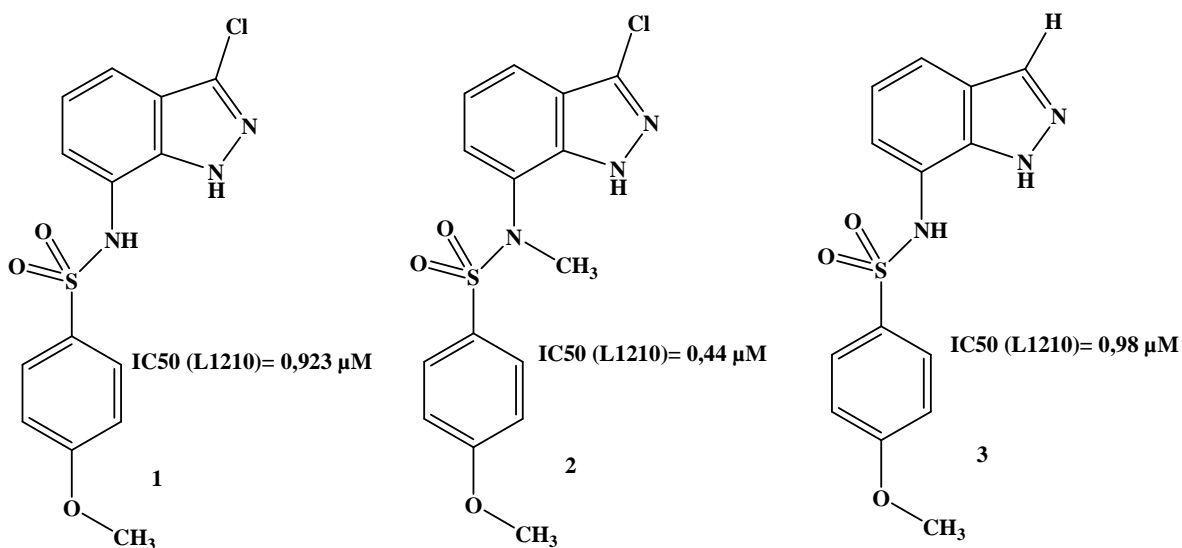


Schéma 1

Le composé **2** substitué sur l'azote NH-7 est deux fois plus actif que son homologue **1** non substitué.

1. L. Bouissane, S. El Kazzouli, J-Mi. Léger, C. Jarry, E. M. Rakib, M. Khouili, G. Guillaumet. *Tetrahedron*, **2005**, 61, 8218-8225.

2. L. Bouissane, S. El Kazzouli, S. Léonce, B. Pfeiffer, E. M. Rakib, M. Khouili, G. Guillaumet. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 1078-1088

Dans une étude similaire, E. M. Rakib et coll. [3,4] ont synthétisé une autre série des dérivés de *N*-(6(4)-indazolyl)benzènesulfonamides et 7-éthoxy-*N*-(6(4)-indazolyl) benzènesulfonamides à partir de la réduction des dérivés de 4-nitro-1*H*-indazole suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'arylsulfonyle et les ont testé *in vitro* sur les lignées cellulaires tumorales A2780 (carcinome ovarien humain), A549 (carcinome pulmonaire humain) et P388 (leucémie murine). Les composés **4-5** chloré en position 3 de l'indazole et substitué par un groupement méthoxy en position para du sulfonyle présentent une activité antiproliférative notable [5]. Les concentrations inhibitrices des composés **4-6** contre les lignées cellulaires A2780, A549, P388 sont de très faible dose CI_{50} (varie entre 0,50 et 5,83 μ M).

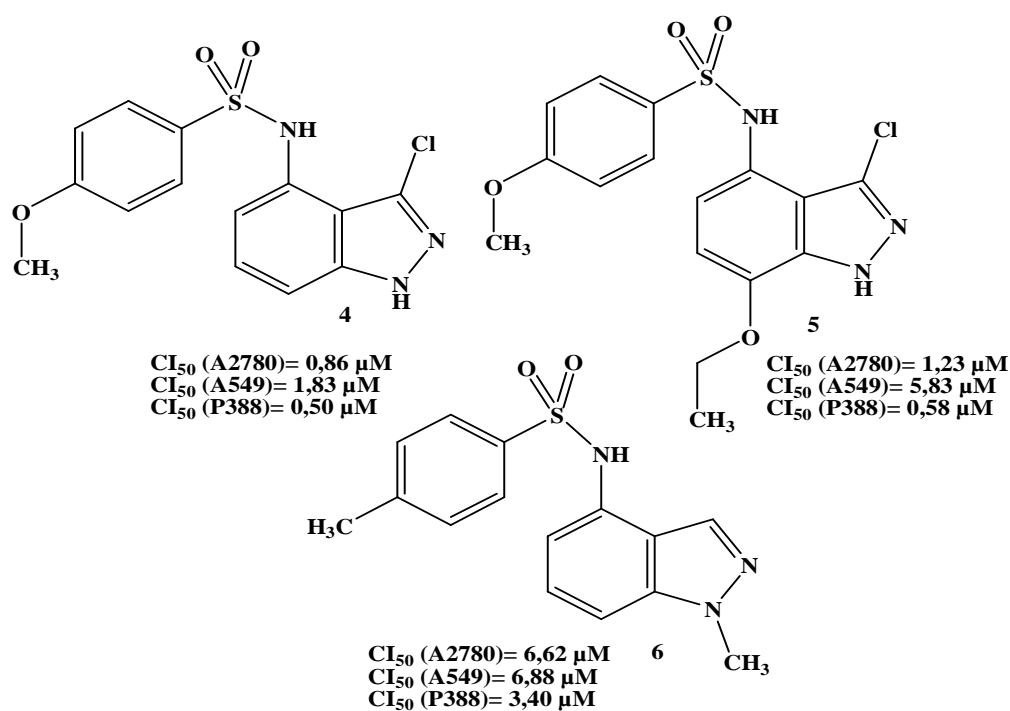


Schéma 2

-
3. N. Abbassi, E. M. Rakib, A. Hannioui, M. Alaoui, M. Benchidmi, E. M. Essassi, D. Geffken. *Heterocycles*, **2011**, 83 (4), 891-900.
 4. N. Abbassi, E. M. Rakib, L. Bouissane, A. Hannioui, M. Khouili, A. El Malki, M. Benchidmi, E. M. Essassi. *Synth. Commun.*, **2011**, 41: 7, 999 – 1005.
 5. N. Abbassi, H. Chicha, E. M. Rakib, A. Hannioui, M. Alaoui, A. Hajjaji, D. Geffken, C. Aiello, R. Gangemi, C. Rosano, M. Viale. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 57, 240-249.

En outre, ce type de dérivés indazoliques sont capables de déclencher l'apoptose par la régulation positive de l'apoptose typique marqueurs p53 et bax.

Dans un travail très récent [6], au sein de notre laboratoire, de nouveaux composés *N*-(6-indazolyl)arylsulfonamides et *N*-(alkoxy-6-indazolyl)arylsulfonamides ont été préparés à partir de la réduction du 2-alkyl-6-nitroindazole suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'arylsulfonyle. Les études pharmacologiques *in vitro* ont révélé que ces nouveaux composés synthétisés présentaient une activité antiproliférative significative contre les lignées cellulaires A2780, A549 à des concentrations de faibles doses allant de 4,21 μM à 18,6 μM .

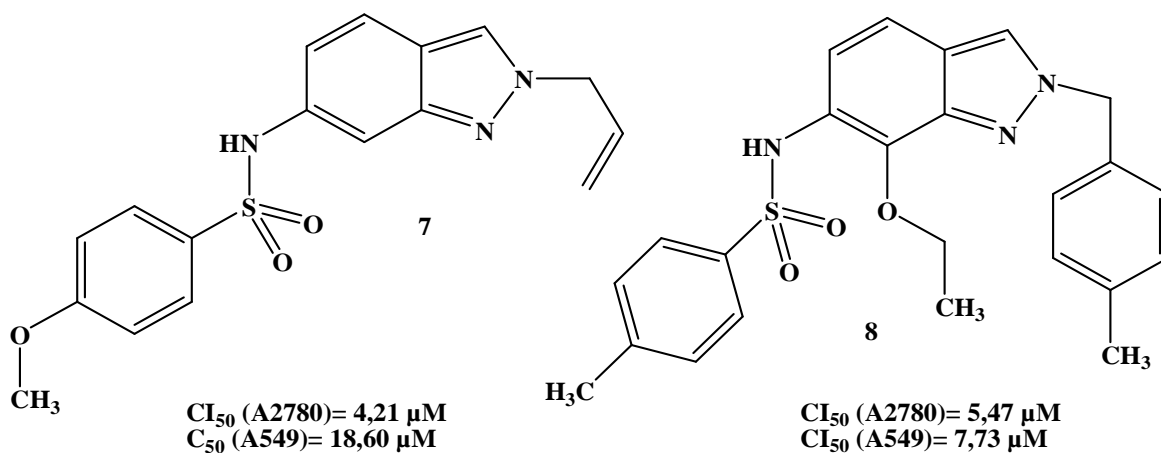


Schéma 3

Les sulfonamides **7** et **8** ont provoqué un arrêt des cellules à la phase G2/M sur le cycle cellulaire avec une diminution significative des cellules dans la phase G0/G1 et S.

Ces études réalisées par notre équipe de recherche, montrent que les sulfonamides indazoliques synthétisés à partir du **7**, **4** et **6-nitro-1H**-indazoles sont doués des propriétés anticancéreuses très intéressantes. Cette découverte a donc encouragé notre laboratoire à développer cette nouvelle famille chimique en étudiant cette fois-ci une autre position du groupement nitro sur le cycle benzénique de l'indazole.

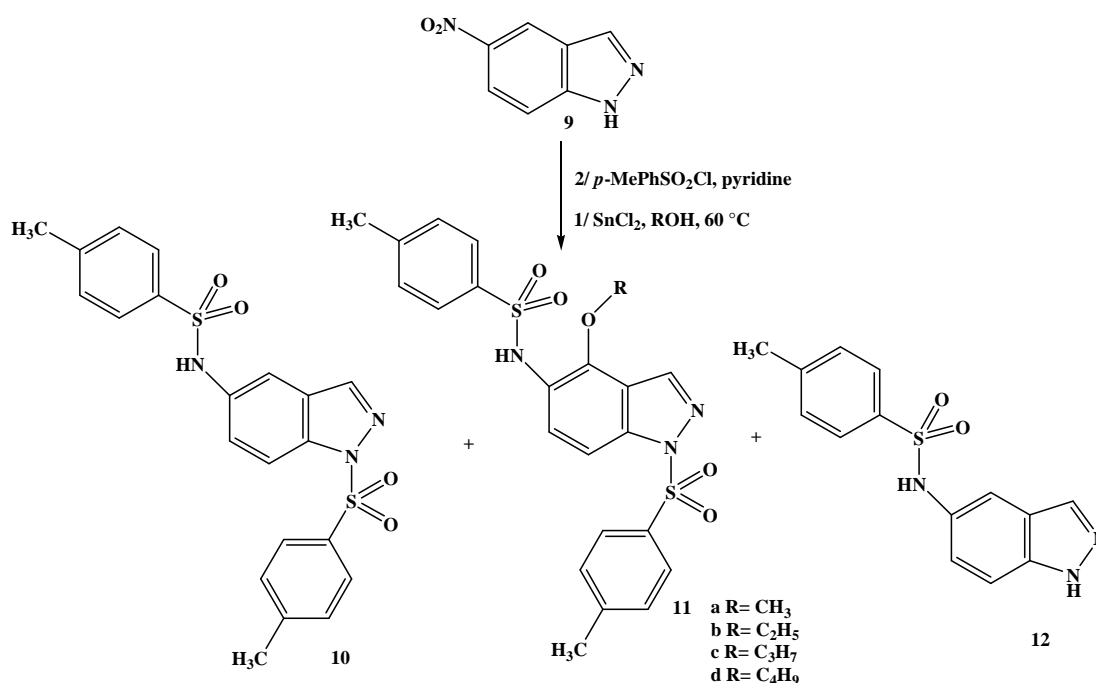
Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à synthétiser de nouvelles sulfonamides indazoliques à partir du **5-nitro-1H**-indazole en appliquant différentes voies de synthèse à savoir les réactions de réduction, de sulfonation, d'halogénéation et d'alkylation. Les molécules synthétisés seront testées *in vitro* afin d'évaluer leur potentielle antitumorale.

6. N. Abbassi, E. M. Rakib, H. Chicha, L. Bouissane, A. Hannioui, C. Aiello, R. Gangemi, P. Castagnola, C. Rosano, M. Viale. *Arch. Pharm. Chem.Life Sci.* **2014**, 347, 423-431.

II. Synthèse des *N*-(1*H*-indazol-5-yl)-arylsulfonamides

II-1 Préparation des dérivés de *N*-(1*H*-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzènesulfonamide

La synthèse des *N*-(1*H*-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzènesulfonamides **10-12** a été réalisée dans différents alcools (méthanol, éthanol, propanol et butanol) par action du chlorure d'étain anhydre sur le 5-nitro-1*H*-indazole **9**, suivie du couplage de l'amine formée par le chlorure de tosyloxy dans la pyridine. Cette réaction de réduction nous a permis d'isoler à côté du *N*-(1*H*-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzènesulfonamide **12**, le *N*-(4-alkoxy-1-(4-méthyl-benzènesulfonyl)-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzènesulfonamide **11** et le 4-méthyl-*N*-(1-(4-méthylbenzènesulfonyl)-1*H*-indazol-5-yl)-benzènesulfonamide **10** (Schéma 4).



Les rendements des composés **10**, **11a-d** et **12** sont répertoriés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Réduction de 5-nitroindazole par SnCl₂ dans différents alcools puis couplé avec 4-MePhSO₂Cl dans la pyridine.

R	Rdt de 10	Rdt de 11a-d	Rdt de 12
-CH ₃	17%	11a (23%)	63%
-C ₂ H ₅	22%	11b (26%)	58%
-C ₃ H ₇	18%	11c (27%)	55%
-C ₄ H ₉	21%	11d (24%)	56%

Les rendements sont obtenus, après séparation par chromatographie sur gel de silice.

Les rendements des sulfonamides **10**, **11a-d** et **12** varient en fonction de l'alcool utilisé comme solvant. Dans tous les cas, l'indazole non substitué **12** est obtenu avec un meilleur rendement par rapport aux 4-alkoxyindazoles **11a-d** et au sulfonamide **10**.

Les structures des composés **10**, **11a-d** et **12** ont été établies sur la base des données spectrales RMN¹H, RMN¹³C et DEPT. Dans les figures ci-dessous, nous présentons un exemple de spectres RMN¹H, RMN¹³C et DEPT des composés **10**, **11a** et **12**.

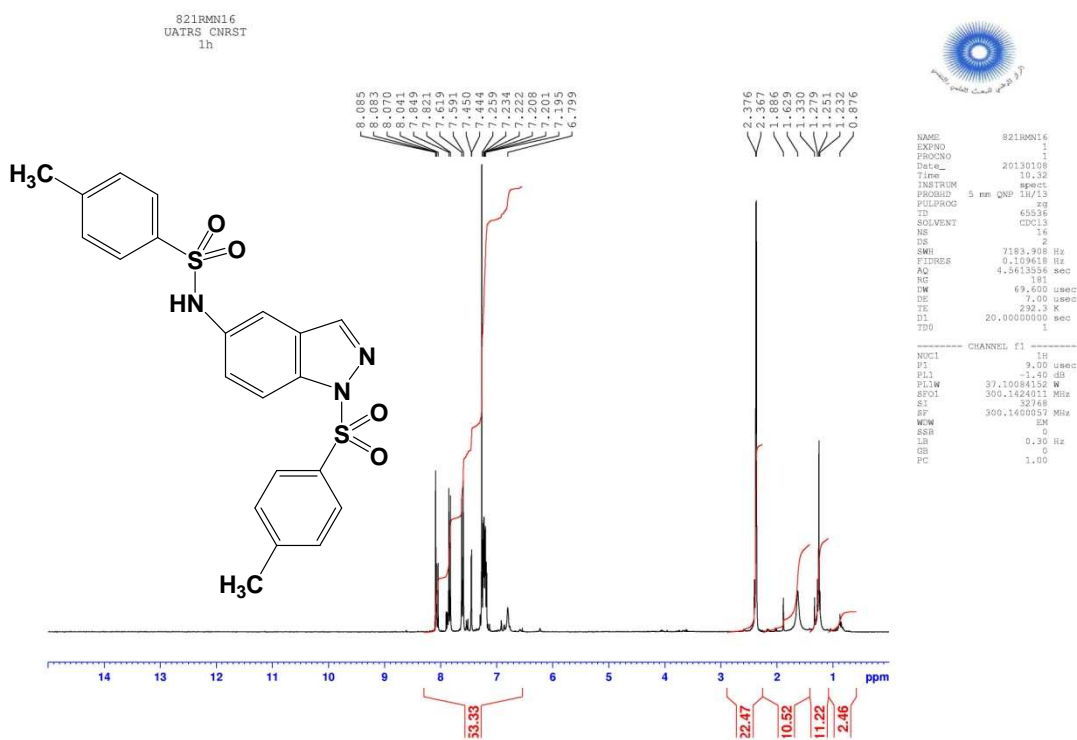


Figure 1 : Spectre RMN¹H du composé **10**

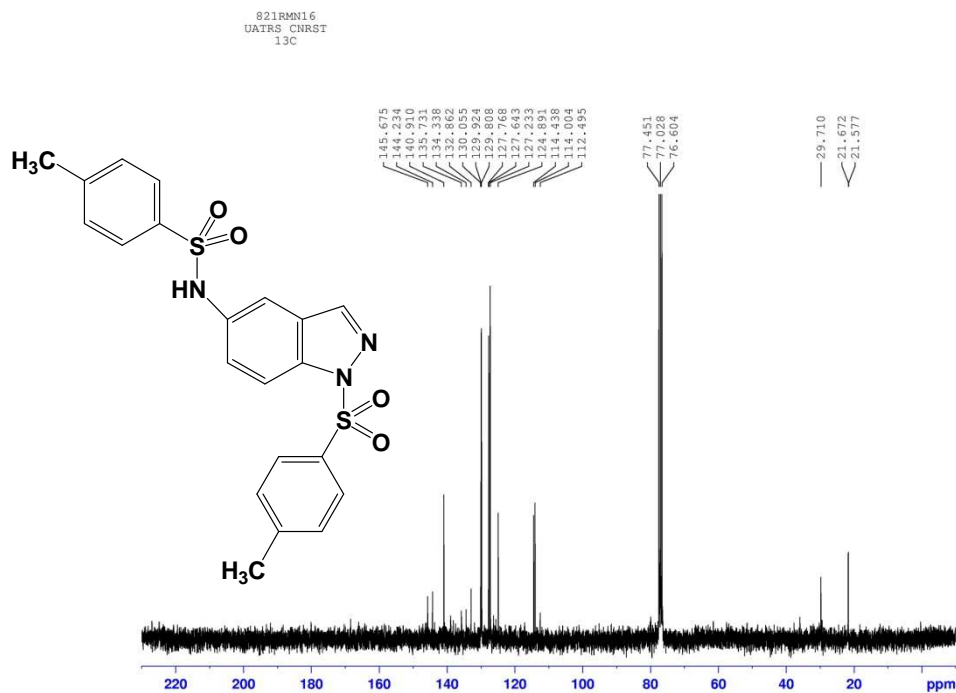


Figure 1 : Spectre RMN¹³C du composé 10

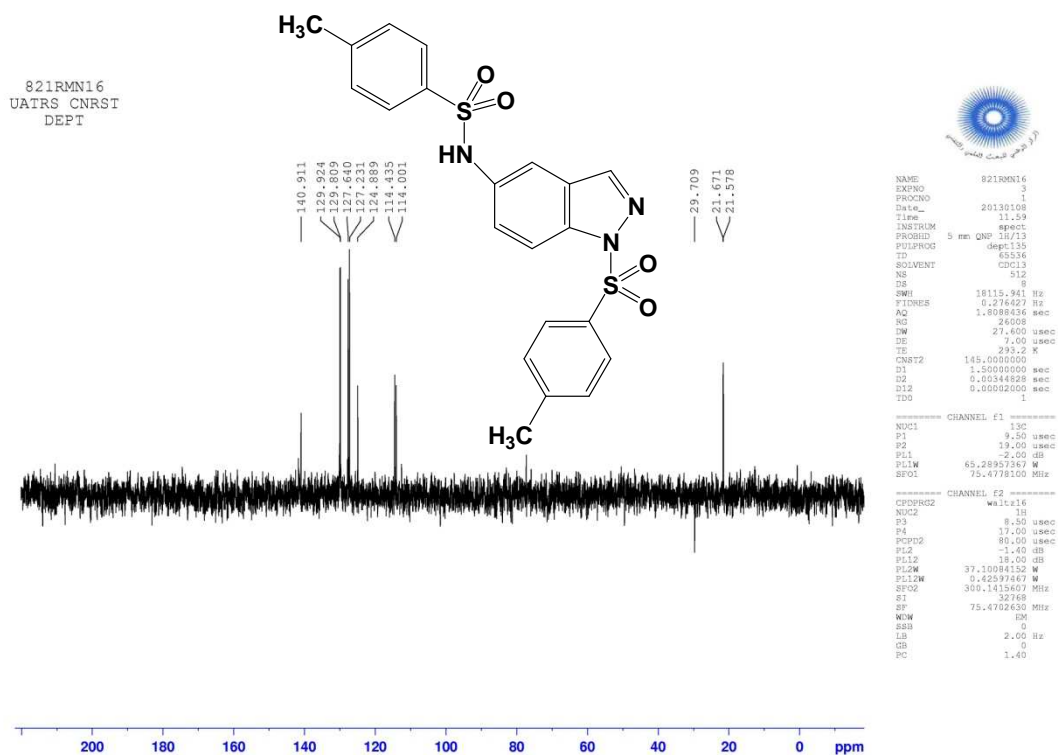


Figure 1 : Spectre RMN¹³C (DEPT) du composé 10

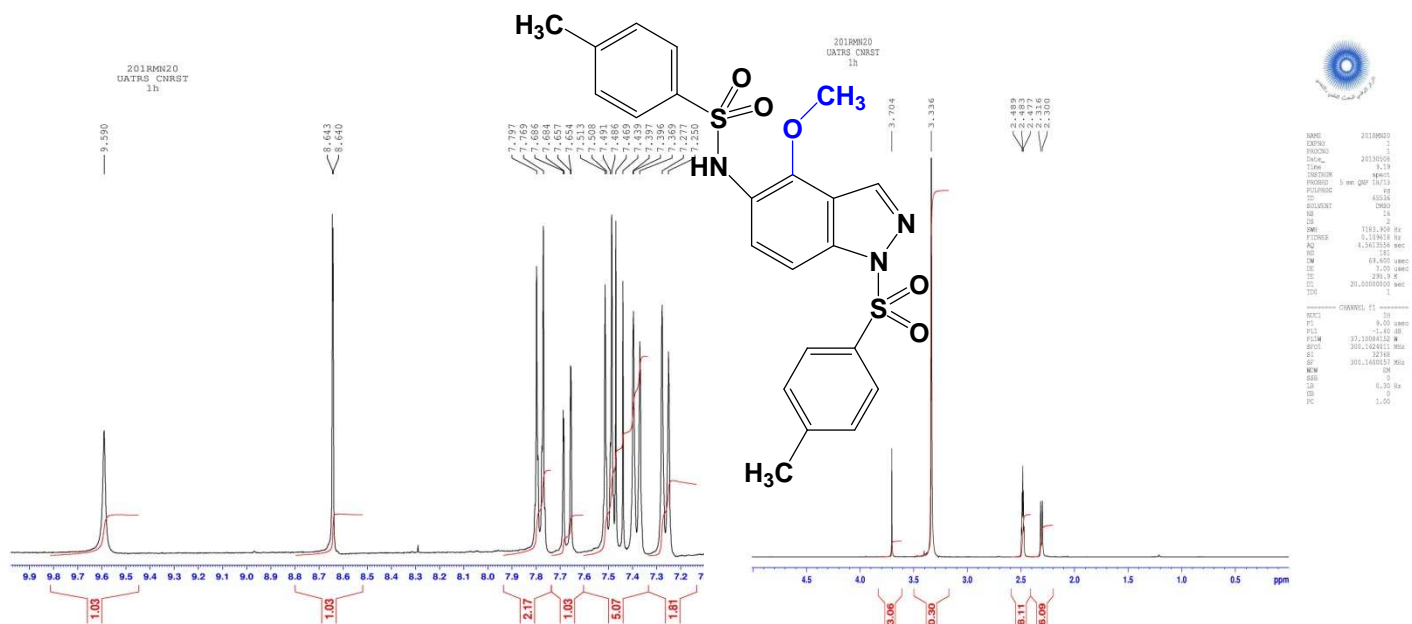


Figure 2 : Spectre RMN¹H étalé du composé 11a

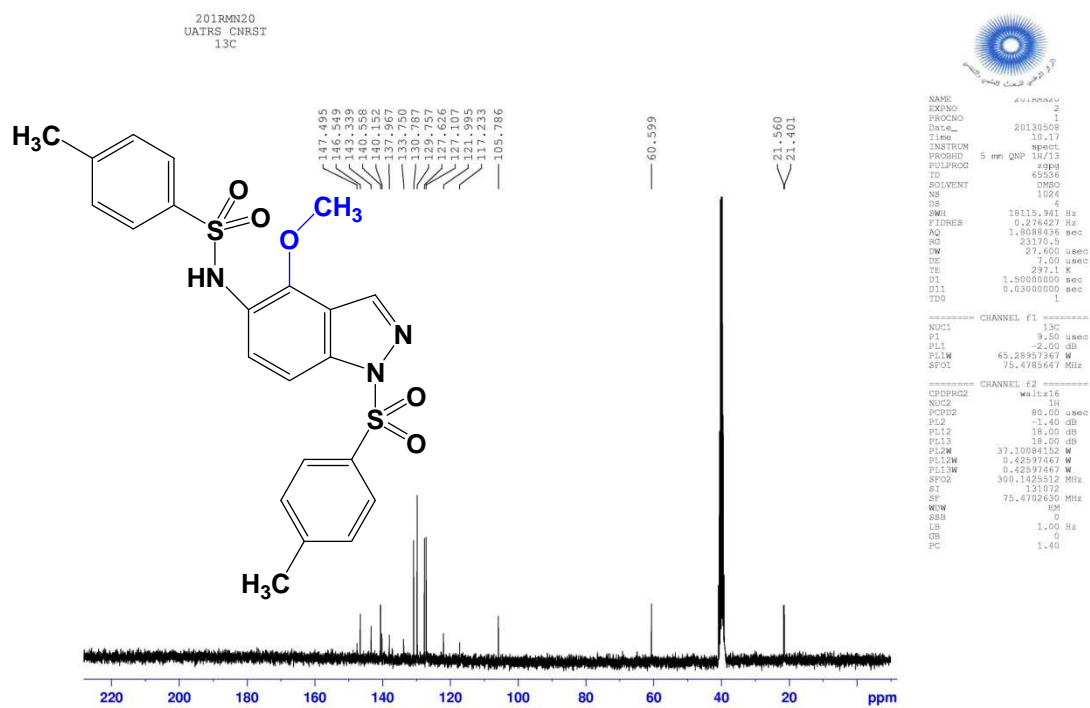


Figure 2 : Spectre RMN¹³C du composé 11a

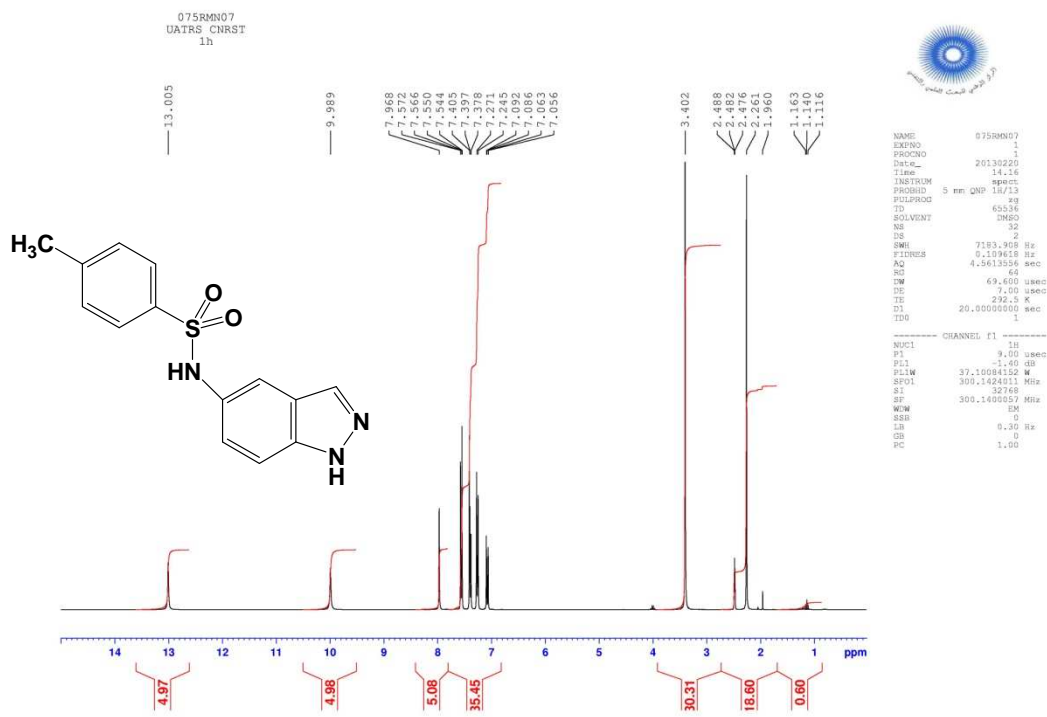


Figure 3 : Spectre RMN¹H du composé 12

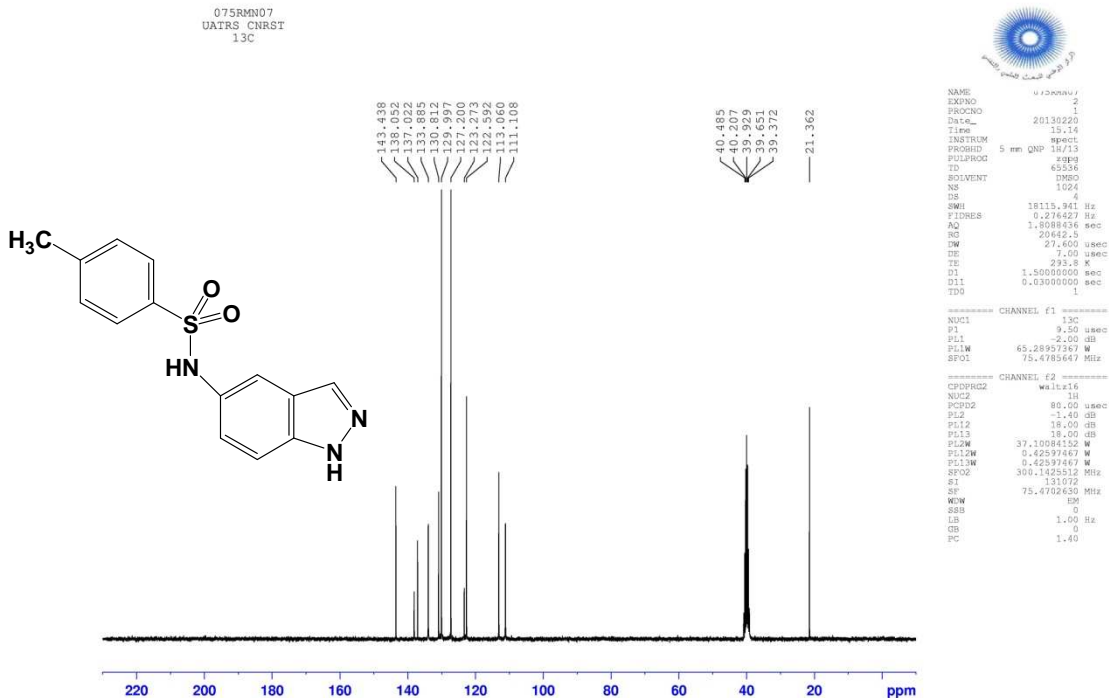


Figure 3 : Spectre RMN¹³C du composé 12

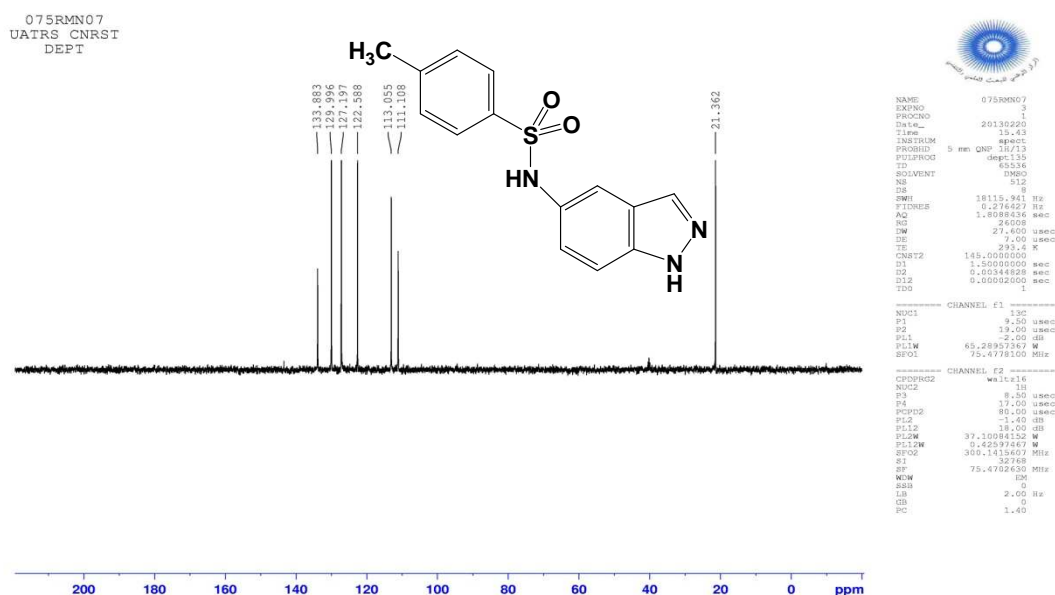


Figure 3 : Spectre RMN¹³C (DEPT) du composé **12**

Afin d'expliquer la fixation du groupement alkoxy en position 4 de l'indazole, nous avons proposé le mécanisme suivant (Schéma 5): l'étape initiale de la réaction correspond à la formation de l'intermédiaire 5-hydroxylamineindazole, suivie de l'attaque nucléophile de l'alcool présent dans le mélange de réaction via le doublet libre de l'oxygène en position 4 de l'indazole, ce site d'attaque nucléophile de l'indazole est activé par l'effet attracteur du groupement hydroxylamine. L'aromatization de l'homocycle benzénique de l'intermédiaire **A** conduit au 5-amino-4-alkoxyindazole. Le couplage de l'amine correspondante par le chlorure p-méthylbenzène sulfonyle conduit au sulfonamide escompté **11a-d**.

Il est à noter que la réduction des composés aromatiques nitrés avec SnCl₂ dans des solvants protiques comme les alcools, passe généralement par les intermédiaires nitroso et hydroxylamine avant la formation de l'amine correspondante [7-10].

7. J. Chauhan, S. Fletcher, *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 4951–4954

8. M. G. Uchuskin, N. V. Molodtsova, V. T. Abaev, I. V. Trushkov, A. V. Butin, *Tetrahedron* **2012**, 68, 4252-4258.

9. W.-K. Xing, Y. Ogata, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 2515-2520

10. L. A. McAllister, B. M. Bechle, A. B. Dounay, E. Evrard, X. Gan, S. Ghosh, J.-Y. Kim, V. D. Parikh, J. B. Tuttle, P. R. Verhoest, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 3484-3497.

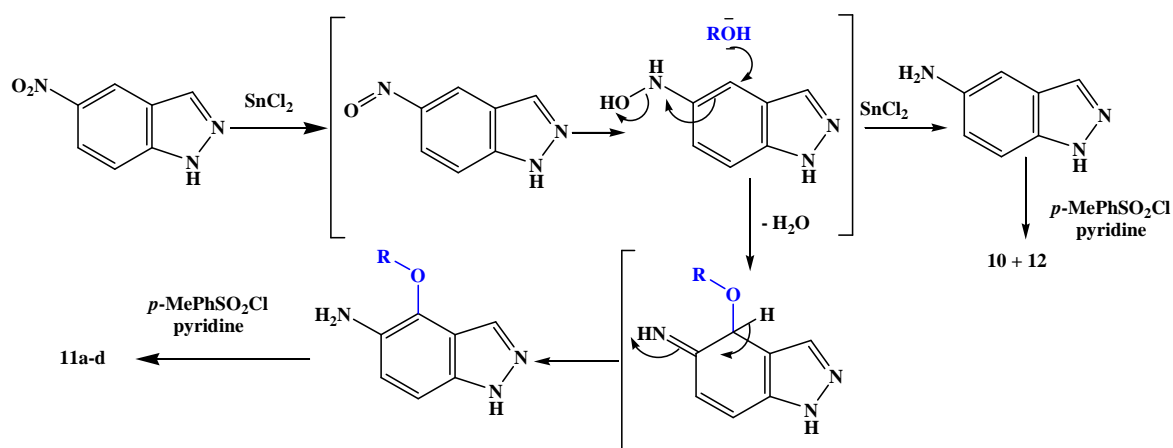


Schéma 5

II-2 Préparation des dérivés de *N*-(1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxy-benzènesulfonamide

Pour étudier l'influence du substituant en position para du chlorure de benzènesulfonyle sur l'activité antitumorale, nous avons appliqué les mêmes conditions précédentes de réduction du 5-nitroindazole, suivie du couplage de l'amine correspondante cette fois-ci par le chlorure de 4-méthoxybenzènesulfonamide. Ces conditions nous ont permis d'isoler également un mélange de trois produits : le *N*-(1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxy-benzènesulfonamide **15**, le *N*-(4-alkoxy-1-(4-méthoxy-benzènesulfonyl)-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxybenzène sulfonamide **14a-c** et le 4-méthoxy-*N*-(1-(4-méthoxybenzènesulfonyl)-1*H*-indazol-5-yl)-benzènesulfonamide **13** (Schéma 6).

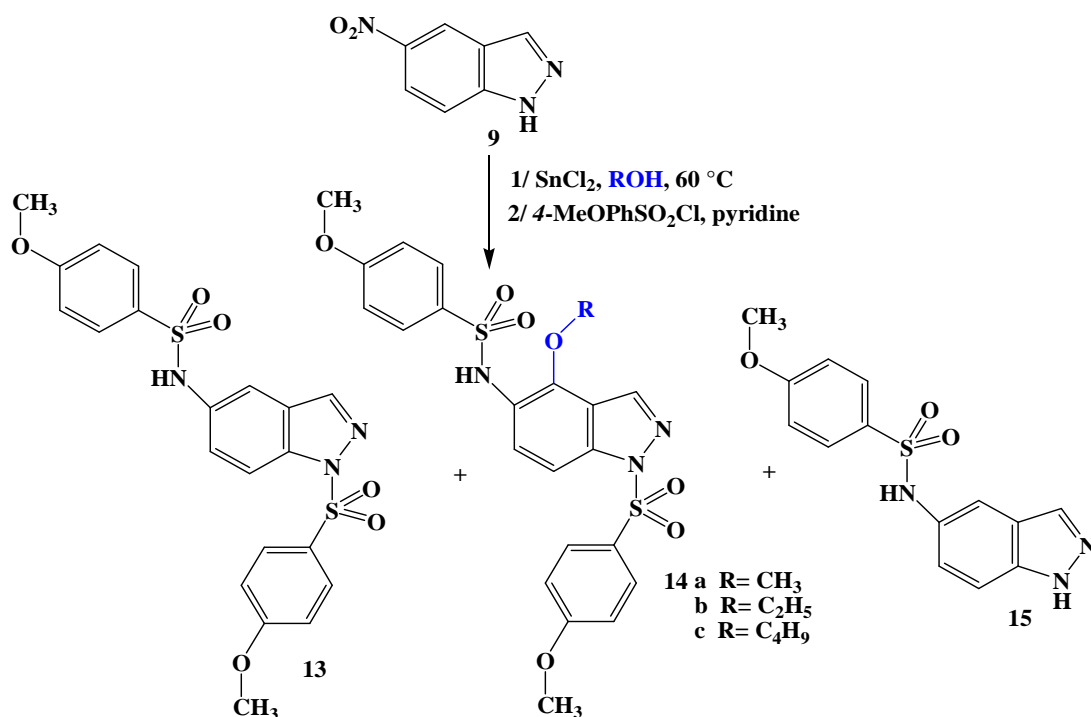


Schéma 6

Les rendements des composés **13**, **14a-c** et **15** sont répertoriés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Réduction de 5-nitroindazole par SnCl₂ dans différents alcools puis couplé avec 4-MeOPhSO₂Cl dans la pyridine.

R	Rdt de 13	Rdt de 14a-c	Rdt de 15
-CH ₃	23%	14a (41%)	27%
-C ₂ H ₅	19%	14b (38%)	44%
-C ₄ H ₉	24%	14c (34%)	40%

Les rendements sont obtenus, après séparation par chromatographie sur gel de silice.

Les rendements des sulfonamides indazoliques substitués par un groupement alkoxy **14a-c** sont meilleurs par rapport aux composés non substitués **13**, aussi par rapport aux composés **11a-d**. Ce résultat peut être expliqué par la cinétique de la réaction de couplage de l'amine correspondante avec le chlorure de 4-méthoxybenzène sulfonyle.

Le couplage de chlorure de 4-méthoxybenzène sulfonyle avec 4-alkoxy-5-aminoindazole est plus rapide qu'avec le 5-aminoindazole non substitué.

Les structures des composés **13**, **14a-c** et **15** ont été établies sur la base des données spectrales RMN¹H, RMN¹³C et DEPT. Dans les figures 4 et 5, nous présentons un exemple de spectres RMN¹H, RMN¹³C et DEPT des composés **13** et **14a**. La structure du composé **15** a été confirmée en plus des données spectroscopiques par diffraction des rayons-X (Figure 6). Le composé **15** cristallise dans le groupe d'espace P2₁/c du système monoclinique avec les paramètres de maille suivants : a = 8.9996 (4) Å, b = 7.1999 (3) Å, c = 21.3728 (10) Å, β = 91.794 (3) et V = 1384.20 (11) Å³ avec un motif par maille.

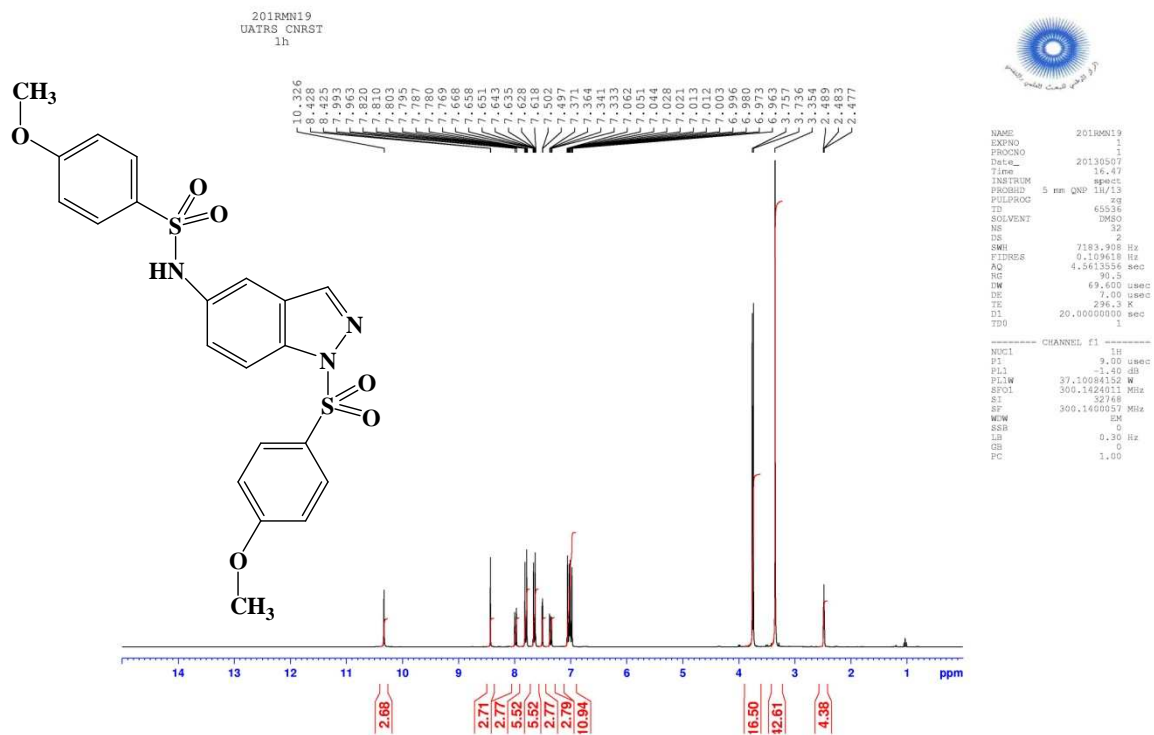


Figure 4 : Spectre RMN¹H du composé 13

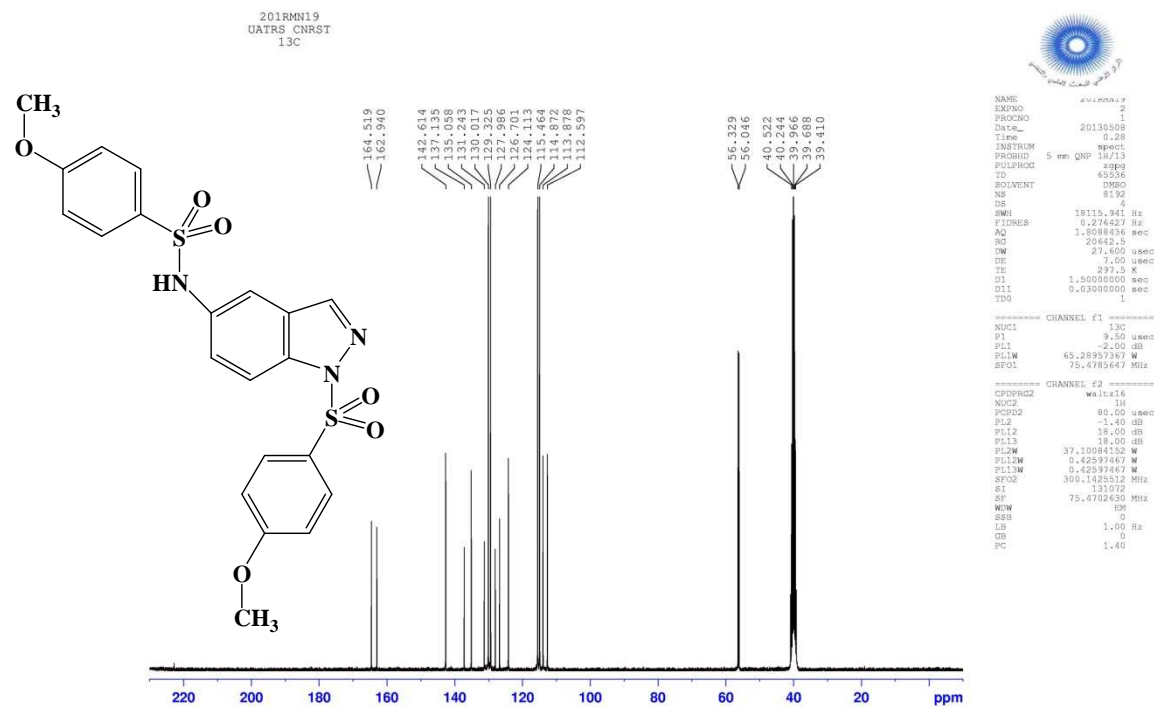


Figure 4 : Spectre RMN¹³C du composé 13

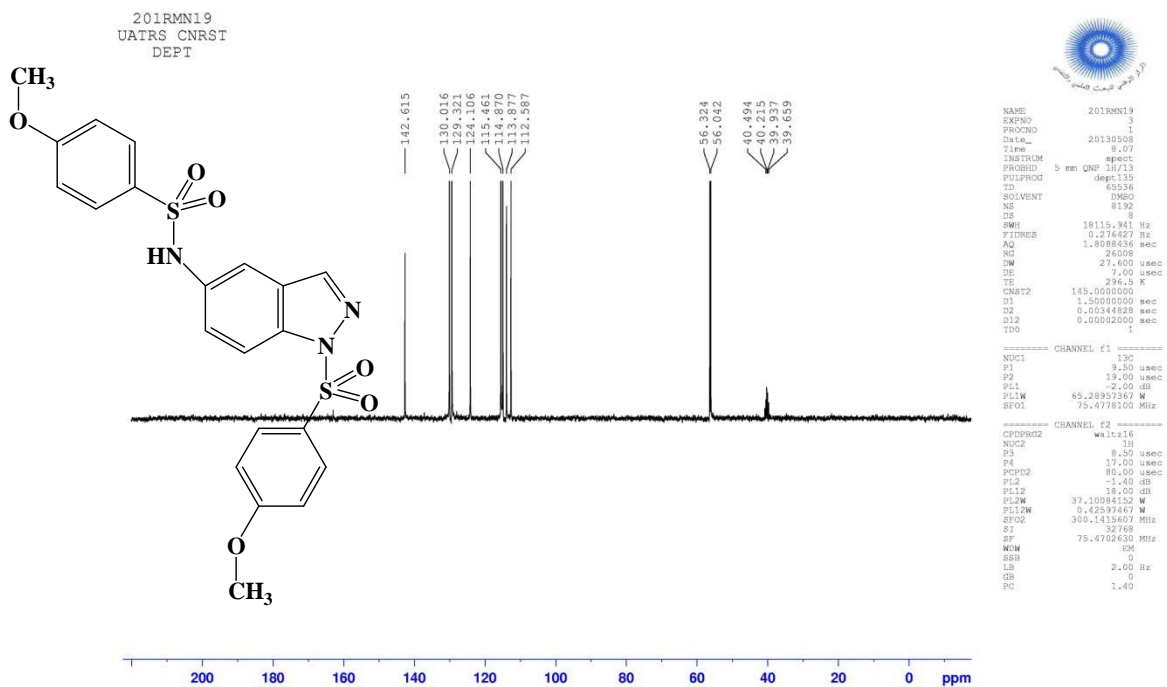


Figure 4 : Spectre RMN¹³C (DEPT) du composé 13

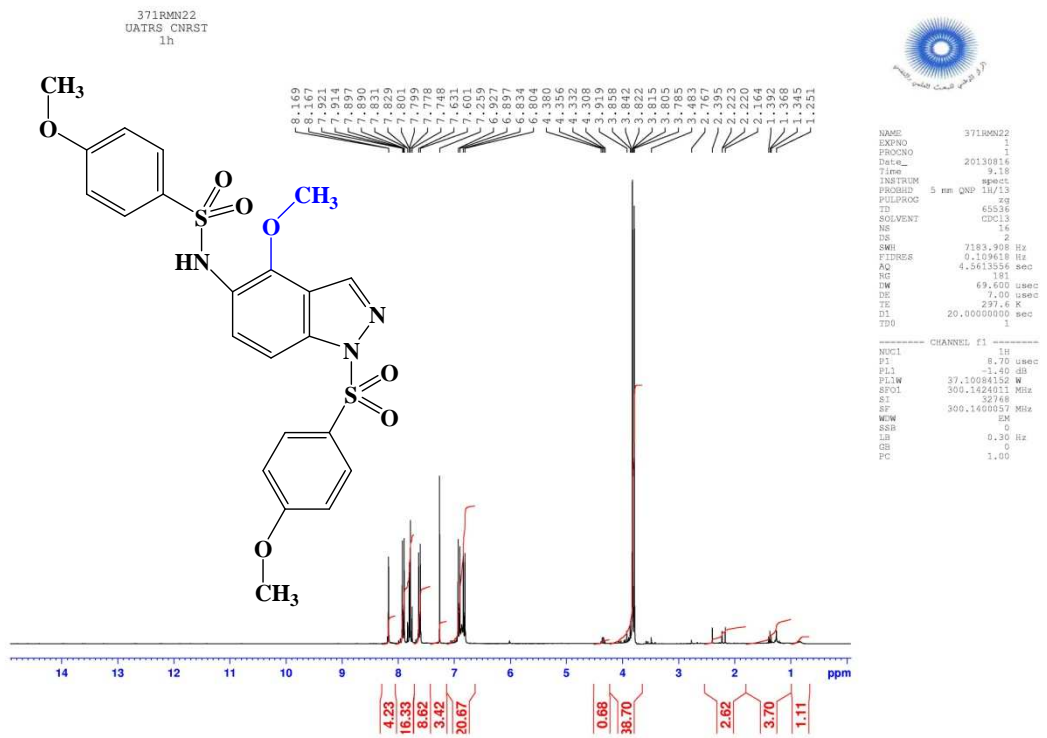


Figure 5 : Spectre RMN¹H du composé 14a

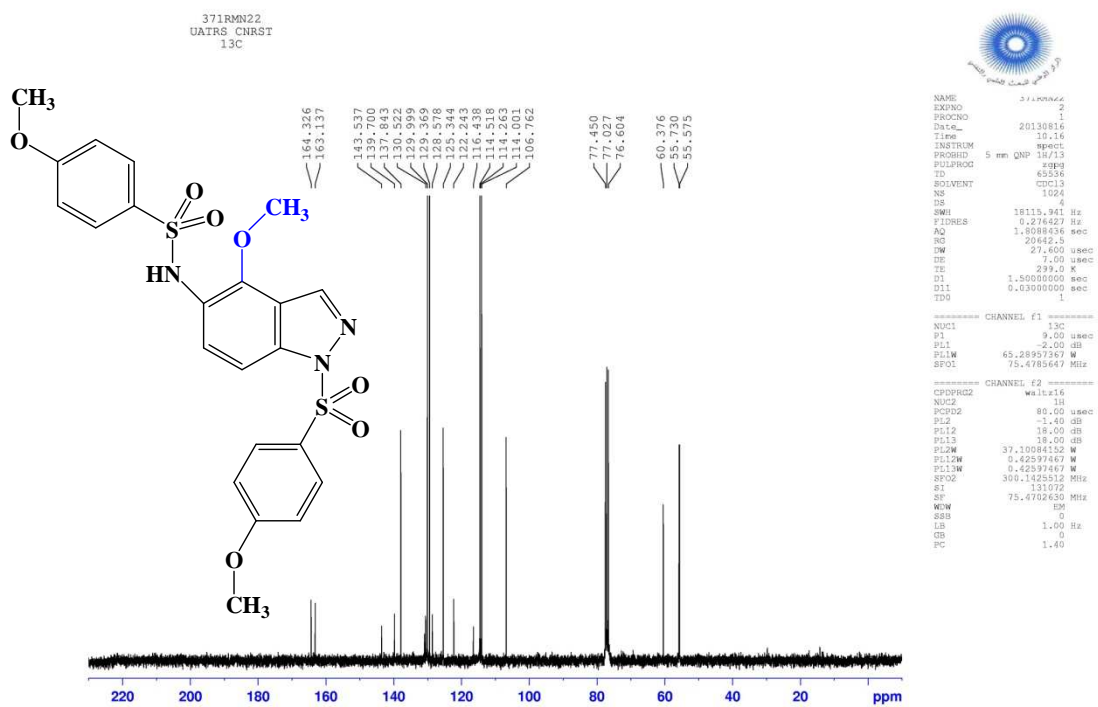


Figure 5 : Spectre RMN¹³C du composé 14a

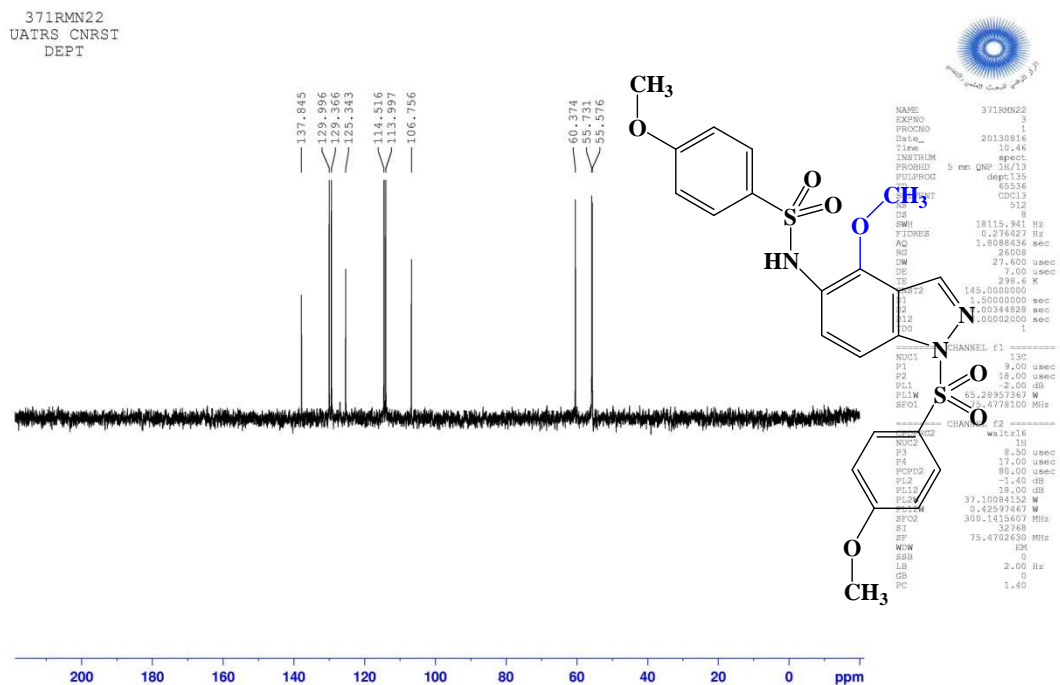


Figure 5 : Spectre RMN¹³C (DEPT) du composé 14a

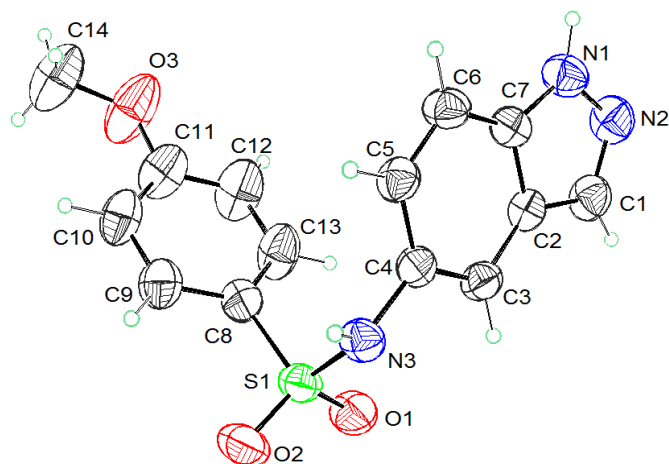
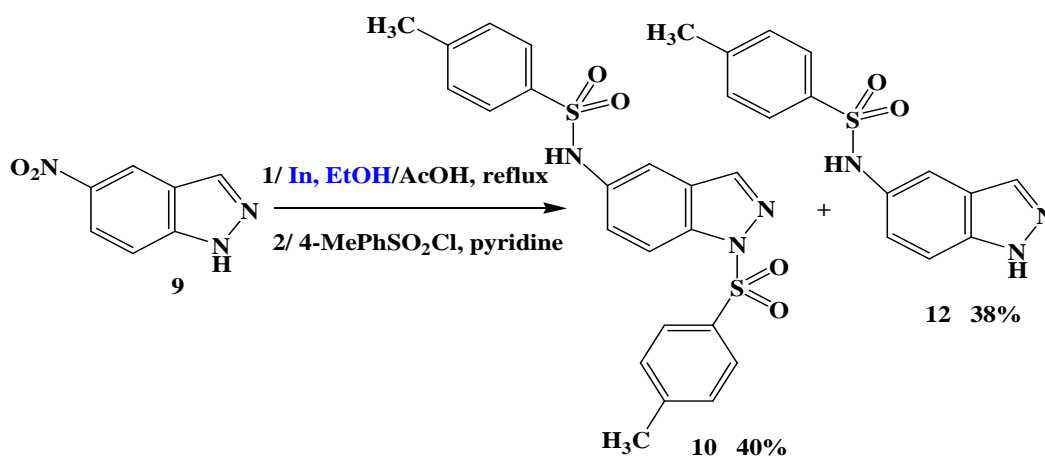


Figure 6 : Représentation ORTEP de la structure du composé **15** [11]

II-3 Etude de l'effet du catalyseur sur la réaction de réduction

Pour étudier l'effet du catalyseur sur la réaction de réduction du nitroindazole, nous avons testé la réaction de réduction du 5-nitro-1*H*-indazole **9** en présence de l'indium comme catalyseur. Cette réaction de réduction réalisée selon le mode opératoire décrit par Byeong et coll. [12] à reflux de l'éthanol en présence de quelques gouttes de l'acide acétique suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure de 4-méthylbenzènesulfonamide dans la pyridine n'a permis d'obtenir que les sulfonamides non substitués **10** et **12** avec des rendements proportionnels (Schéma 7). L'indazole substitué par un groupement éthoxy n'a pas été identifié.



11. H. Chicha, E. M. Rakib, L. Bouissane, M. Saadi, L. El Ammari, *Acta. Cryst.* **2013**, E69, 1702

12. K. Jaheo, K. Jihye, L. Hyunseung, M. L. Byung, H. K. Byeong, *Tetrahedron*, **2011**, 67, 8027-8033.

Ce résultat montre que le choix du catalyseur est fondamental pour l'obtention des sulfonamides indazoliques substitués par un groupement alkoxy sur l'homocycle benzénique de l'indazole. L'alcool utilisé comme solvant dans la réaction de réduction de 5-nitroindazole réagit en présence de l'acide de Lewis SnCl₂ comme nucléophile et conduit à la fixation du groupement alkoxy en position 4 de l'indazole.

III. Synthèse des *N*-(alkyl-indazol-5-yl)-arylsulfonamides

Pour étudier l'effet que peut avoir la protection de N1 et/ou N2 de l'indazole sur l'orientation de la réaction de réduction vers l'obtention des produits substitués par le groupement éthoxy, nous avons appliqué les mêmes conditions opératoires mises au point précédemment aux dérivés *N*-alkylés du 5-nitro-indazole. Nous présentons tout d'abord dans le paragraphe suivant les résultats expérimentaux de la synthèse des dérivés *N*-alkylés de 5-nitroindazole engagé dans les réactions de réduction catalytique par SnCl₂.

III-1 Préparation des dérivés *N*-alkylés de 5-nitroindazole

Pour l'alkylation de 5-nitroindazole **9**, nous avons opté pour l'alkylation dans les conditions de la catalyse par transfert de phase solide-liquide. L'alkylation par différents agents alkylants (iodométhane, iodoéthane et bromure de propargyle) dans le tétrahydrofurane (THF) en présence de carbonate de césium à une température de 0°C conduit à un mélange de deux isomères **16-18** et **19-21** (Schéma 8). Les deux produits *N*-alkylés sont obtenus avec des proportions variables, une sélectivité meilleure a été observée en faveur de l'isomère *N*-1 alkylé **16-18**. Le rendement global des deux isomères est excellent (Tableau 3).

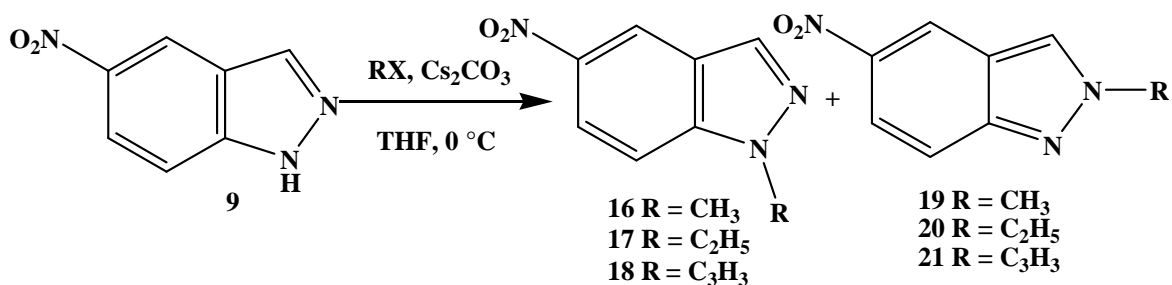


Schéma 8

Les structures des *N*-alkyl-5-nitroindazoles ont été identifiées grâce à la RMN¹H, RMN¹³C et DEPT.

Les structures des deux isomères **16-18** et **19-21** pourront être différenciées par le dépouillement du déplacement chimique du carbone primaire CH-3 de l'indazole. Dans le

spectre RMN¹³C (DEPT) des composés 1-alkyl-5-nitroindazoles **16-18**, les déplacements chimiques des CH-3 apparaissent à δ 135.4-136.3 ppm alors que les déplacements chimiques de CH-3 pour 2-alkyl-5-nitroindazoles **19-21** apparaissent à δ 125,8-127,7 ppm.

Nous rapportons dans les figures 7 et 8, les spectres RMN¹H, RMN¹³C et DEPT des deux isomères *N*-alkylés **17** et **20**.

Tableau 3 : Etude de la réaction d'alkylation du 5-nitroindazole

Agent alkylant	Rdt N-1 alkylé	Rdt N-2 alkylé	Rendement global
CH ₃ I	16 (58%)	19 (40%)	98%
CH ₃ CH ₂ I	17 (60%)	20 (34%)	94%
HC≡C-CH ₂ -Br	18 (70%)	21 (30%)	100%

Condition : THF/Cs₂CO₃, 0°C

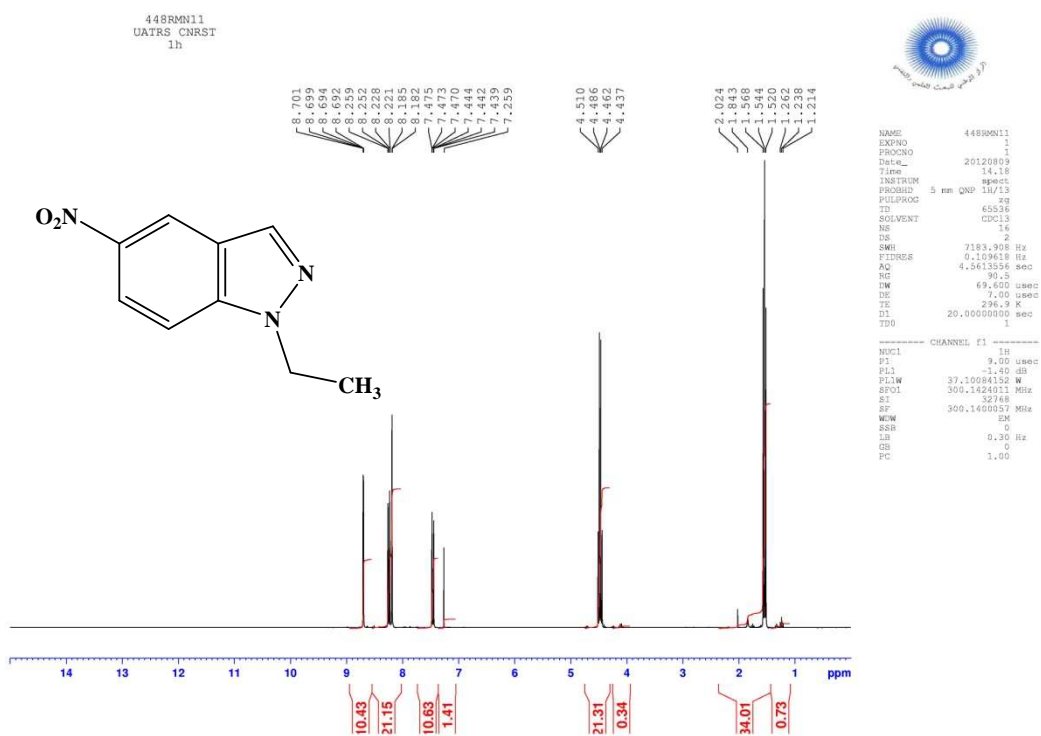


Figure 7 : Spectre RMN¹H du composé **17**

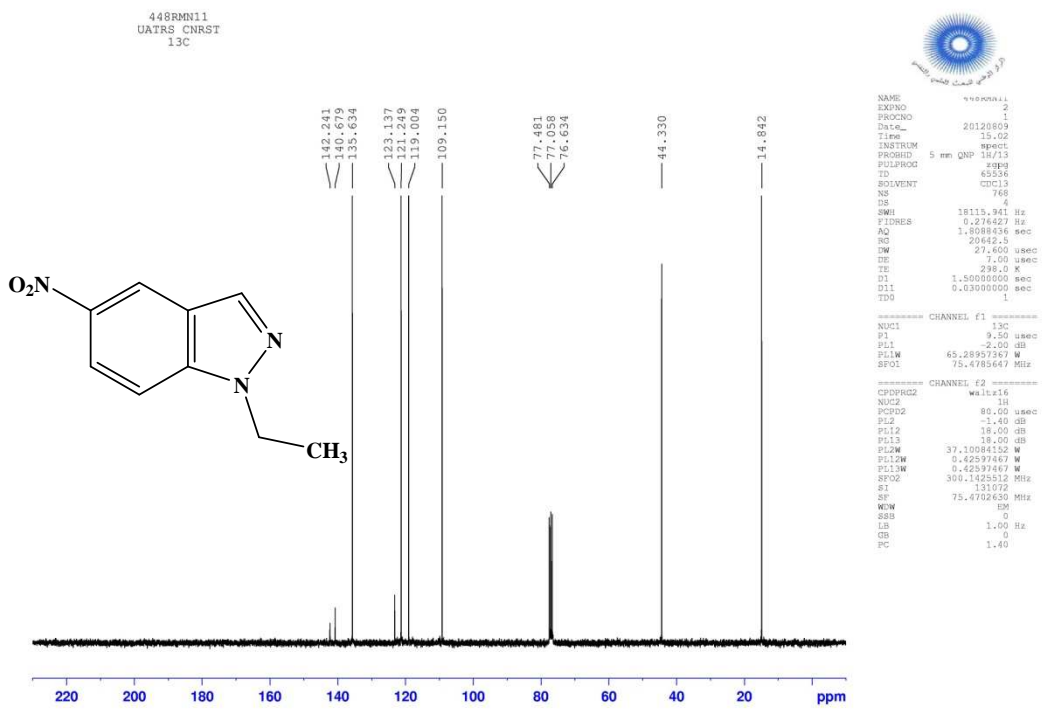


Figure 7 : Spectre RMN¹³C du composé 17

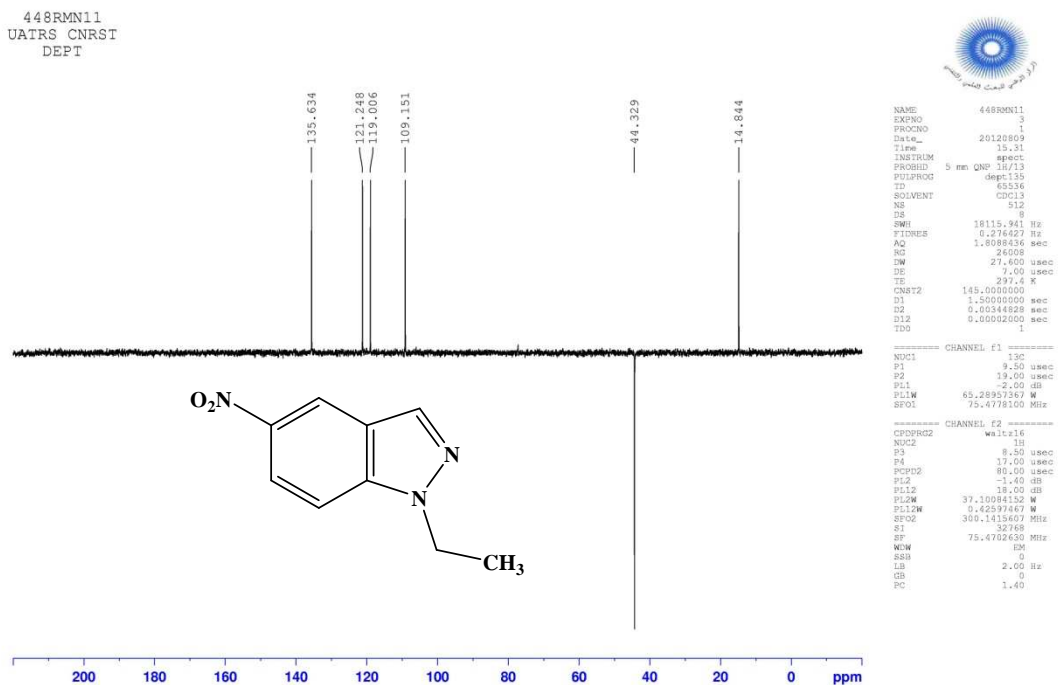


Figure 7 : Spectre RMN¹³C (DEPT) du composé 17

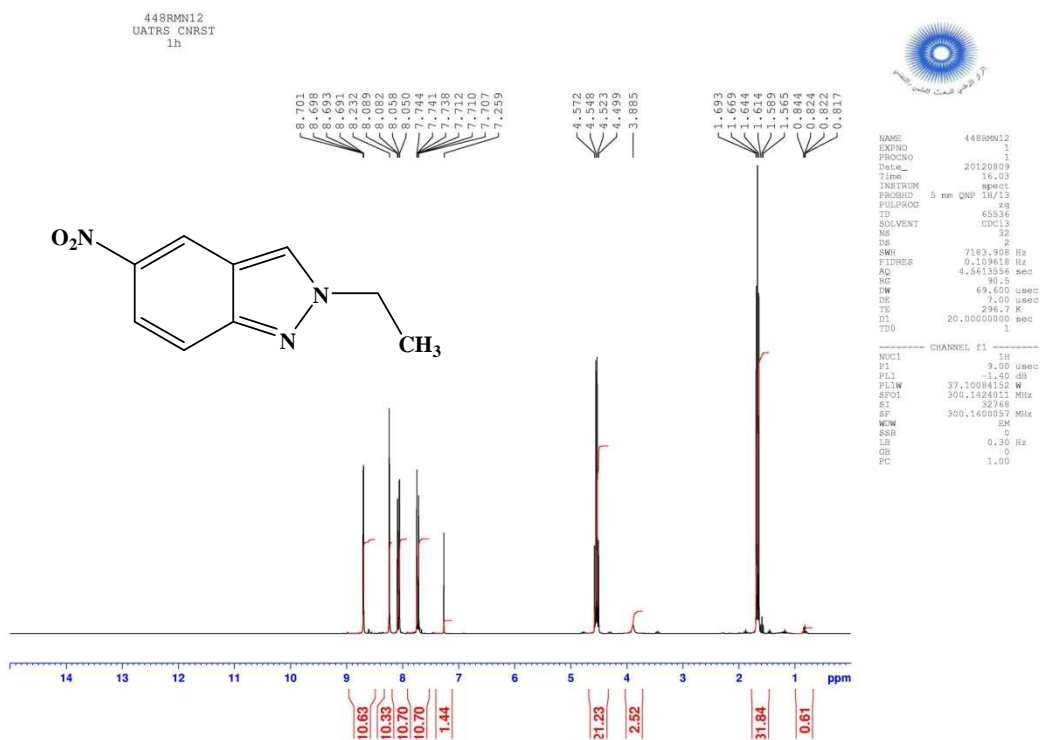


Figure 8 : Spectre RMN¹H du composé 20

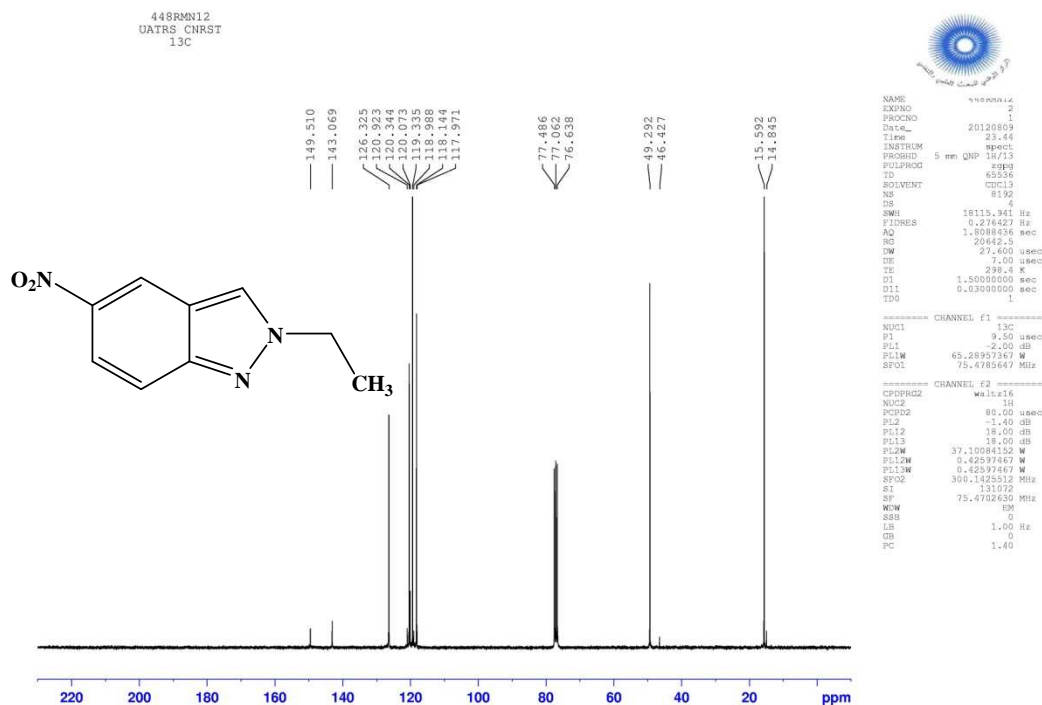


Figure 8 : Spectre RMN¹³C du composé 20

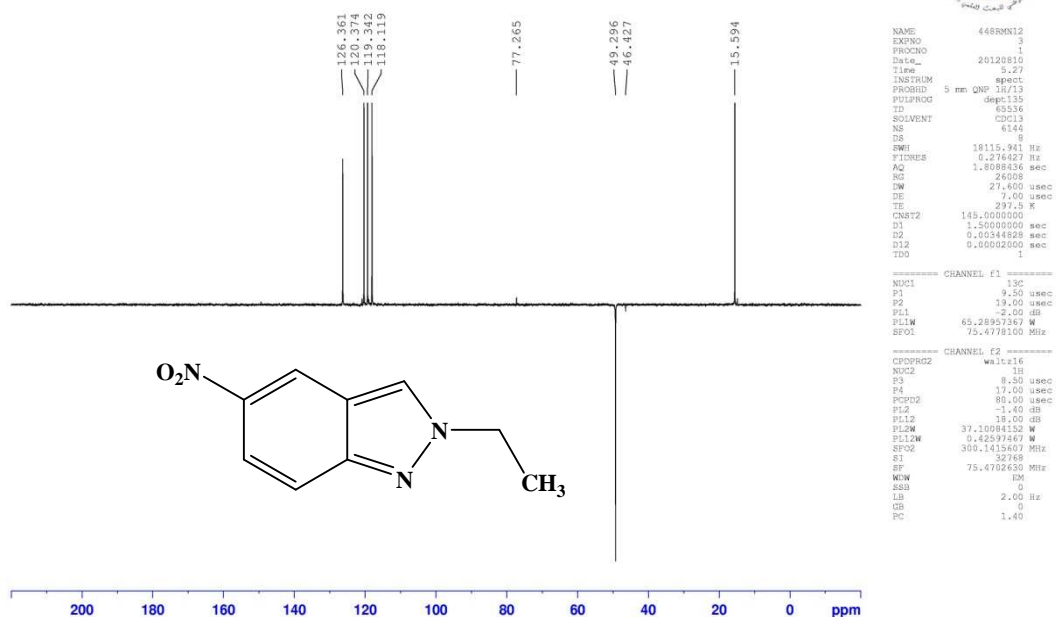
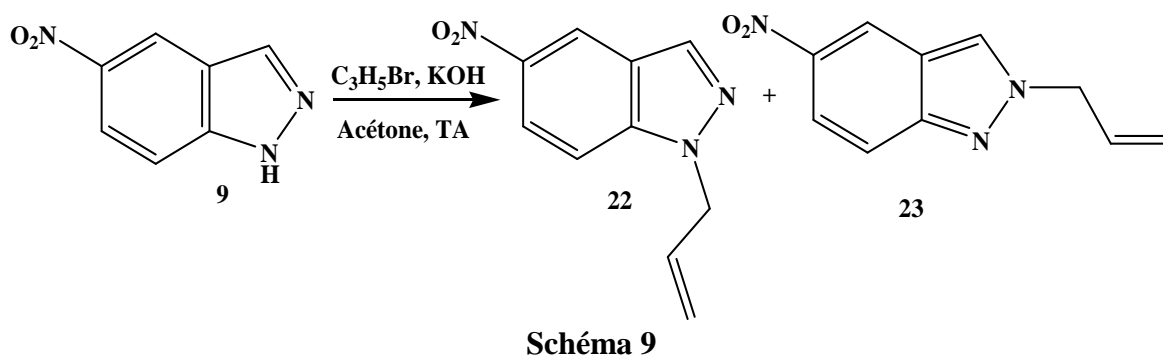


Figure 8 : Spectre RMN¹³C (DEPT) du composé **20**

Pour élargir cette étude, nous avons envisagé aussi l'alkylation du 5-nitroindazole avec le bromure d'allyle dans l'acétone en présence d'hydroxyde de potassium à température ambiante (Schéma 9). Une meilleure sélectivité est observée aussi en faveur de l'isomère N-1 alkylé.



Les structures des dérivés *N*-alkylés **22** et **23** sont confirmées par des données spectrales RMN ¹H, RMN¹³C et DEPT.

III-2 Préparation des *N*-(alkyl-indazol-5-yl)-arylsulfonamides

Dans le but d'orienter la réaction de réduction vers la synthèse des sulfonamides fonctionnalisés en position 4 par un groupement alkoxy, deux facteurs ont été étudiés:

- Effet de l'agent alkylant en position 1 de l'indazole
- Effet de l'agent alkylant en position 2 de l'indazole

III-2-1 Effet de l'agent alkylant en position 1 de l'indazole sur la réaction de réduction de 5-nitroindazole

Pour étudier l'effet que peut avoir la protection de l'azote pyrazolique de l'indazole sur l'orientation de la réaction de réduction vers l'obtention des produits substitués par le groupement éthoxy, dans un premier temps, nous avons appliqué les mêmes conditions opératoires mises au point précédemment aux dérivés *N*-alkylés en position 1 du 5-nitroindazole **16** et **22** (Schéma 10). Trois produits ont été identifiés: le sulfonamide substitué par le groupement éthoxy **25a-d**, le sulfonamide non substitué **26a-d** et le sulfonamide indazolique substitué par un atome de chlore en position 4 de l'indazole **24a-d** observé pour la première fois dans cette série de 5-nitroindazole. Une sélectivité importante a été observée en faveur du sulfonamide non substitué (Tableau 4). Ces résultats montrent que la protection de la position N1 de l'indazole favorise la réaction de réduction vers la synthèse des sulfonamides indazoliques non substitués.

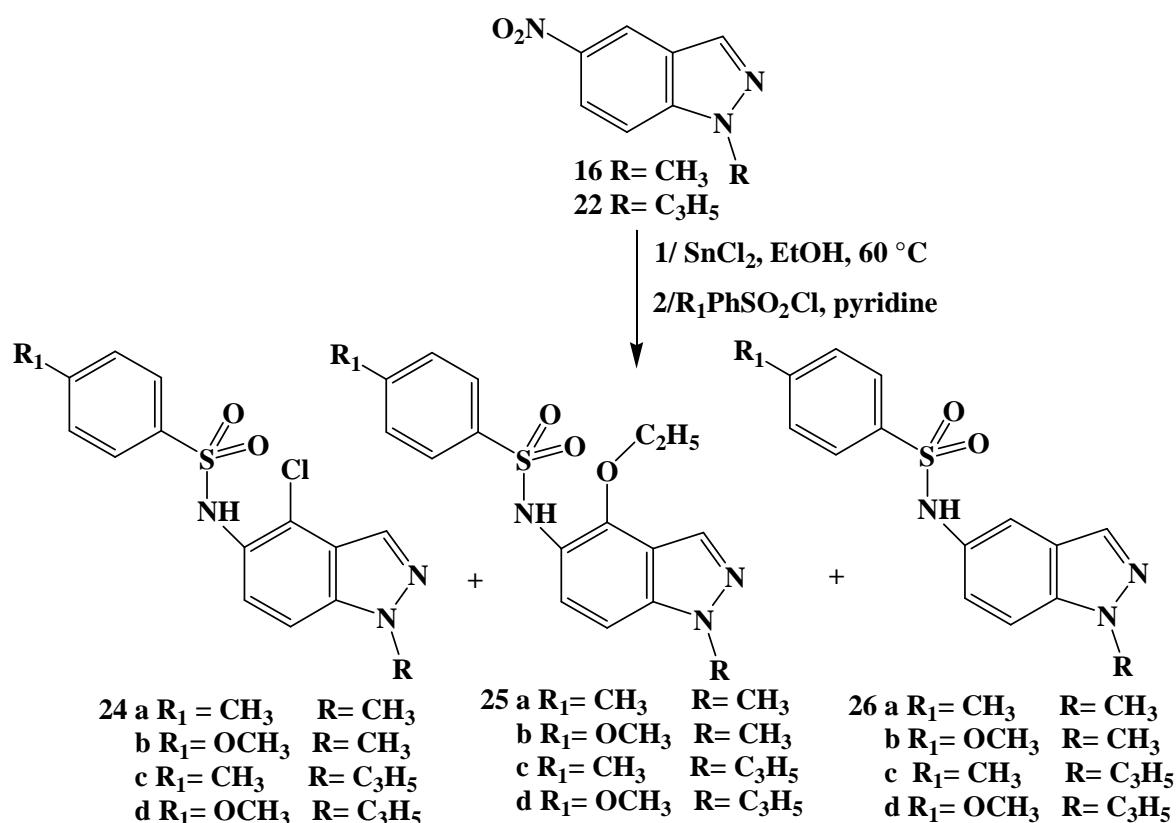


Schéma 10

Les structures des composés **24a-d**, **25a-d** et **26a-d** ont été établies sur la base des données spectrales RMN¹H, RMN¹³C et DEPT. Dans la figure 9, nous présentons un exemple de spectres RMN¹H, RMN¹³C et DEPT du composé **24c**. Les structures des sulfonamides **26a-d** ont été confirmées par diffraction cristallographique rayons X (Figures 10-13).

Tableau 4 : Réaction de réduction du 1-alkyl-5-nitroindazole suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'arylsulfonyle

R ₁ et R	Rdt 24a-d	Rdt 25a-d	Rdt 26a-d
a R ₁ = CH ₃ , R = CH ₃	24a (18%)	25a (35%)	26a 66%
b R ₁ = OCH ₃ , R = CH ₃	24b (15%)	25b (28%)	26b 65%
c R ₁ = CH ₃ , R = C ₃ H ₅	24c (20%)	25c (30%)	26c 64%
d R ₁ = OCH ₃ , R = C ₃ H ₅	24d (16%)	25d (32%)	26d (70%)

Condition : a : EtOH/SnCl₂, 60°C; b : 4-R₁PhSO₂Cl/pyridine

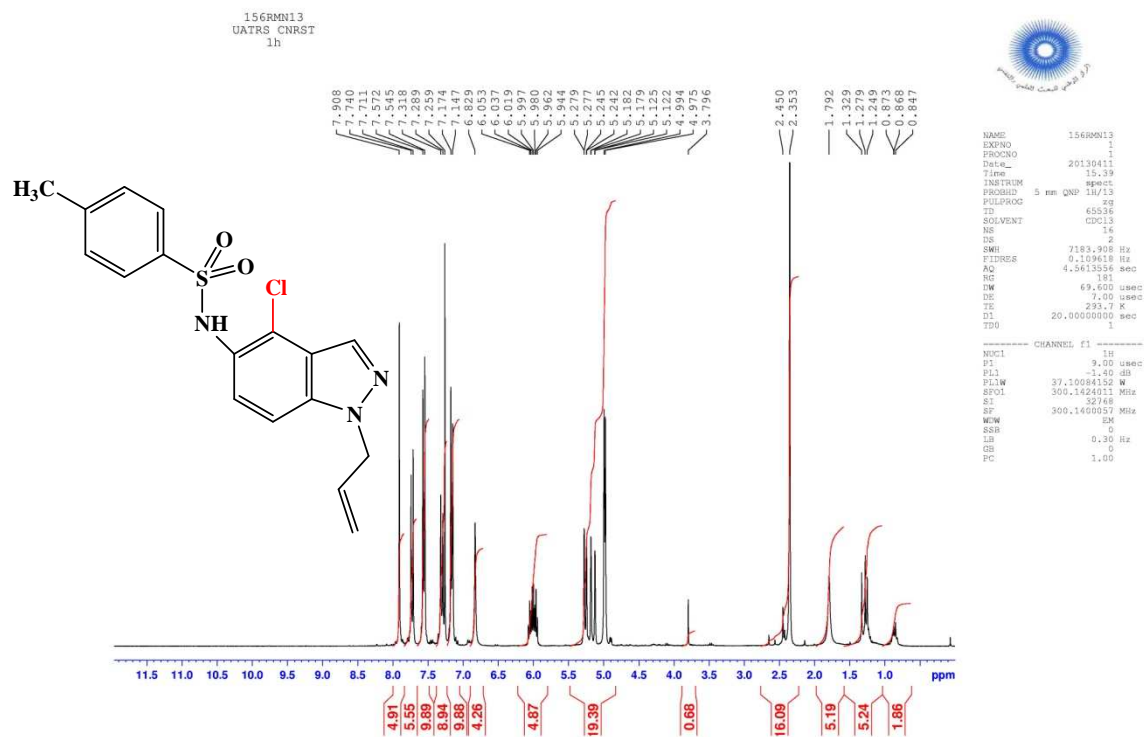


Figure 9 : Spectre RMN¹H du composé 24c

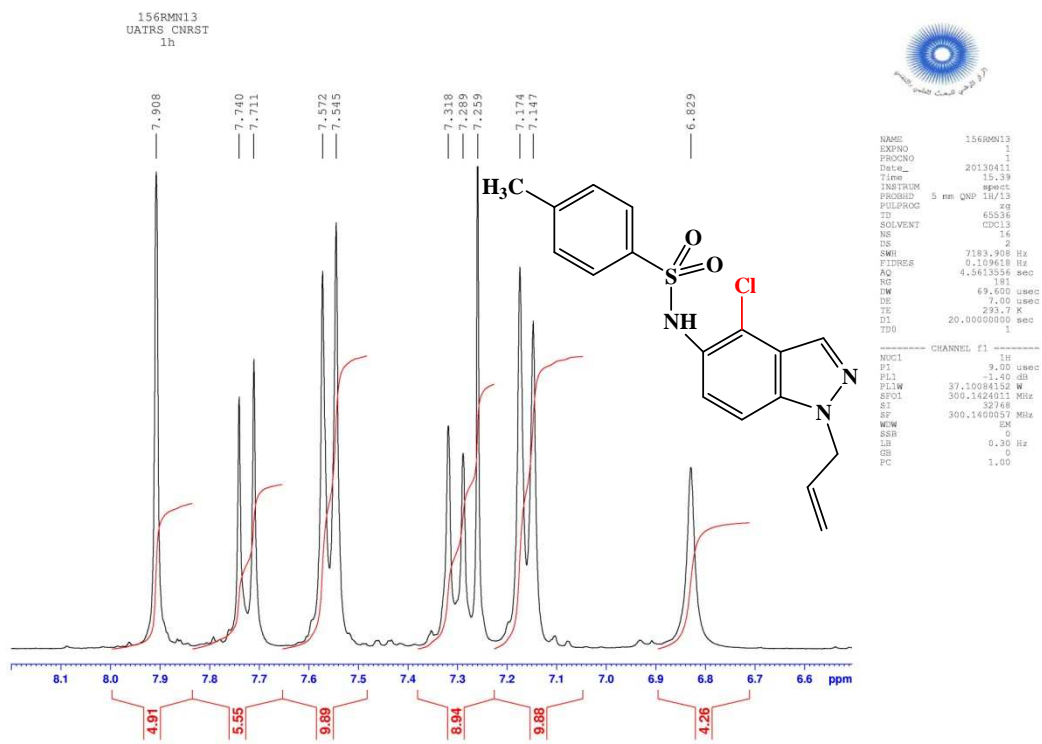


Figure 9 : Spectre RMN¹H étalé de la zone aromatique du composé 24c

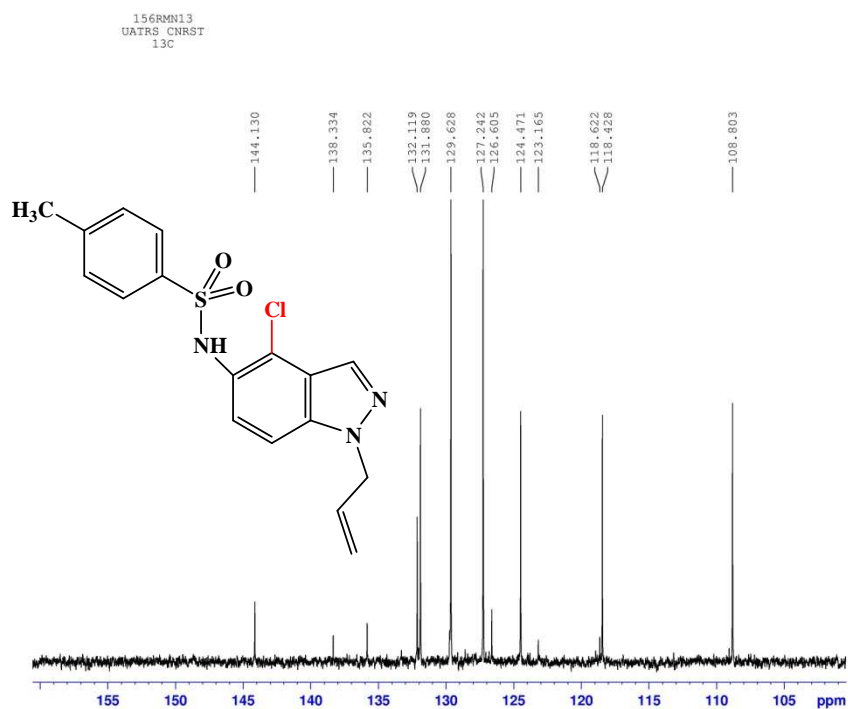


Figure 9 : Spectre RMN¹³C du composé 24c

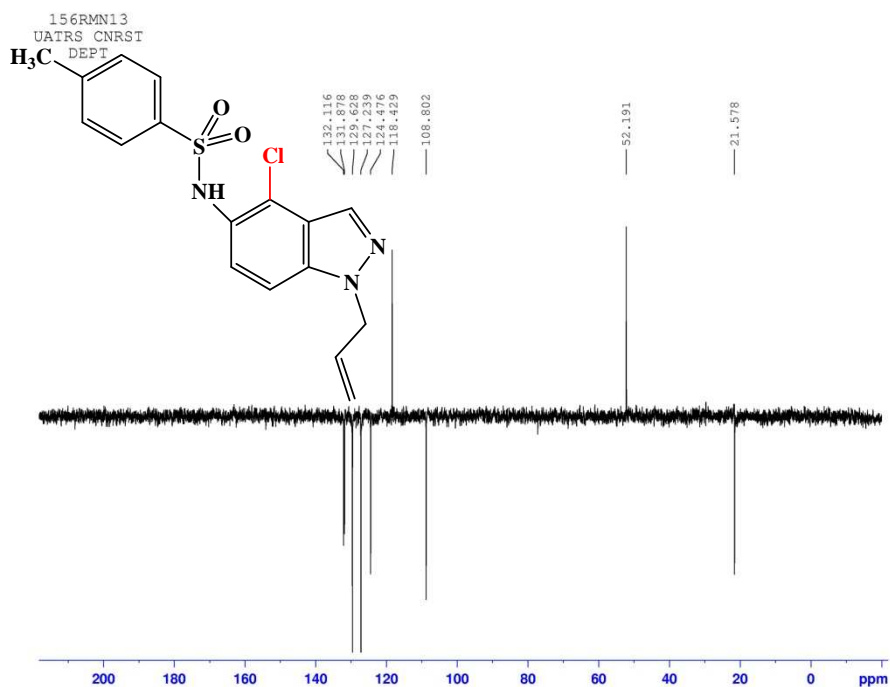


Figure 9 : Spectre RMN¹³C (DEPT) du composé 24c

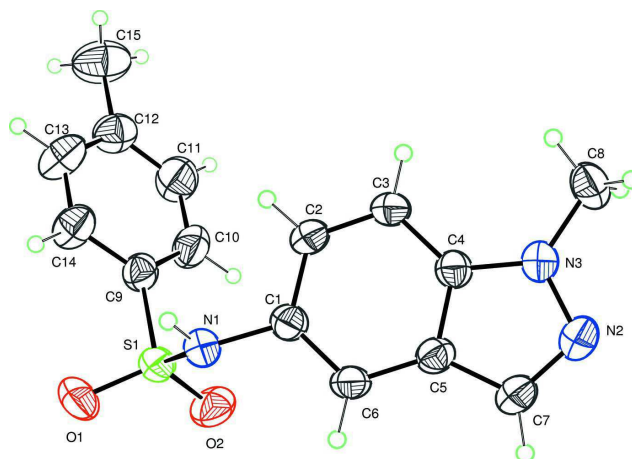


Figure 10 : Représentation ORTEP du composé **26a** [13]

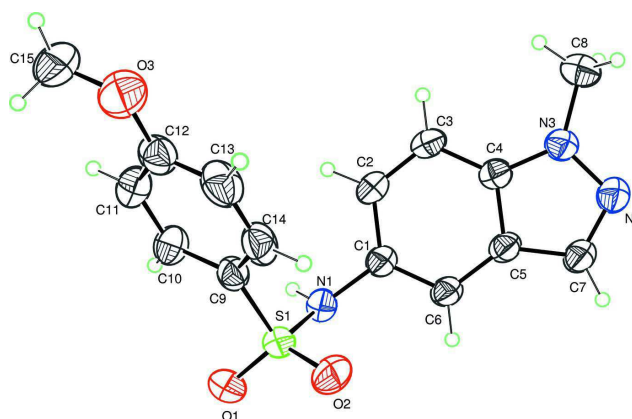


Figure 11 : Représentation ORTEP du composé **26b** [14]

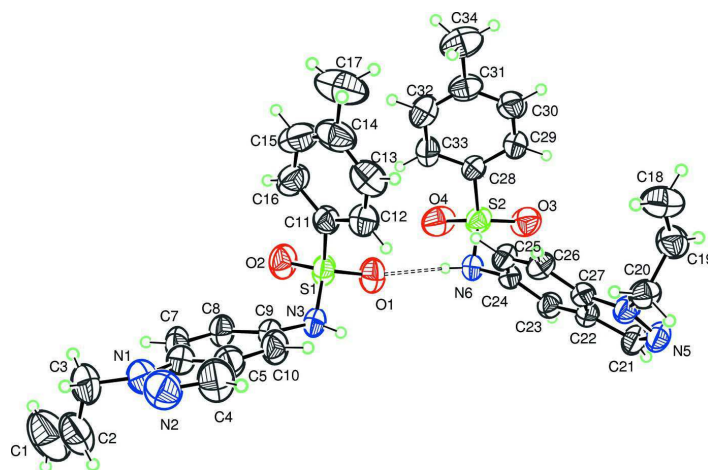


Figure 12 : Représentation ORTEP du composé **26c** [15]

13. H. Chicha, B. Oulemda, E. M. Rakib, M. Saadi, L. El Ammari. *Acta Cryst.* **2013**, E69, 1471.
 14. H. Chicha, E. M. Rakib, D. Geffken, M. Saadi, L. El Ammari. *Acta Cryst.* **2013**, E69, 1398.
 15. H. Chicha, E. M. Rakib, H. Abderrafia, M. Saadi, L. El Ammari. *Acta Cryst.* **2013**, E69, 1847.

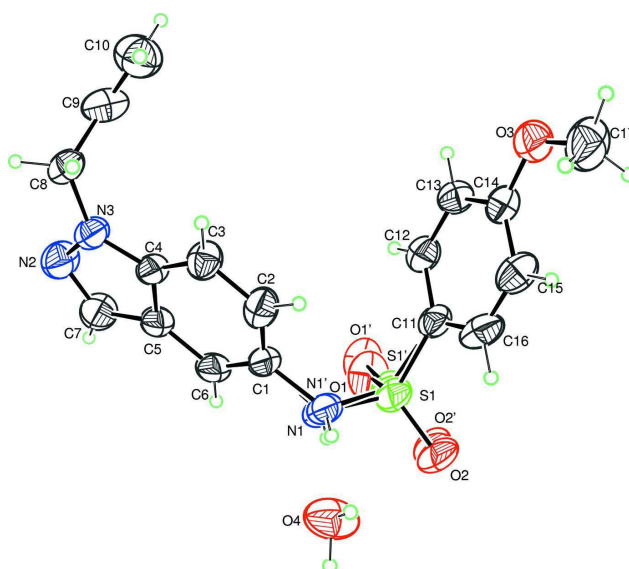


Figure 13 : Représentation ORTEP du composé **26d** [16]

La fixation de l'atome de chlore en position 4 de l'indazole pour les composés **24a-d** peut être expliquée par la libération d'un ion de chlore négatif à partir du mélange $\text{SnCl}_2/\text{EtOH}$ qui réagit en tant que nucléophile suite à la réduction du 5-nitroindazole.

III-2-2 Effet de l'agent alkylant en position 2 de l'indazole sur la réaction de réduction du 5-nitroindazole

Contrairement à ce qui a été observé pour les dérivés *N*-alkylés en position 1 où la réduction conduit à un mélange de trois produits avec des rendements modérés pour les sulfonamides substitués par un groupement éthoxy et un atome de chlore en position 4 de l'indazole, la réaction de réduction des 2-alkyl-5-nitroindazoles **19** et **23** suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'arylesulfonyl favorise seulement la synthèse des deux sulfonamides substitués respectivement par un groupe éthoxy et un atome de chlore avec des meilleurs rendements (Schéma 11). Une sélectivité importante a été observée en faveur du sulfonamide substitué par un groupement éthoxy (Tableau 5).

16. H. Chicha, E. M. Rakib, D. Geffken, M. Saadi, L. El Ammari. *Acta Cryst.* **2013**, E69, 1589.

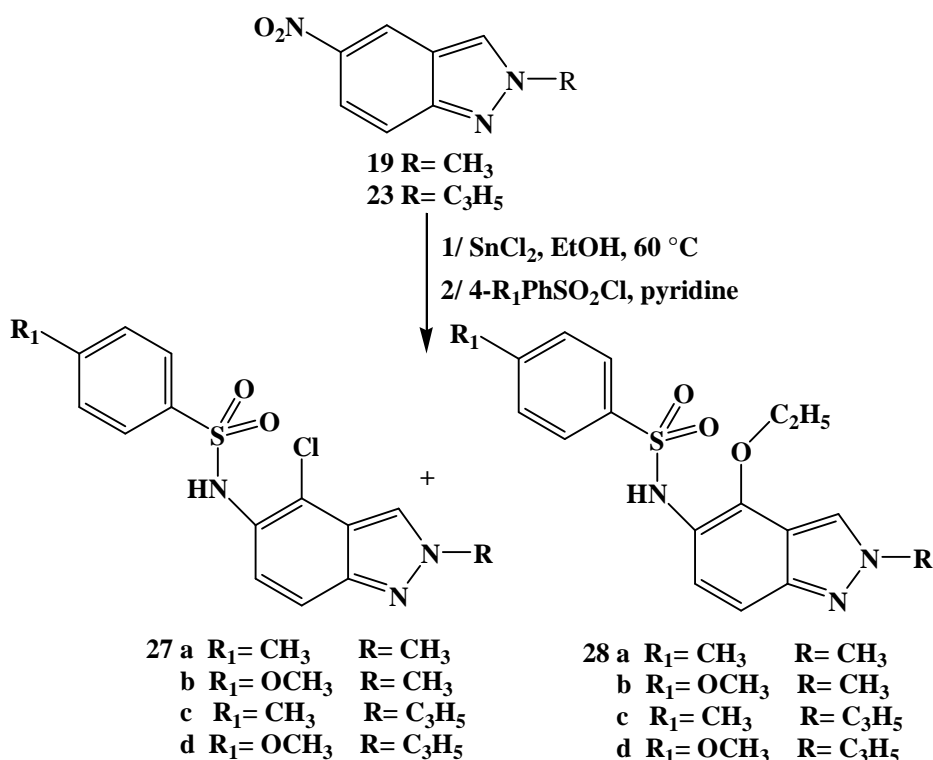


Schéma 11

Les structures des composés **27a-d** et **28a-d** ont été établies sur la base des données spectrales RMN¹H, RMN¹³C et DEPT.

Les structures des composés **27a**, **27d**, **28a** et **28c** ont été confirmées par une étude cristallographique qui a mis en évidence la présence d'un atome de chlore en position 4 de l'indazole pour les molécules **27a** et **27d** (Figures 14 et 16) et un groupement éthoxy en position 4 de l'indazole pour les molécules **28a** et **28c** (Figure 15 et 17).

Tableau 5 : Réaction de réduction du 2-alkyl-5-nitroindazole suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'arylsulfonyle

R ₁ et R	Rdt 27a-d	Rdt 28a-d	Rdt global
a R ₁ = CH ₃ , R = CH ₃	27a (27%)	28a (72%)	99%
b R ₁ = OCH ₃ , R = CH ₃	27b (20%)	28b (78%)	98%
c R ₁ = CH ₃ , R = C ₃ H ₅	27c (21%)	28c (79%)	100%
d R ₁ = OCH ₃ , R = C ₃ H ₅	27d (30%)	28d (68%)	98%

Condition : a : EtOH/SnCl₂, 60°C; b : 4-R₁PhSO₂Cl/pyridine

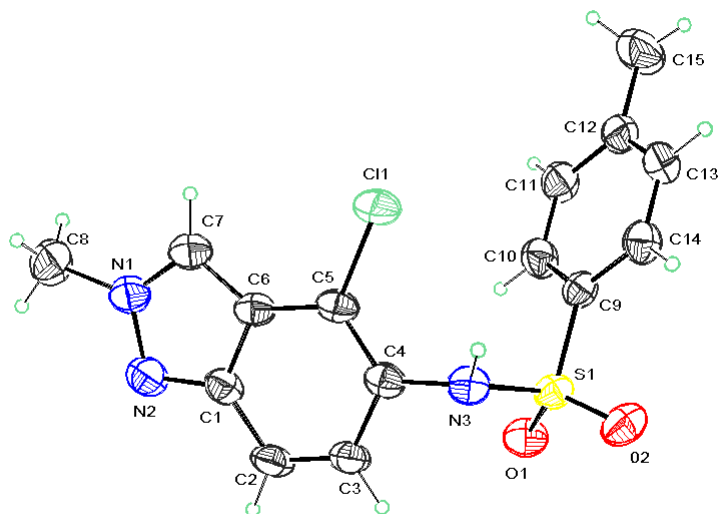


Figure 14 : Représentation ORTEP du composé **27a**

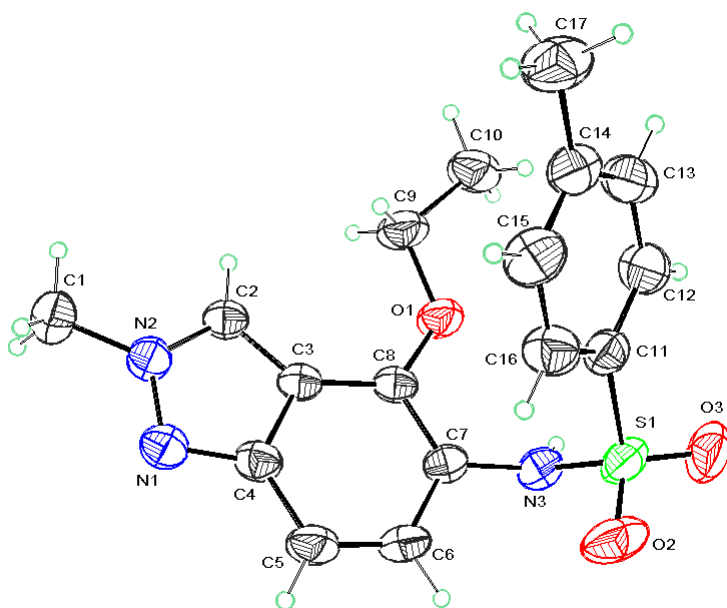


Figure 15 : Représentation ORTEP du composé **28a**

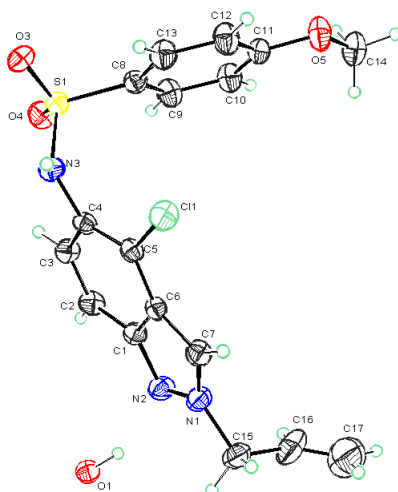


Figure 16 : Représentation ORTEP du composé **27d** [17]

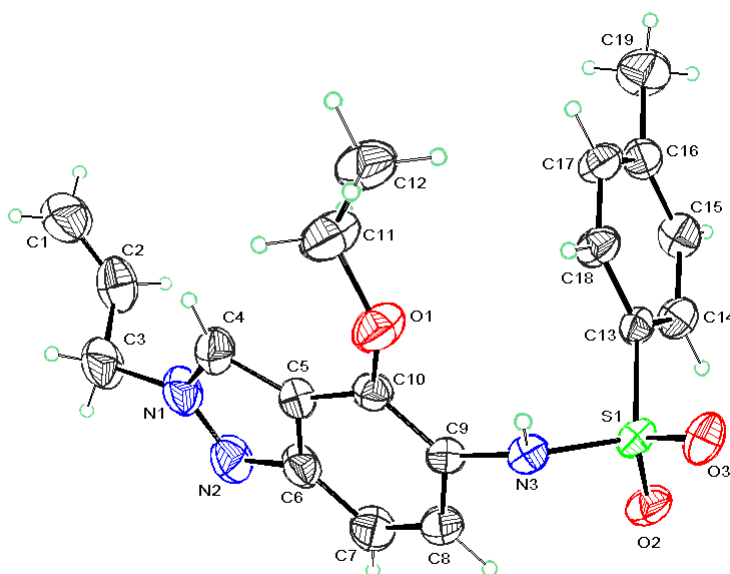


Figure 17 : Représentation ORTEP du composé **28c** [18]

Ces résultats de l'étude cristallographique montrent bien la fixation du groupement éthyloxy ou l'atome de chlore en position 4 de l'indazole suite à la réduction des 2-alkyl-5-nitroindazoles par SnCl_2 dans l'éthanol.

17. H. Chicha, A. Kouakou, E. M. Rakib, M. Saadi, L. El Ammari. *Acta. Cryst.* **2013**, E69, 1353.

18. H. Chicha, E. M. Rakib, L. Bouissane, M. Viale, M. Saadi, L. El Ammari. *Acta. Cryst.* **2014**, E70, 624

IV. Synthèse des *N*-(3-chloro-1*H*-indazol-5-yl)-arylsulfonamides

Pour étudier l'effet que peut avoir l'atome d'halogène en position 3 de l'indazole sur l'orientation de la réaction de réduction de 5-nitroindazole et dans le but d'augmenter le spectre d'activité biologique des sulfonamides synthétisés, nous avons appliqué les mêmes conditions opératoires citées précédemment au 3-chloro-5-nitro-1*H*-indazole **29** obtenu par la chloration du 5-nitroindazole avec le *N*-chlorosuccinimide à reflux de l'acétonitrile. La réaction de réduction du composé **29** suivie de couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'arylsulfonyle, nous a permis d'isoler un mélange de trois produits: le sulfonamide substitué par un atome de chlore en position 4 de l'indazole **30**, le sulfonamide substitué par le groupement éthoxy **31** et le sulfonamide non substitué **32** (Schéma 12). Une sélectivité importante a été observée en faveur du sulfonamide non substitué. La présence de l'atome de chlore en position 3 de l'indazole favorise aussi l'obtention des sulfonamides substitués par un atome de chlore en position 4 de l'indazole. Les rendements des composés **30a-b**, **31a-b** et **32a-b** sont répertoriés dans le tableau 6.

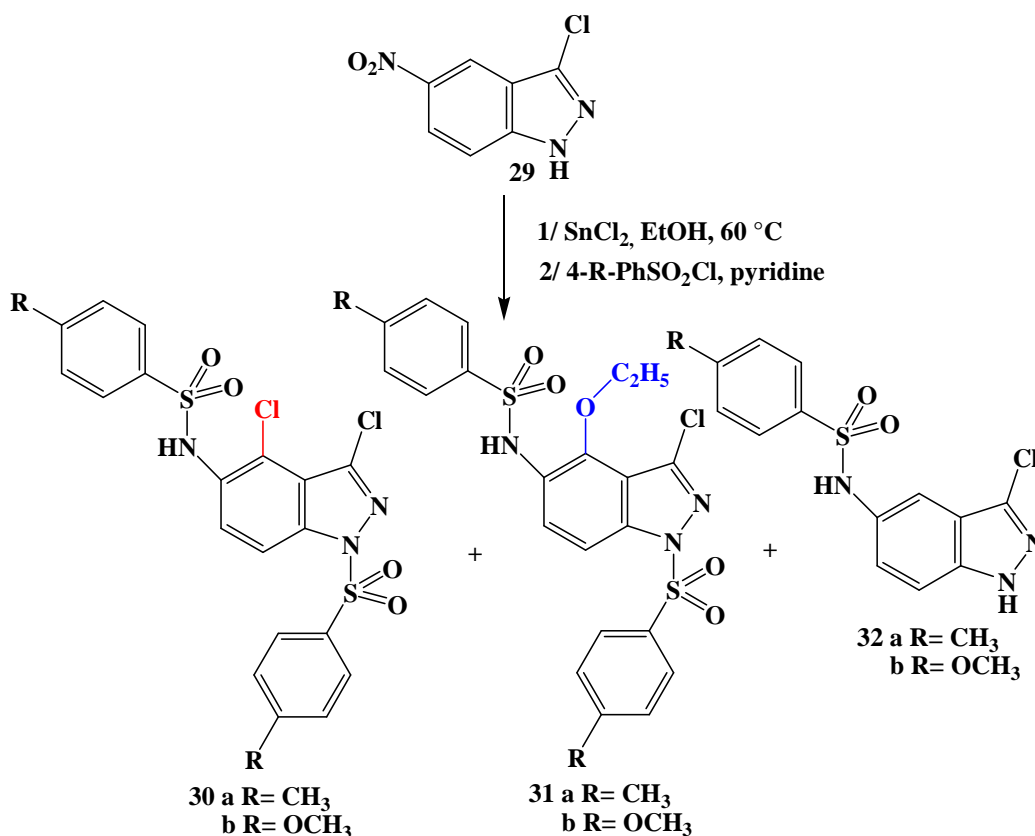


Schéma 12

Les structures des composés **30a-b**, **31a-b** et **32a-b** ont été établies sur la base des données spectrales RMN¹H, RMN¹³C et DEPT. Dans la figure 18, nous présentons un

exemple de spectres RMN¹H, RMN¹³C et DEPT du composé **31a**. La structure de *N*-(3-chloro-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxybenzènesulfonamide **32b** a été confirmée par diffraction des rayons X (Figure 19).

Tableau 6 : Réduction de 3-chloro-5-nitroindazole par SnCl₂ dans l'éthanol suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'aryle sulfonyle.

R	Rdt de 30a-b	Rdt de 31a-b	Rdt de 32a-b
CH ₃	30a (19%)	31a (38%)	32a (42%)
OCH ₃	30b (11%)	31b (22%)	32b (67%)

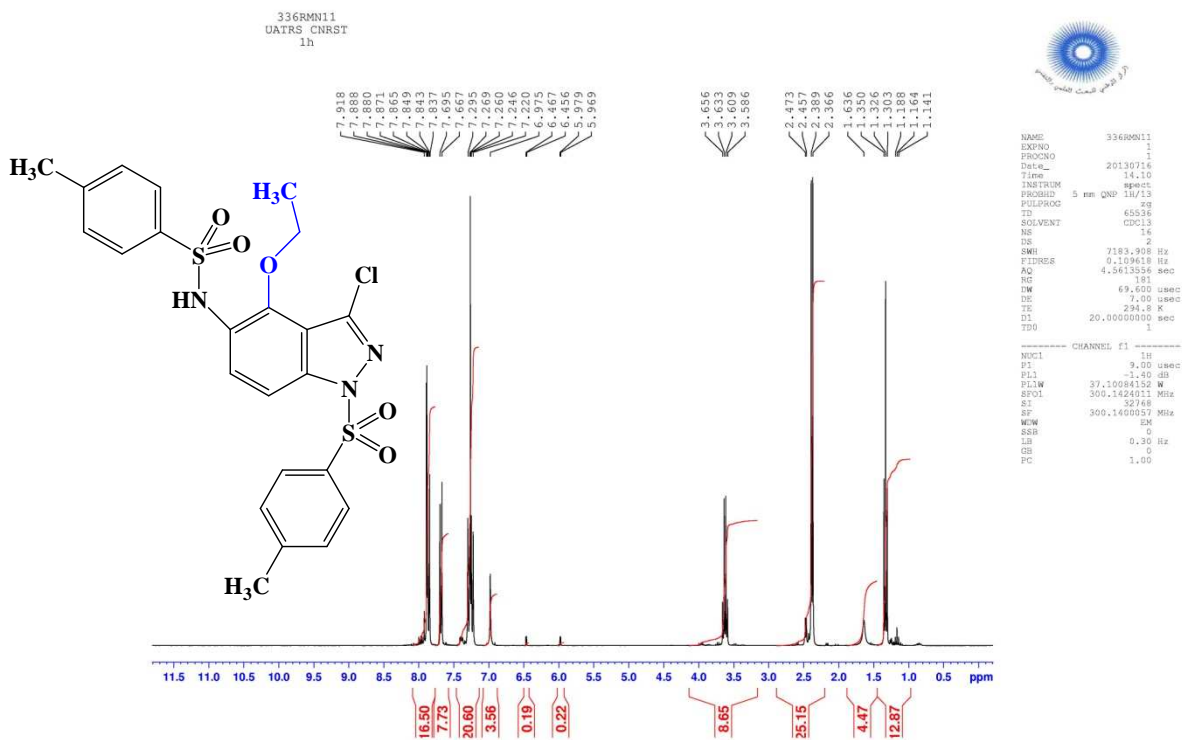


Figure 18 : Spectre RMN¹H du composé **31a**

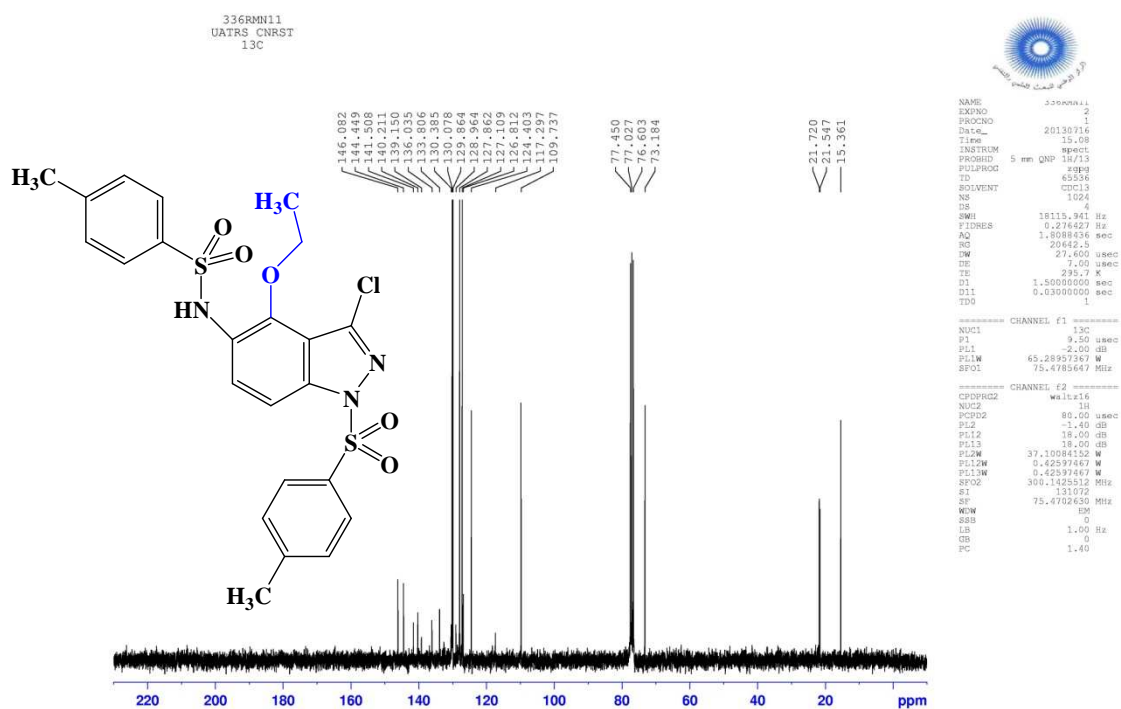


Figure 18 : Spectre RMN¹³C du composé 31a

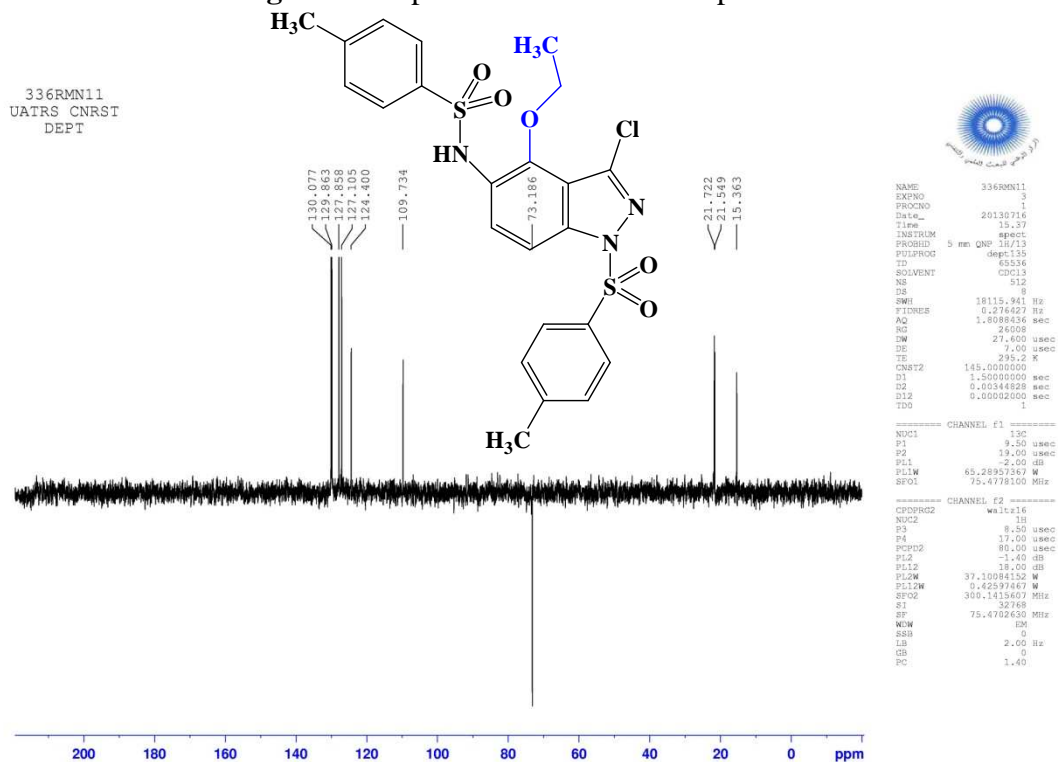


Figure 18 : Spectre RMN¹³C (DEPT) du composé 31a

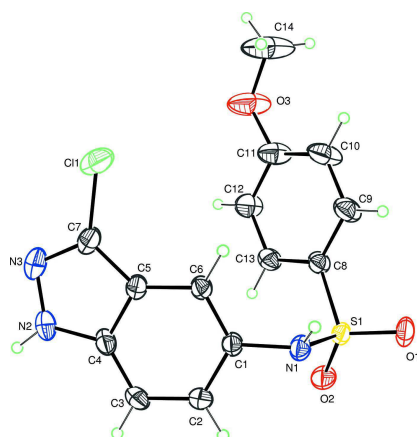


Figure 19 : Représentation ORTEP de la structure du composé **32b** [19]

V. Synthèse des *N*-(1-alkyl-3-chloro-1*H*-indazol-5-yl)arylsulfonamides

Dans ce paragraphe nous avons envisagé l'effet de l'atome de chlore en position 3 de l'indazole et l'effet de la protection de l'azote pyrazolique sur la réduction catalytique de *N*-alkyl-3-chloro-5-nitroindazole par SnCl_2 dans l'éthanol. Les deux isomères *N*-alkylés de l'indazole **33a-b** et **34a-b** sont obtenus par alkylation de 3-chloro-5-nitroindazole **29** avec l'iodure de méthyle et/ou bromure d'allyle dans l'acétone en présence de l'hydroxyde de potassium comme base (Schéma 13). Les rendements des dérivés *N*-1 alkylés de l'indazole **33a-b** sont meilleurs par rapport aux dérivés *N*-2 alkylés **34a-b** (Tableau 7).

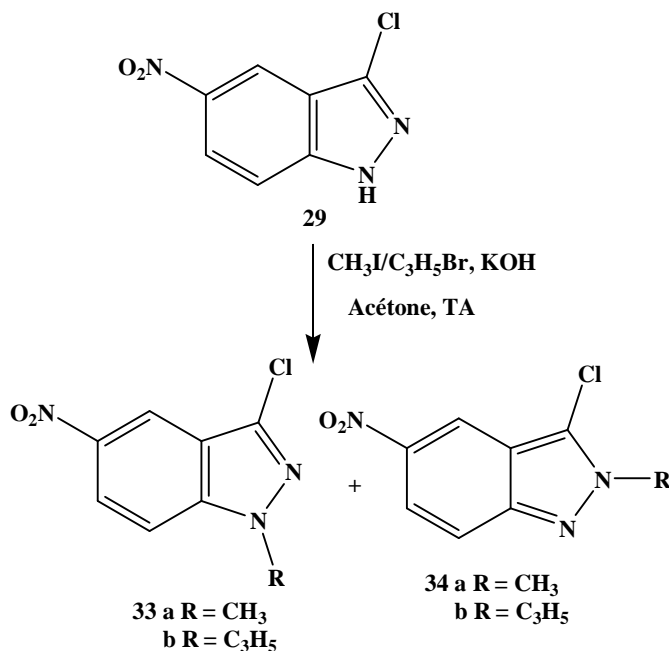


Schéma 13

Les structures des composés obtenus ont été établies sur la base des données spectrales RMN ^1H , RMN ^{13}C et DEPT. En plus des données spectroscopiques, la structure du composé **33b** a été confirmée par diffraction des rayons X (Figure 20).

Tableau 7 : Réaction d'alkylation de 3-chloro-5-nitroindazole.

Alkylant	Rdt de 33a-b	Rdt de 34a-b	Rdt global
CH_3I	33a (77%)	34a (20%)	97%
$\text{C}_3\text{H}_5\text{Br}$	33b (67 %)	34b (18%)	85%

Condition : RX/acétone/KOH, T.A.

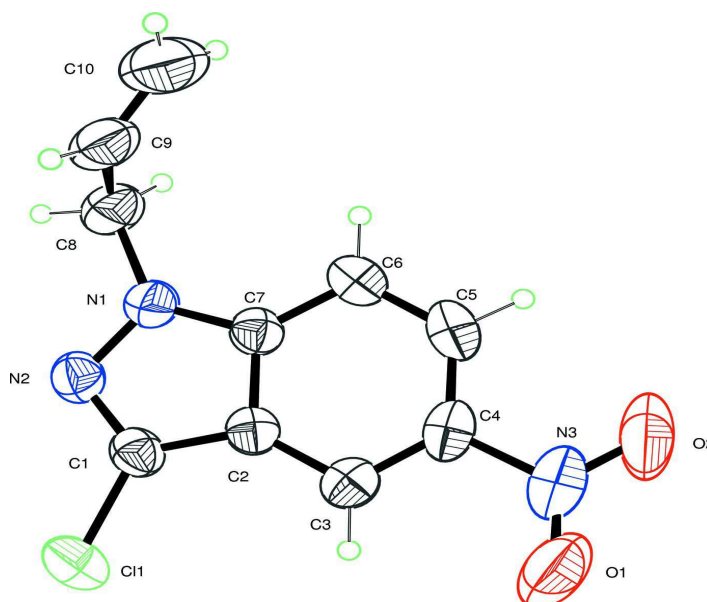


Figure 20 : Représentation ORTEP de la structure du composé **33b** [20]

Après avoir synthétiser les *N*-alkyl-3-chloro-5-nitroindazoles, nous avons ensuite appliqué les mêmes conditions de réduction et de couplage utilisées précédemment sur les 1-alkyl-3-chloro-5-nitroindazoles **33a-b**. Deux produits ont été identifiés : le 5-indazolyl-arylsulfonamide fonctionnalisé en position 4 par un groupement éthoxy **35a-d** et le 5-indazolyl-arylsulfonamide non substitué **36a-d** (Schéma 14). Les rendements des deux produits sont proportionnels avec une légère sélectivité en faveur du sulfonamide indazolique non substitué (Tableau 8). Le sulfonamide substitué par un atome de chlore en position 4 de l'indazole n'a pas été identifié.

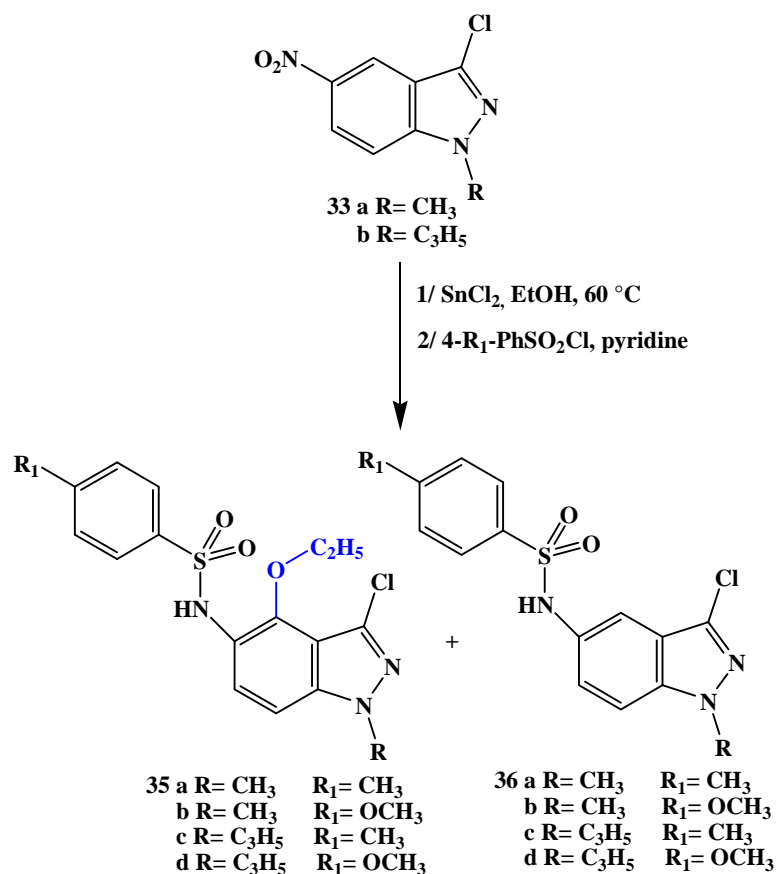


Schéma 14

Tableau 8 : Réaction de réduction du 1-alkyl-3-chloro-5-nitroindazole suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'arylsulfonyle

R ₁ et R	Rdt 35a-d	Rdt 36a-d	Rdt global
a R ₁ = CH ₃ , R = CH ₃	35a (29%)	36a (56%)	85%
b R ₁ = OCH ₃ , R = CH ₃	35b (40%)	36b (55%)	95%
c R ₁ = CH ₃ , R = C ₃ H ₅	35c (37%)	36c (61%)	98%
d R ₁ = OCH ₃ , R = C ₃ H ₅	35d (35%)	36d (63%)	98%

Condition : a : EtOH/SnCl₂, 60°C; b : 4-R₁PhSO₂Cl/pyridine

En plus des données spectroscopiques de la RMN, les structures des composés **35a-d** et **36a-d** ont été confirmées sans ambiguïté par diffraction des rayons X (Figures 21-28). Les diagrammes ORTEP des composés **35a-d** montrent bien la fixation du groupement éthoxy en position 4 de l'indazole.

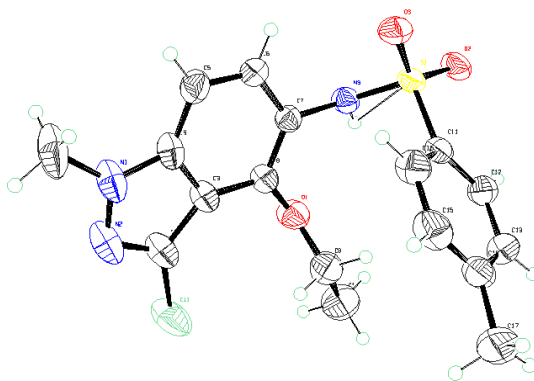


Figure 21 : Diagramme ORTEP de la structure du composé **35a**

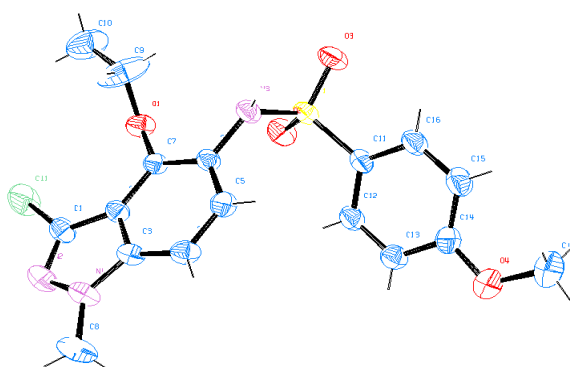


Figure 22 : Diagramme ORTEP de la structure du composé **35b** [21]

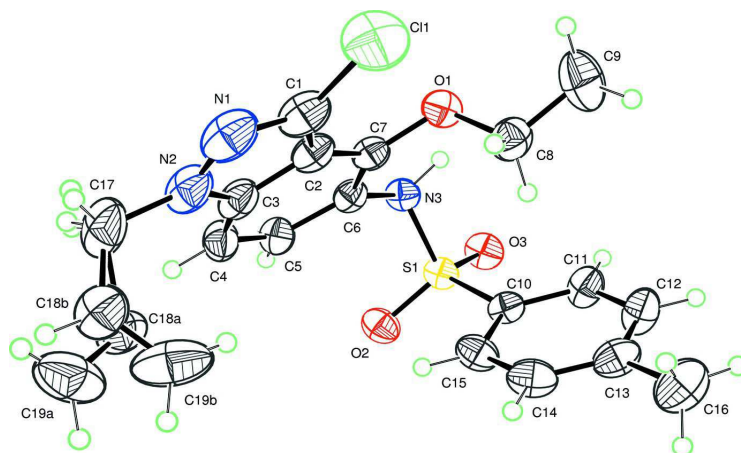


Figure 23 : Diagramme ORTEP de la structure du composé **35c** [22]

21. H. Chicha, E. M. Rakib, A. Hannioui, M. Saadi, L. El Ammari. *Acta. Cryst.* **2014**, E70, 679

22. H. Chicha, E. M. Rakib, L. Bouissane, M. Saadi, L. El Ammari. *Acta. Cryst.* **2014**, E70, 653

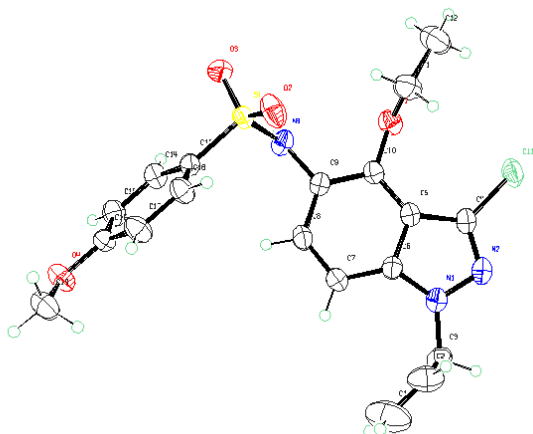


Figure 24 : Diagramme ORTEP de la structure du composé **35d**

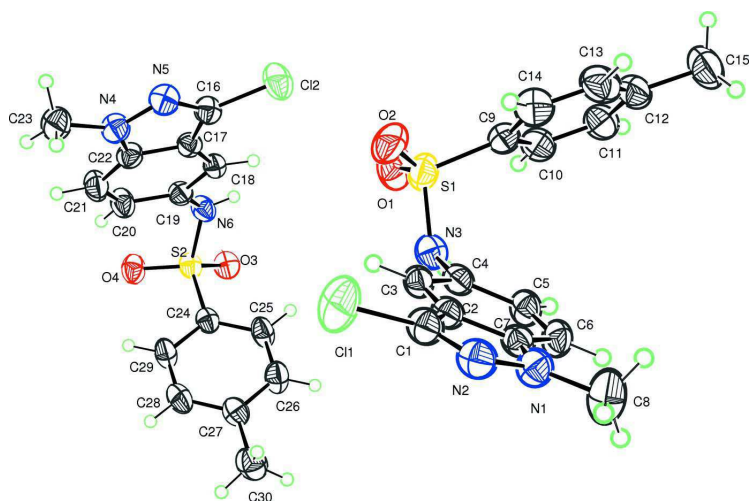


Figure 25 : Diagramme ORTEP de la structure du composé **36a** [23]

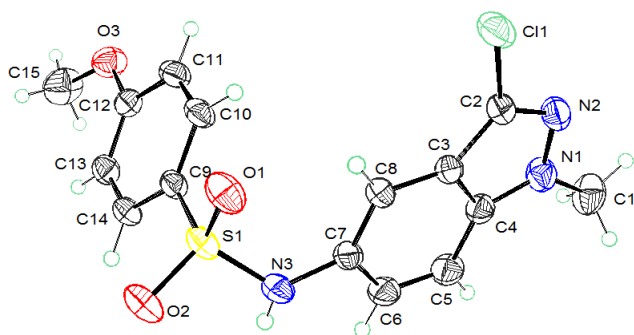


Figure 26 : Diagramme ORTEP de la structure du composé **36b**

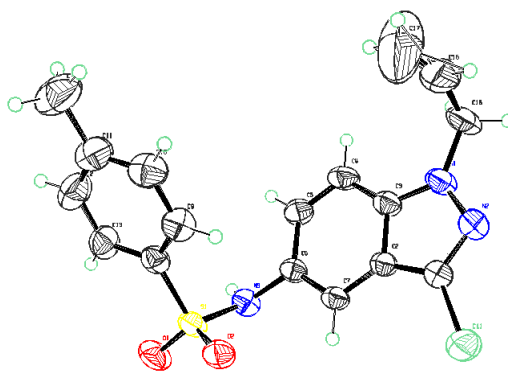


Figure 27 : Diagramme ORTEP de la structure du composé **36c**

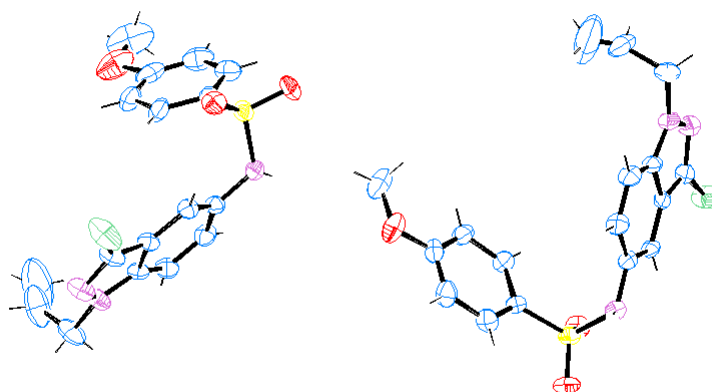


Figure 28 : Diagramme ORTEP de la structure du composé **36d**

VI. Evaluation anticancéreuse de nouvelle famille de *N*-(5-indazolyl)-arylsulfonamide

Comme nous l'avons signalé précédemment, notre groupe de recherche [2] a dernièrement synthétisé une nouvelle série de *N*-(7-indazolyl)benzènesulfonamides de type A (Figure 29) pour évaluer leur propriété pharmacologique. Les dérivés de *N*-(7-indazolyl)-arylsulfonamide ont été testés *in vitro* sur des cellules tumorales de la lignée cellulaire L1210 (leucémie murine) et les cellules tumorales humaines DU145 (prostate carcinome), HCT116 (carcinome du côlon) et HT29 (adénocarcinome du côlon). Ces composés ont montré des activités cytotoxiques prometteuses (Figures 29 et 30).

2. L. Bouissane, S. El Kazzouli, S. Léonce, B. Pfeiffer, E. M. Rakib, M. Khouili, G. Guillaumet. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 1078–1088

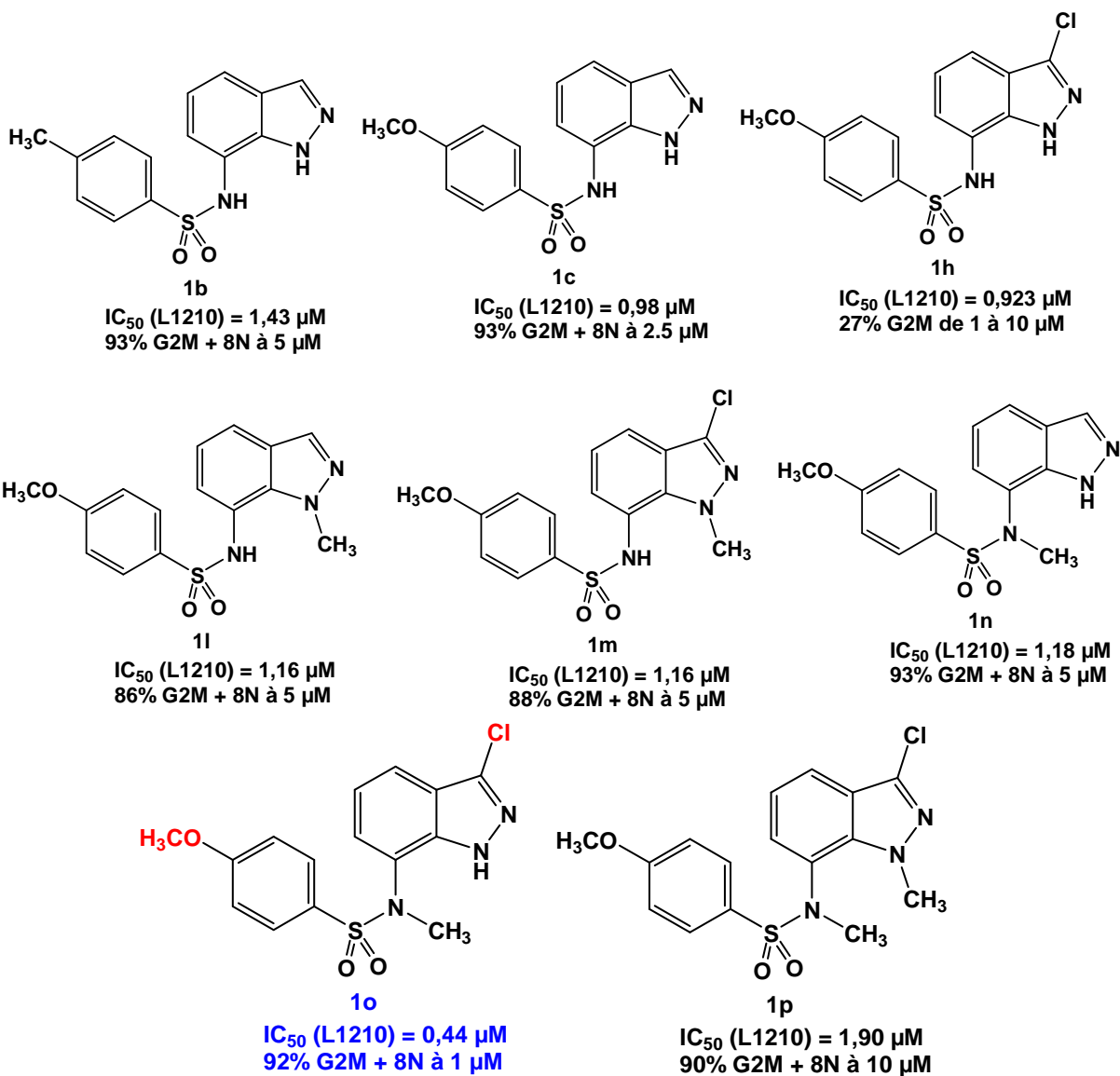


Figure 29 : CI_{50} et perturbation du cycle cellulaire des molécules plus actives.

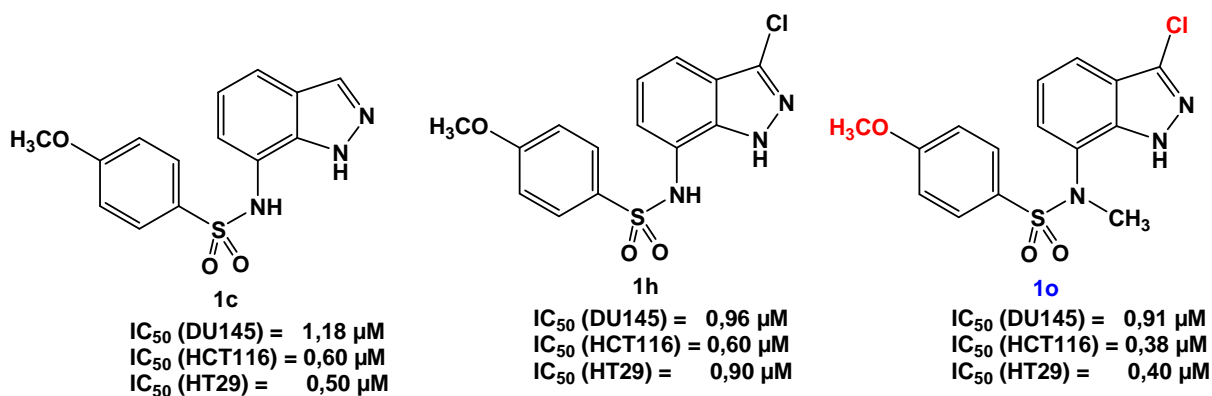


Figure 30 : CI_{50} des *N*-(7-indazolyl)-arylsulfonamides les plus actives.

Les auteurs ont montré que les groupements électro-donneurs CH₃O et CH₃ de la position 4 du phényle de sulfonyle, et la présence d'un atome de chlore en position 3 de l'indazole ont un effet prédominant sur l'inhibition de la prolifération et l'activité mitotique des cellules tumorales comparés aux autres groupements.

Suite à ces travaux antérieurs de notre laboratoire, qui ont montré que les composés à structure *N*-(7-indazolyl)-arylsulfonamides possédaient un niveau d'activité prometteur contre certains lignées cellulaires tumorales, notre équipe de recherche a développé récemment la synthèse d'une nouvelle série de *N*-(6(4)-indazolyl)benzènesulfonamides. Certains composés ont montré des activités anti-proliférative/apoptotique très intéressantes contre les lignées cellulaires A2780, A549 et P388 (Figure 31). La majorité des composés induit un bloc de cellules dans la phase G2/M du cycle cellulaire et génèrent des cellules avec un nombre anormal de chromosomes, des phénomènes qui sont typiques, mais pas exclusivement de la tubuline agent interagissant [5,6].

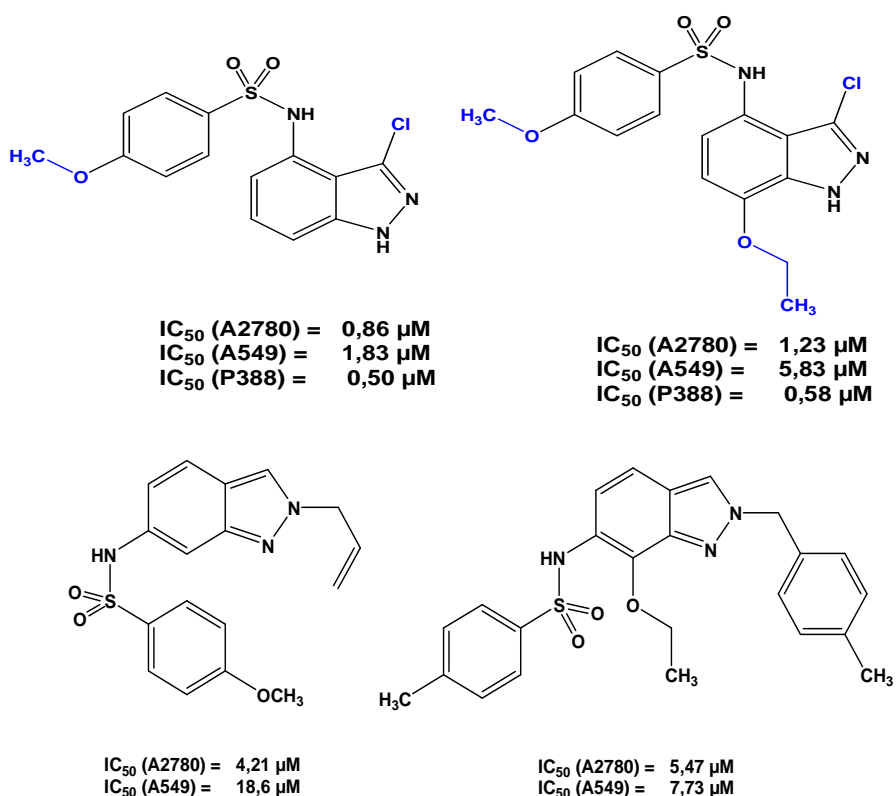


Figure 31: Effet des dérivés *N*-(4(6)-indazolyl)-arylsulfonamides sur l'inhibition de la prolifération des cellules A2780, A549 et P388.

5. N. Abbassi, H. Chicha, E. M. Rakib, A. Hannioui, M. Alaoui, A. Hajjaji, D. Geffken, C. Aiello, R. Gangemi, C. Rosano, M. Viale. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 57, 240-249.

6. N. Abbassi, E. M. Rakib, H. Chicha, L. Bouissane, A. Hannioui, C. Aiello, R. Gangemi, P. Castagnola, C. Rosano, M. Viale. *Arch. Pharm. Chem.Life Sci.* **2014**, 347, 423-431.

Suite à ces travaux de notre équipe de recherche, qui ont montré que les composés à structure *N*-(6(4)-indazolyl)-benzènesulfonamides et *N*-(7-éthoxy-6(4)-indazolyl)-benzène sulfonamides possédaient des propriétés anticancéreuses prometteuses, nous avons décidé en collaboration avec l'équipe du Professeur Maurizio Viale de l'institut de cancérologie de Genova, Italie de tester une nouvelle série de molécules originales à structure *N*-(5-indazolyl)arylsulfonamides, synthétisés dans ce chapitre.

Les activités antiprolifératives de *N*-(5-indazolyl)arylsulfonamides ont été évaluées *in vitro* sur deux lignées cellulaires tumorales : A2780 (carcinome humain de l'ovaire) et A549 (adénocarcinome pulmonaire à petites cellules).

L'évaluation biologique a été réalisée sur deux séries de composés: une série qui regroupe des *N*-(5-indazolyl)arylsulfonamides non alkylés et non chloré (Figure 32), et une autre série de molécules composé des dérivés de *N*-(5-indazolyl)arylsulfonamides alkylés et/ou chloré (Figure 33). L'objectif principal de cette étude, c'est étudier l'effet de la protection de l'azote pyrazolique et la fixation de l'atome de chlore en position 3 ou 4 de l'indazole sur la prolifération inhibitrice des cellules tumorales.

VI-1 Evaluation pharmacologique de la première série de *N*-(5-indazolyl)aryl sulfonamides.

Les molécules testées dans la première série sont :

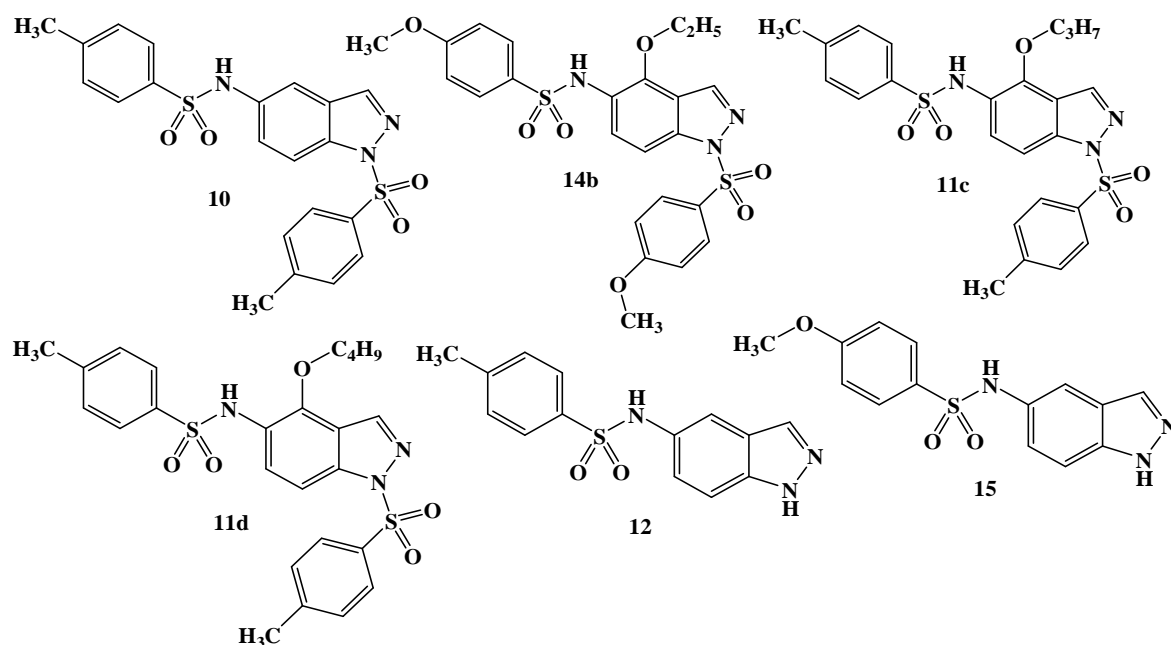


Figure 32 : Première série de molécules testées contre les lignées cellulaires A2780 et A549

Les activités antiprolifératives sur la première série de molécules (Figure 32) ont été évaluées *in vitro* sur deux lignées cellulaires tumorales: A2780 et A549. Les résultats sont exprimés en CI_{50} qui présente la concentration de la drogue inhibant 50% de la prolifération des cellules. Les CI_{50} sont données en μM .

La prolifération des cellules est évaluée par la mesure de l'activité enzymatique succinyl-déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes, capables de cliver un sel de tétrazolium de couleur jaune, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazolyl)-2,5-diphényltétrazolium (ou MTT), en un dérivé formazan de couleur bleu violet, insoluble dans l'eau (Figure 33).

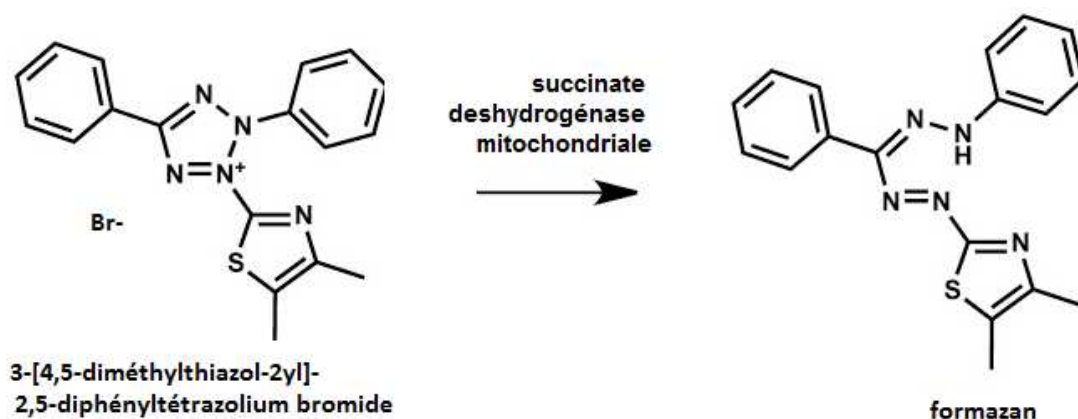


Figure 33 : Principe de la méthode colorimétrique au MTT

La prolifération cellulaire est marquée par l'augmentation de l'absorbance. En effet, plus il reste de cellules vivantes, plus il se forme de dérivés formazan de couleur bleu-violet.

Les deux lignées cellulaires utilisées dans cette étude ont été incubées pendant 24h dans des plaques de 96 puits avant le traitement avec nos composés testés. Après 72h d'incubation en présence de nos produits, le nombre des cellules vivantes est directement proportionnel à l'intensité de la coloration violette mesurée quantitativement par spectrophotométrie.

A la lumière des résultats de l'activité antiproliférative de la première série des dérivés de *N*-(5-indazolyl)-arylsulfonamides (Tableau 9), on peut s'apercevoir que sur la lignée A549, tous les composés testés présentent une activité cytotoxique faible avec des CI_{50} supérieures à 100 μM . La même remarque peut être faite à propos de la lignée A2780,

mis à part un effet relativement significatif des composé **14b** et **11c** avec des CI_{50} respectivement de 75.8 μ M et 98.7 μ M.

Tableau 9 : Activité antiproliférative des dérivés *N*-(5-indazolyl)-arylsulfonamides

Composés	CI_{50} (μ M)	CI_{50} (μ M)
	A2780	A549
10	>100	>100
14b	75.8±5.8	>100
11c	98.7±4.9	>100
11d	>100	>100
12	>100	>100
15	>100	>100

VI-2 Evaluation pharmacologique de la deuxième série de *N*-(5-indazolyl)aryl sulfonamides.

Pour étudier l'effet que peut avoir la protection de l'azote pyrazolique de l'indazole par différents groupements alkyles et l'effet de la substitution de la position 3 ou 4 de l'indazole par un atome de chlore sur le spectre d'activité biologique des sulfonamides, nous avons testé une autre série de sulfonamides indazoliques alkylés et chlorés (Figure 34) contre les deux lignées cellulaires tumorales A2780 et A546. Les résultats pharmacologiques sont répertoriés dans le tableau 10.

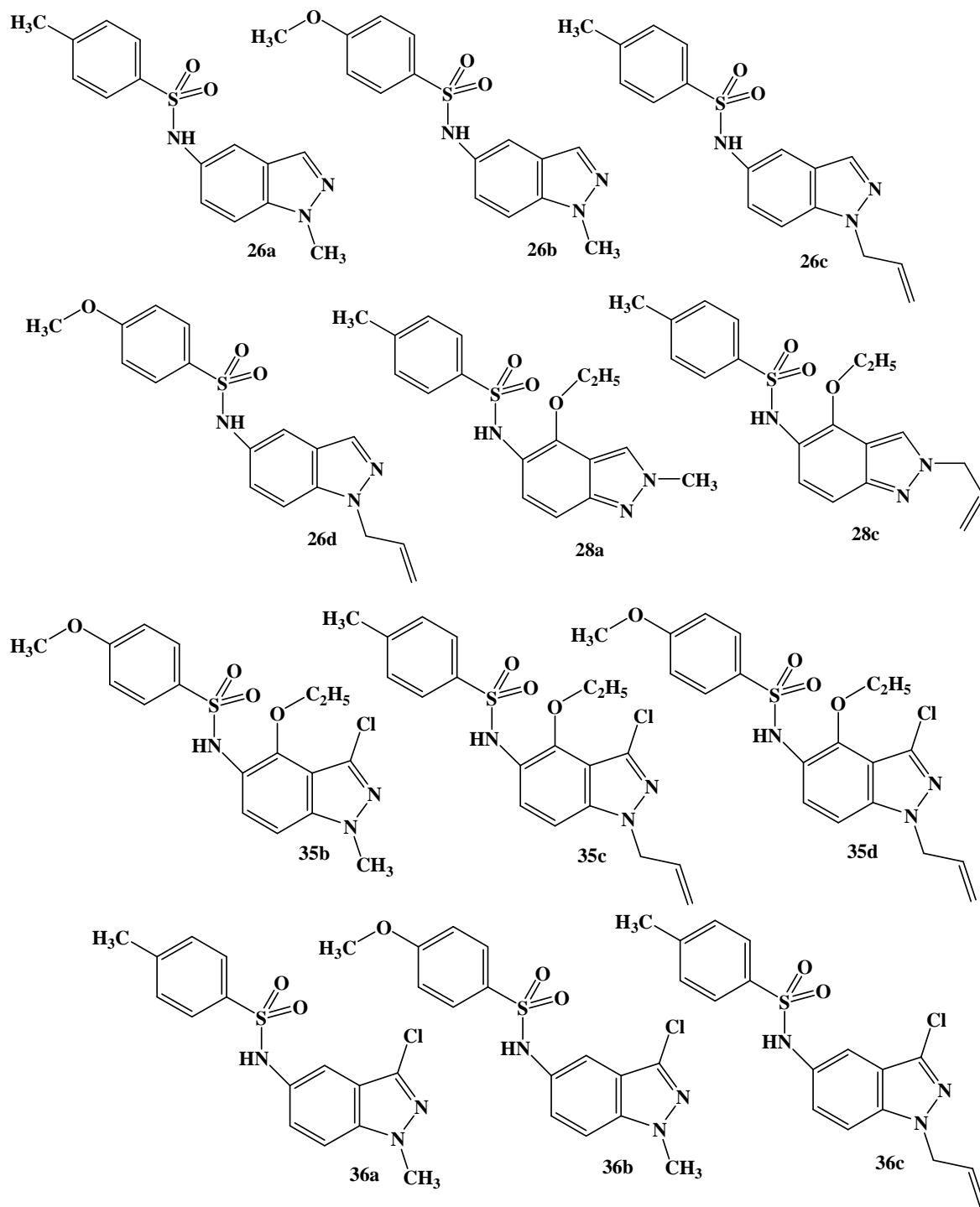


Figure 34 : Deuxième série de sulfonamides alkylés et chloré testés sur les cellules A2780 et A549

Tableau 10 : Effet des dérivés *N*-(alkyl-indazol-5-yl)-arylsulfonamides sur l'inhibition de la prolifération des cellules A2780 et A549

Composés	CI50 (μM)	CI50 (μM)
	A2780	A549
26a	88.2±2.3	>100
26b	56.1±12.7	46.1±1.1
26c	69.8±3.9	28.0±18.6
26d	90.7±14.4	58.2±4.2
28a	41.6±5.0	52.6±9.1
28c	64.5±1.5	>100
35b	45.1±13.4	100.0±5.8
35c	83.4±10.7	>100
35d	90.6±12.5	115.1±27.2
36a	65.3±7.8	>100
36b	69.3±11.4	54.8±11.4
36c	15.9±2.0	65.5±2.1

Parmi les *N*-(5-indazolyl)-arylsulfonamides testés, les structures **26c-d**, **28a** et **36c** possédaient des activités anticancéreuses prometteuses en termes de cytotoxicité. Ces composés inhibent la prolifération des cellules A2780 et A549 avec une CI₅₀ variant de 15.9 à 69.8 μM. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les dérivés de l'indazole substitués en position 3 par l'atome de chlore et le groupement éthoxy de la position 4 de l'indazole ainsi que le groupe allyle substitué sur l'azote pyrazolique. Le composé **36c** substitué sur l'azote pyrazolique par un groupe allyle et en position 3 de l'indazole par un atome de chlore est le plus actif dans la série des molécules testées. Ce résultat, montre que la nature des substituants de l'indazole joue un rôle important dans l'activité antiproliférative de ce type de structure.

VII. Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons préparé une nouvelle série des sulfonamides indazoliques poly-fonctionnalisés à partir du 5-nitroindazole et ses dérivés *N*-alkylés via la réduction par le chlorure stanneux dans différents alcools suivi du couplage de l'amine

correspondante par le chlorure d'arylsulfonyle. La réduction des dérivés de 5-nitroindazole est influencée par plusieurs facteurs affectés au précurseur de départ.

Dans un premier temps, nous avons étudié la réaction d'alkylation du 5-nitroindazole et son dérivé chloré en position 3 par différents groupements alkyles. Cette réaction nous a permis d'isoler dans tous les cas un mélange de deux produits: le 1-alkyl-5-nitroindazole et le 2-alkyl-5-nitroindazole avec des rendements influencés par les conditions opératoires utilisées. Dans la deuxième partie, nous avons étudié la réaction de réduction des 3-chloro-5-nitroindazoles par SnCl_2 dans différents alcools suivi du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'arylsulfonyle. Cette nouvelle méthodologie de synthèse nous a permis d'isoler à côté du sulfonamide indazolique attendu, deux nouveaux composés : le 5-indazolyl-arylsulfonamide fonctionnalisé en position 4 par un groupement alkoxy et le 5-indazolyl-arylsulfonamide substitué en position 4 par un atome de chlore observé pour la première fois dans cette série de réduction des 5-nitroindazoles. Pour étudier l'influence que peut avoir l'effet de l'insertion d'un substituant (halogène, alkyle) dans différentes positions de l'indazole sur la réaction de réduction de 5-nitroindazole, nous avons envisagé deux facteurs principaux: l'effet de l'atome d'halogène en position 3 de l'indazole et l'effet de l'agent alkylant en position 1 et/ou 2 de l'indazole. Ainsi, en présence de l'atome d'halogène en position 3, nous avons observé une sélectivité meilleure en faveur du sulfonamide non substitué. Pour les 5-nitroindazoles alkylés, nous avons montré que la réduction des 1-alkyl-5-nitroindazoles par SnCl_2 dans l'éthanol conduit à un mélange de trois produits mais avec une sélectivité meilleure en faveur du sulfonamide indazolique non substitué. Par contre, la protection de l'azote indazolique en position 2 favorise la synthèse de l'indazole substitué en position 4 par un groupement éthoxy et de l'indazole substitué en position 4 par un atome de chlore avec des rendements meilleurs en faveur des dérivés de 4-éthoxyindazole. Ces résultats montrent que la nature de l'agent alkylant en position 2 de l'indazole a un effet notable sur l'orientation de la réaction de réduction vers la synthèse des dérivés indazoliques substitués par un groupe éthoxy ou un atome de chlore en position 4. Dans le cas de la réduction de 1-alkyl-3-chloro-5-nitroindazole, nous avons isolé à côté des sulfonamides non substitués, des 4-éthoxy-3-chloro-5-indazolyl-arylsulfonamides avec des rendements satisfaisants.

Cette voie de synthèse originale nous a permis de localiser le site réactif vis-à-vis du mélange SnCl_2/ROH et de synthétiser une nouvelle famille de 5-indazolyl aryl sulfonamides fonctionnalisés en position 4 par un groupement alkoxy et/ou un atome de

chlore. La présence des substituants de natures différentes dans le squelette de l'indazole tels que le groupement 4-alkoxy-, 4-chloro-, le sulfonamide en position 5 et les groupements fonctionnels en position 1, 2 et 3, pourrait augmenter le spectre d'activité biologique de ce type de structures. Pour valoriser les résultats obtenus de la synthèse hétérocyclique, nous avons décrit, l'activité anti-proliférative de nouveaux dérivés de *N*-(5-indazolyl)-benzènesulfonamides. Certains composés ont montré des activités anti-prolifératives intéressantes contre les lignées cellulaires A2780 et A549.

Partie expérimentale

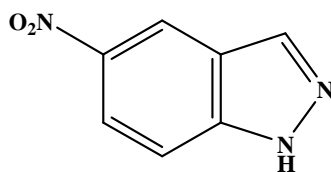
Les points de fusion non corrigés ont été pris en tube capillaire sur l'appareil Buchi-Tottoli. Toutes les masses molaires (MM) qui sont indiquées dans la partie expérimentale sont exprimées en grammes par mole.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés dans CDCl_3 , DMSO-d_6 et solution (sauf indication contraire) avec TMS comme référence interne en utilisant un appareil Bruker AC 300 (1H) ou 75MHz instruments (^{13}C). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence interne. La multiplicité des ressources de RMN ^{13}C ont été affectés par la mise en valeur sans distorsion par transfert des expériences de polarisation (DEPT).

La chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée sur des feuilles d'aluminium recouvertes de silice E.Merck 60 F254 (épaisseur 0,063-0.2 mm). La révélation des taches se fait sous une lampe UV. Les séparations chromatographiques flash sont effectuées sur gel de silice.

Les réactifs du commerce ont été utilisés sans aucune purification, sauf mention contraire.

Synthèse du 5-nitro-1*H*-indazole (9)



$C_7H_5N_3O_2$

MM= 163,13 g/mol

Mode opératoire : On dissout 10 g (66 mmol) de 2-méthyl-4-nitroaniline dans 500 ml d'acide acétique. On ajoute goutte à goutte la quantité équivalente du nitrite de sodium dissoute dans un minimum d'eau. Après 8 heures d'agitation à température ambiante, la solution acide est concentrée au 1/3 de son volume initial. On ajoute 500 ml d'eau bouillante et on chauffe jusqu'à ce que le précipité soit dissout. La solution est filtrée à chaud, le précipité formé est recristallisé dans l'éthanol.

Rendement : 84%

PF : 198-200 °C

RMN 1H (DMSO- d_6): δ 7,76 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 8,25 (dd, 1H, $J = 8,4$ Hz, 1,8 Hz), 8,54 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz), 8,46 (s, 1H, H-3), 13,05 (s, 1H, NH).

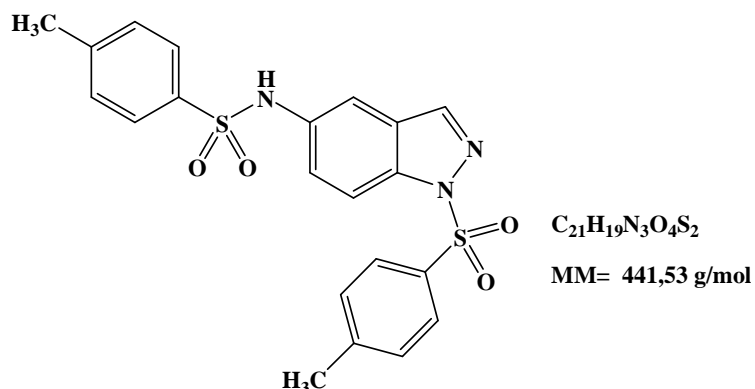
RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 114,5 (CH), 118,6 (CH), 120,0 (C), 124,3 (CH), 132,4 (CH), 135,8 (C), 142,7 (C), 145,1 (C).

Synthèse des *N*-(1*H*-indazol-5-yl)-arylsulfonamides

Mode opératoire général: 0,5 g (3,07 mmoles) de 5-nitroindazole et 3,49 g (18,4 mmoles) de $SnCl_2$ anhydre sont mis en suspension dans 25 ml d'alcool absolu. Ce mélange est chauffé à 60 °C pendant 2-6h (selon l'alcool utilisé), puis le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et hydrolysé avec une solution aqueuse de carbonate de potassium 5% jusqu'à pH 7-8. La phase aqueuse est extraite trois fois à l'acétate d'éthyle et les phases organiques sont séchées sur $MgSO_4$, filtrées et concentrées. L'amine obtenue est dissoute immédiatement dans 5 ml de pyridine. On y ajoute la quantité équivalente (+10%) de chlorure d'aryle sulfonyle et le milieu réactionnel est abandonné sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Après l'évaporation de la pyridine, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane 2/8).

4-Méthyl-N-(1-(4-méthylbenzènesulfonyl)-1H-indazol-5-yl)benzènesulfonamide

(10)

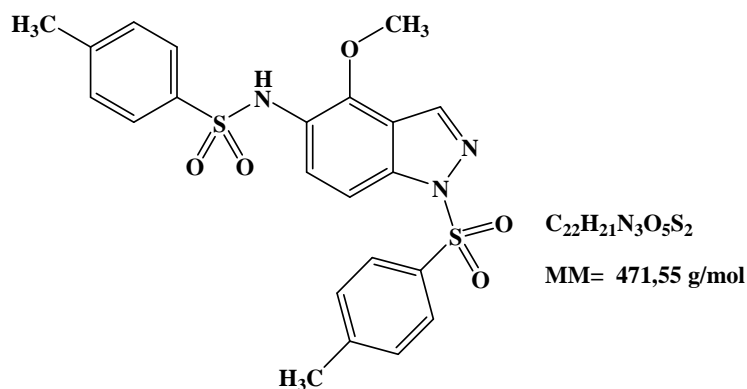


PF: 162-164 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 2,36 (s, 3H, CH₃), 2,38 (s, 3H, CH₃), 6,80 (s, 1H, NH), 7,19-7,23 (m, 4H), 7,45 (m, 1H), 7,60 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,83 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 8,41 (t, 1H, J = 8,7 Hz), 8,08 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 21,5 (CH₃), 21,7 (CH₃), 114,0 (CH), 114,4 (CH), 124,9 (CH), 127,2 (2CH), 127,6 (2CH), 129,8 (2CH), 129,9 (2CH), 130,1 (C), 132,8 (C), 134,3 (C), 135,7 (C), 140,9 (CH), 144,2 (C), 145,6 (C).

N-(4-Méthoxy-1-(4-méthylbenzènesulfonyl)-1H-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzène sulfonamide (11a)

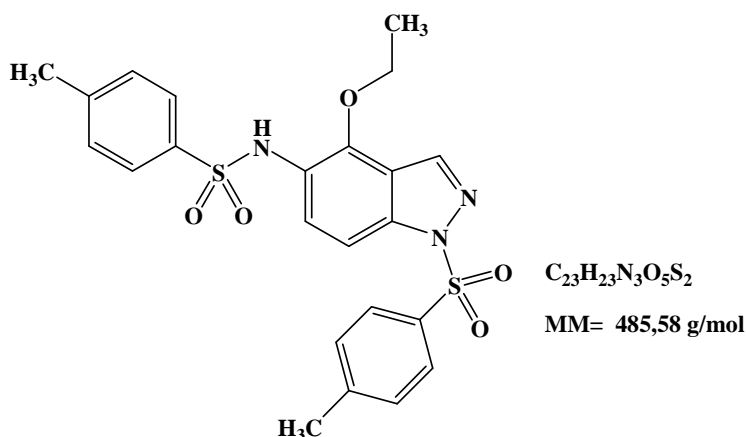


PF: 56-58 °C

RMN¹H (DMSO-d₆): δ 2,30 (s, 3H, CH₃), 2,32 (s, 3H, CH₃), 3,70 (s, 3H, CH₃O), 7,26 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,38 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,43-7,51 (m, 3H), 7,66 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,78 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 8,64 (s, 1H, H-3), 9,59 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆): δ 21,4 (CH₃), 21,6 (CH₃), 60,6 (CH₃O), 105,8 (CH), 117,2 (C), 122,0 (C), 127,1 (2CH), 127,6 (2CH), 129,7 (2CH), 129,8 (2CH), 130,7 (CH), 133,7 (C), 137,9 (C), 140,5 (C), 140,1 (CH), 143,3 (C), 146,5 (C), 147,6 (C).

***N*-(4-Ethoxy-1-(4-méthylbenzènesulfonyl)-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzène sulfonamide (11b)**

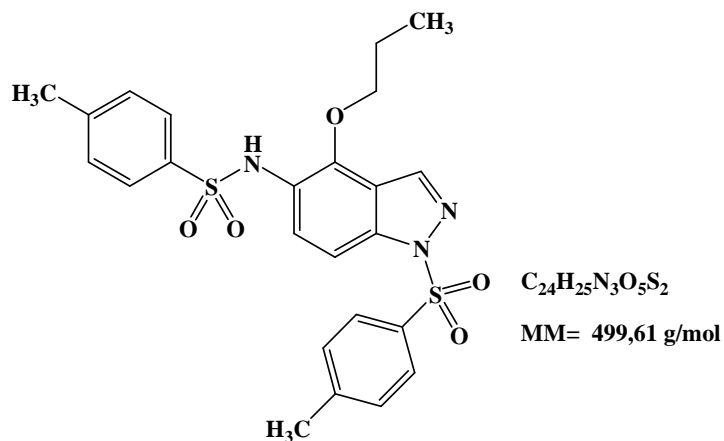


PF : 53-55 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 1,22 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 2,32 (s, 3H, CH₃), 2,34 (s, 3H, CH₃), 4,07 (q, 2H, CH₂O, J = 7,2 Hz), 7,10-7,14 (m, 4H), 7,53 (d, 4H, J = 8,4 Hz), 7,61 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,69-7,71 (m, 2H), 8,30 (s, 1H, H-3), 8,97 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 15,4 (CH₃), 21,4 (CH₃), 21,5 (CH₃), 67,9 (CH₂O), 103,3 (CH), 108,8 (C), 114,0 (C), 118,5 (C), 125,1 (CH), 127,2 (4CH), 129,2 (4CH), 129,5 (CH), 129,6 (C), 132,3 (C), 136,1 (C), 139,7 (C), 143,6 (C).

***N*-(4-Propoxy-1-(4-méthylbenzènesulfonyl)-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzène sulfonamide (11c)**

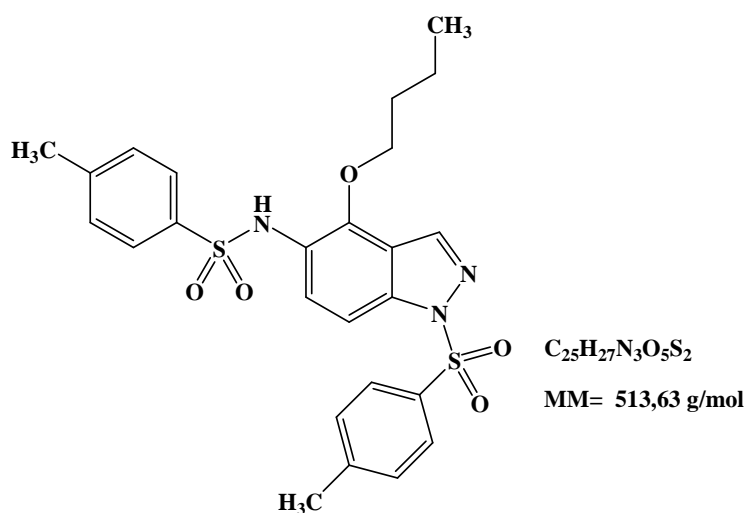


PF: 82-84 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 0,96 (t, 3H, CH₃, J = 7,8 Hz), 1,58-1,70 (m, 2H, CH₂), 2,32 (s, 3H, CH₃), 2,35 (s, 3H, CH₃), 4,00 (s, 2H, CH₂O, J = 6,8 Hz), 7,11-7,18 (m, 4H), 7,51-7,60 (m, 3H), 7,89-8,00 (m, 3H), 8,25 (s, 1H, H-3), 8,96 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 10,2 (CH₃), 21,4 (CH₃), 21,5 (CH₃), 23,1 (CH₂), 74,2 (CH₂O), 103,2 (CH), 118,7 (C), 123,4 (C), 124,9 (CH), 125,6 (C), 127,2 (4CH), 129,4 (4CH), 129,6 (CH), 129,7 (C), 132,5 (C), 136,1 (C), 138,1 (C), 143,6 (C).

***N*-(4-Butoxy-1-(4-méthylbenzènesulfonyl)-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzène sulfonamide (11d)**

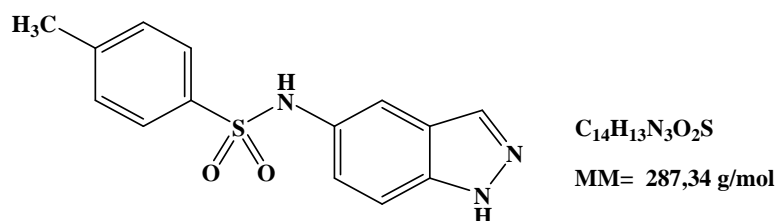


PF: 58-60 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 0,92 (t, 3H, CH₃, J = 7,5 Hz), 1,29-1,37 (m, 2H, CH₂), 1,53-1,59 (m, 2H, CH₂), 2,31 (s, 3H, CH₃), 2,33 (s, 3H, CH₃), 4,01 (s, 2H, CH₂O, J = 6,8 Hz), 6,96 (s, 1H, NH), 7,12-7,18 (m, 4H), 7,51-7,60 (m, 3H), 7,89-8,00 (m, 2H), 7,70 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 8,12 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 13,8 (CH₃), 18,9 (CH₂), 21,4 (CH₃), 21,5 (CH₃), 31,7 (CH₂), 72,4 (CH₂O), 103,7 (CH), 118,9 (C), 122,9 (C), 125,4 (CH), 125,8 (C), 127,2 (4CH), 129,4 (4CH), 129,6 (CH), 132,8 (C), 136,1 (C), 138,2 (C), 140,3 (C), 144,1 (C).

***N*-(1*H*-Indazol-5-yl)-4-méthyl-benzènesulfonamide (12)**

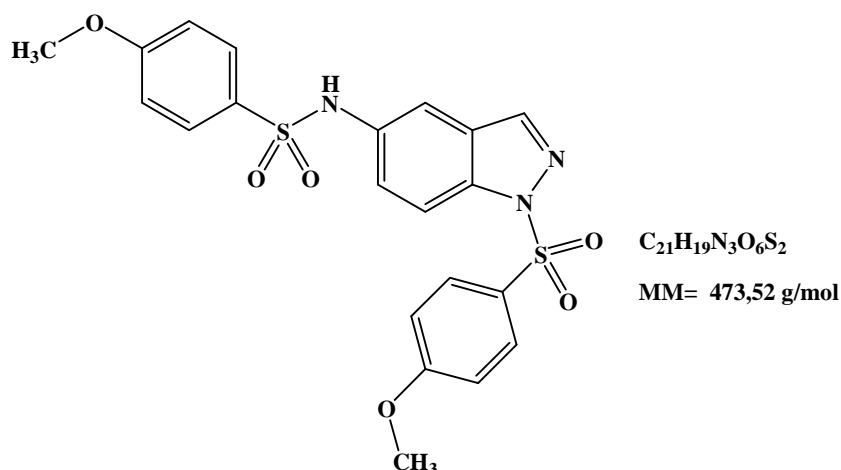


PF : 176-182 °C

RMN¹H (DMSO-*d*₆): δ 2,26 (s, 3H, CH₃), 7,07 (dd, 1H, J = 2,1 et 9,0 Hz), 7,25 (d, 2H, J = 7,8 Hz), 7,38 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,40 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,56 (d, 2H, J = 7,8 Hz), 7,97 (s, 1H, H-3), 9,98 (s, 1H, NH), 13,00 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 21,4 (CH₃), 111,1 (CH), 113,0 (CH), 122,6 (CH), 123,3 (C), 127,2 (2CH), 130,0 (2CH), 130,8 (C), 133,9 (CH), 137,0 (C), 138,1 (C), 143,4 (C).

4-Méthoxy-*N*-(1-(4-méthoxybenzènesulfonyl)-1*H*-indazol-5-yl)benzènesulfonamide (13)

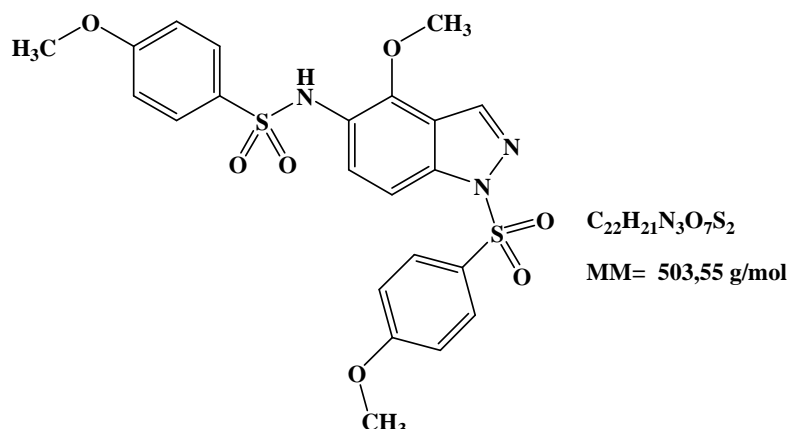


PF : 144-152°C

RMN¹H (DMSO-*d*₆): δ 3,73 (s, 3H, CH₃O), 3,76 (s, 3H, CH₃O), 6,99 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,04 (d, 2H, J = 9,2 Hz), 7,35 (dd, 1H, J = 2,4 et 9,0 Hz), 7,50 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 7,65 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,80 (d, 2H, J = 9,2 Hz), 7,97 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 8,42 (s, 1H, H-3), 10,32 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 56,0 (CH₃O), 56,3 (CH₃O), 112,6 (CH), 113,8 (CH), 114,9 (2CH), 115,5 (2CH), 124,1 (CH), 126,7 (C), 127,9 (C), 129,3 (2CH), 130,0 (2CH), 131,2 (C), 135,1 (C), 137,1 (C), 142,6 (CH), 162,9 (C), 164,5 (C).

4-Méthoxy-N-(4-méthoxy-1-(4-méthoxybenzènesulfonyl)-1H-indazol-5-yl)-benzène sulfonamide (14a)

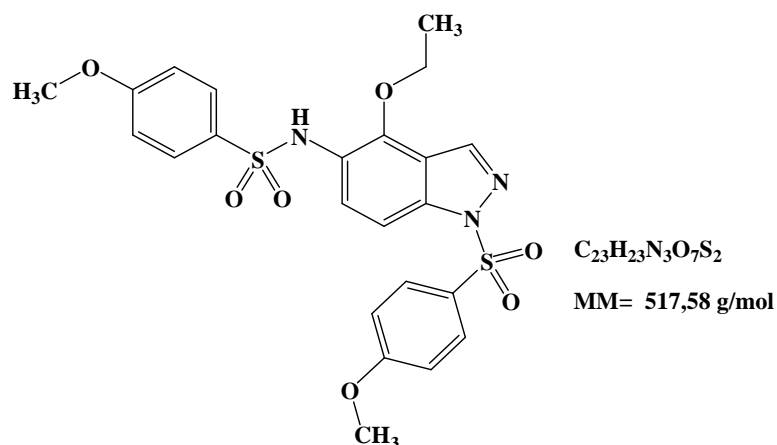


PF : 107-109 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 3,78 (s, 3H, CH₃O), 3,80 (s, 3H, CH₃O), 3,81 (s, 3H, CH₃O), 6,81 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 6,86 (s, 1H, NH), 6,90 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,61 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,75 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,81 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,90 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 8,16 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 55,6 (CH₃O), 55,7 (CH₃O), 60,4 (CH₃O), 106,7 (CH), 113,9 (2CH), 114,5 (2CH), 116,4 (C), 122,2 (C), 125,3 (CH), 128,5 (C), 129,4 (2CH), 130,0 (2CH), 130,5 (C), 137,8 (CH), 139,7 (C), 143,5 (C), 163,1 (C), 164,3 (C).

N-(4-Ethoxy-1-(4-méthoxybenzènesulfonyl)-1H-indazol-5-yl)-4-méthoxy benzenesulfonamide (14b)



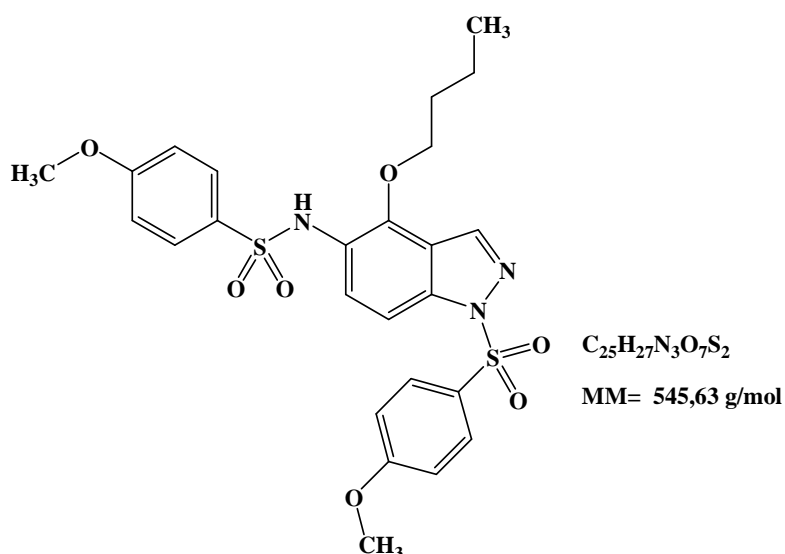
PF: 105-107 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 1,25 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 3,79 (s, 3H, CH₃O), 3,80 (s, 3H, CH₃O), 4,07 (q, 2H, CH₂O, J = 7,2 Hz), 6,80 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 6,90 (s, 1H, NH), 6,95 (d,

2H, J = 9,0 Hz), 7,65 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,76 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,85 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,94 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 8,22 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 15,4 (CH₃), 55,6 (CH₃O), 55,7 (CH₃O), 67,9 (CH₂O), 106,2 (CH), 114,1 (2CH), 114,6 (2CH), 117,0 (C), 122,6 (C), 125,1 (CH), 128,8 (C), 129,5 (2CH), 130,0 (2CH), 130,2 (C), 138,0 (CH), 139,8 (C), 144,1 (C), 162,8 (C), 163,5 (C).

***N*-(4-Butoxy-1-(4-méthoxybenzènesulfonyl)-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxy-benzène sulfonamide (14c)**

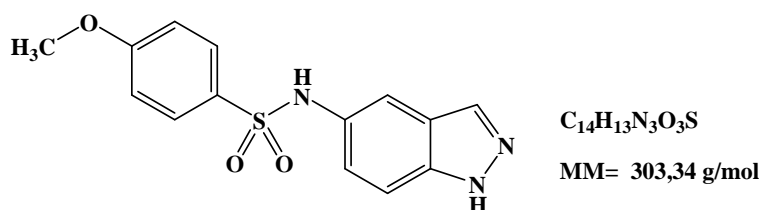


PF : 129-131 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 0,95 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 1,34-1,41 (m, 2H, CH₂), 1,60-1,65 (m, 2H, CH₂), 3,78 (s, 3H, CH₃O), 3,79 (s, 3H, CH₃O), 4,08 (t, 2H, CH₂O, J = 8,1 Hz), 6,80-6,84 (m, 5H), 7,31 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,57-7,61 (m, 3H), 7,85 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 8,23 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 8,30 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 17,7 (CH₃), 18,9 (CH₂), 31,8 (CH₂), 55,6 (2CH₃O), 72,6 (CH₂O), 104,7 (CH), 114,0 (2CH), 114,2 (2CH), 120,5 (C), 125,6 (C), 126,4 (C), 127,8 (CH), 128,9 (2CH), 129,3 (2CH), 129,4 (CH), 130,5 (C), 139,5 (C), 143,3 (C), 163,1 (C), 163,3 (C).

***N*-(1*H*-Indazol-5-yl)-4-méthoxy-benzènesulfonamide (15)**



PF: 161-164 °C

RMN¹H (DMSO-d₆): δ 3,74 (s, 3H, CH₃O), 6,98 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,06(dd, 1H, J = 1,8 et 9,0 Hz), 7,37-7,40 (m, 2H), 7,59 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,97 (s, 1H, H-3), 9,90 (s, 1H, NH), 13,00 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆): δ 56,0 (CH₃O), 111,1 (CH), 113,0 (CH), 114,7 (2CH), 122,6 (CH), 123,3 (C), 129,3 (2CH), 130,9 (C), 131,5 (C), 133,7 (CH), 138,1 (C), 162,5 (C).

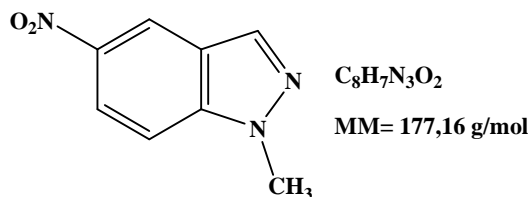
Les données du monocristal du composé **15** sont reportées dans le tableau suivant:

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	R[F ² > 2σ(F ²)] = 0.042 wR(F ²) = 0.119 S = 1.05 3059 réflexions 192 paramètres Δρ _{max} = 0.26 e Å ⁻³ Δρ _{min} = -0.32 e Å ⁻³
Masse moléculaire	303,34 g/mol	
Système cristallin	Monoclinique	
Groupe d'espace et Z	P2 ₁ /c (Z = 4)	
Paramètres de maille	a = 8.9996 (4) Å b = 7.1999 (3) Å c = 21.3728 (10) Å β = 91.794 (3)°	
Volume	V = 1384.20 (11) Å ³	
Radiation	K _α du Mo	
μ	= 0.25 mm ⁻¹	
Température	= 296 K	
Dimensions du monocristal	0.41 × 0.36 × 0.27 mm	

Alkylation du 5-nitro-1H-indazole

Méthode 1 : 0,5 g (1 mol) du 5-nitro-1H-indazole est dissout dans 15 ml de THF. La solution est refroidie à 0 °C. On ajoute 2 g (2 mol) de carbonate de césium, puis on laisse le mélange sous l'agitation pendant 15 min. Après on ajoute la quantité équivalente d'agent alkylant (Iodo-méthane, iodo-éthane et 3-bromo-1-propyne) avec un léger excès (10%). Après 2 heures d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous la pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane 3/7).

1-Méthyl-5-nitro-1*H*-indazole (16)

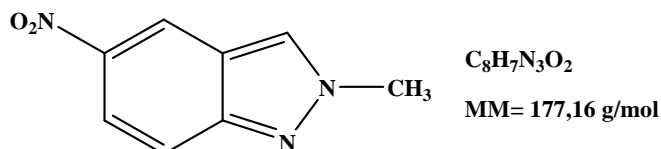


PF : 139-141 °C

RMN 1H (CDCl₃): δ 4,13 (s, 3H, NCH₃), 7,44 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz), 8,17 (s, 1H, H-3), 8,25 (dd, 1H, $J = 9,3$ Hz, 1,8 Hz), 8,69 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl₃): δ 36,0 (NCH₃), 109,2 (CH), 118,9 (CH), 121,4 (CH), 123,0 (C), 135,6 (CH-3, =CH), 141,5 (C), 142,3 (C).

2-Méthyl-5-nitro-2*H*-indazole (19)

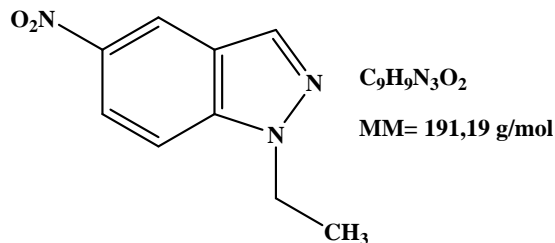


PF : 112-114 °C

RMN 1H (CDCl₃): δ 4,27 (s, 3H, NCH₃), 7,72 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz), 8,06 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, 2,4 Hz), 8,19 (s, 1H, H-3), 8,68 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl₃): δ 40,9 (NCH₃), 118,1 (CH), 119,2 (CH), 120,2 (CH), 121,0 (C), 127,7 (CH-3, =CH), 143,1 (C), 149,9 (C).

1-Ethyl-5-nitro-1*H*-indazole (17)

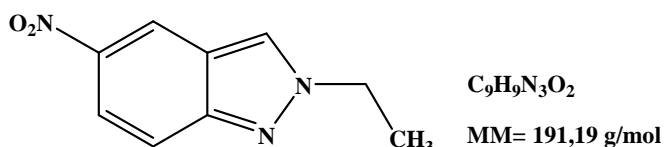


PF : 135-137 °C

RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,54 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 4,47 (q, 2H, NCH₂, J = 7,2 Hz), 7,45 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 8,18 (s, 1H, H-3), 8,23 (dd, 1H, J = 9,3 Hz, 2,1 Hz), 8,69 (d, 1H, J = 2,0 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃): δ 14,8 (CH₃), 44,3 (NCH₂), 109,1 (CH), 119,0 (CH), 121,2 (CH), 123,1 (C), 135,4 (CH-3, =CH), 140,7 (C), 142,2 (C).

2-Ethyl-5-nitro-2H-indazole (20)

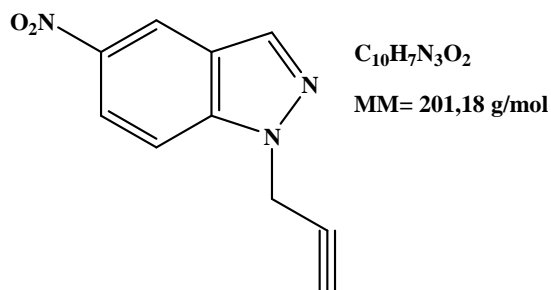


PF : 55-57 °C

RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,64 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 4,53 (q, 2H, NCH₂, J = 7,2 Hz), 7,72 (d, 1H, J = 9,2 Hz), 8,06 (dd, 1H, J = 9,2 Hz, 2,4 Hz), 8,23 (s, 1H, H-3), 8,68 (d, 1H, J = 2,1 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃): δ 15,6 (CH₃), 49,3 (NCH₂), 118,1 (CH), 119,3 (CH), 120,4 (CH), 120,9 (C), 126,4 (CH-3, =CH), 143,1 (C), 149,5 (C).

5-Nitro-1-(prop-2-ynyl)-1H-indazole (18)

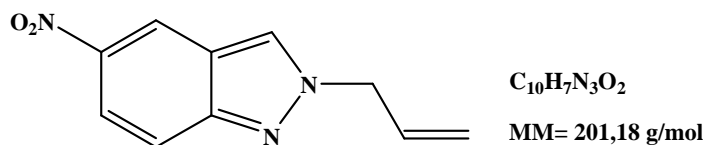


PF : 149-151 °C

RMN ¹H (CDCl₃): δ 2,47 (t, 1H, CH, J = 2,4 Hz), 5,23 (d, 2H, NCH₂, J = 2,4 Hz), 7,63 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 8,21 (s, 1H, H-3), 8,29 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 8,71 (s, 1H).

RMN ¹³C (CDCl₃): δ 39,5 (NCH₂), 74,6 (≡CH), 109,7 (CH), 118,9 (CH), 121,8 (CH), 123,8 (C), 136,3 (CH-3, =CH), 140,9 (C), 142,8 (C).

5-Nitro-2-(prop-2-ynyl)-2H-indazole (21)



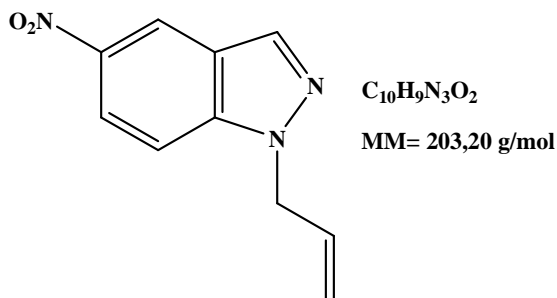
PF : 138-140 °C

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 2,40 (t, 1H, CH, $J = 2,4$ Hz), 5,18 (d, 2H, NCH_2 , $J = 2,4$ Hz), 7,74 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz), 8,10 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, 1,8 Hz), 8,25 (s, 1H, H-3), 8,69 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 41,5 (NCH_2), 75,1 ($\equiv CH$), 118,6 (CH), 119,0 (CH), 121,1 (CH), 121,8 (C), 125,8 (CH-3, =CH), 143,8 (C), 148,9 (C).

Méthode 2 : 1 g (1 mol) du 5-nitro-1H-indazole est dissout dans 10 ml de l'acétone, on ajoute 0,38 g (1,1 mol) d'hydroxyde de potassium, puis on laisse le mélange sous l'agitation à 0°C pendant 15 min. Après on ajoute la quantité équivalente de bromure d'allyle avec un léger excès (10%). Après 2 heures d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous la pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane 3/7).

1-Allyl-5-nitro-1H-indazole (22)



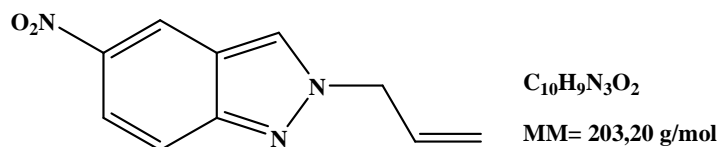
Rendement : 54%

PF : 57-59 °C

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 5,05-5,13 (m, 2H, NCH_2), 5,18-5,31 (m, 2H, =CH₂), 5,97-6,01 (m, 1H, =CH), 7,45 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 8,21 (s, 1H, H-3), 8,25 (dd, 1H, $J = 9,3$ Hz et 2,4 Hz), 8,72 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 52,2 (NCH_2), 109,6 (CH), 118,6 (=CH₂), 119,0 (CH), 121,5 (CH), 123,4 (C), 131,8 (CH), 135,9 (CH-3, =CH), 141,2 (C), 142,4 (C).

2-Allyl-5-nitro-2H-indazole (23)



Rendement : 39%

PF: 46-48 °C

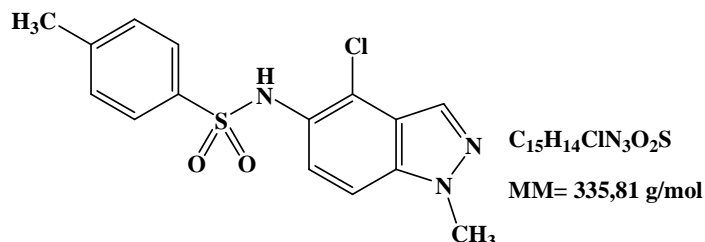
RMN 1H (CDCl₃): δ 5,07-5,11 (m, 2H, NCH₂), 5,34-5,43 (m, 2H, =CH₂), 6,07-6,12 (m, 1H, =CH), 7,73 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz), 8,07 (dd, 1H, $J = 9,2$ Hz, 1,8 Hz), 8,24 (s, 1H, H-3), 8,70 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl₃): δ 56,7 (NCH₂), 118,4 (CH), 119,4 (CH), 120,4 (CH), 120,8 (=CH₂), 121,2 (C), 126,8 (CH-3, =CH), 131,1 (CH), 143,2 (C), 149,7 (C).

Synthèse des *N*-(méthyl-indazol-5-yl)-arylsulfonamides

Mode opératoire : 1 mole de *N*-méthyl-5-nitro-1*H*-indazole et 6 mol de SnCl₂ anhydre sont mis en suspension dans 25 ml d'éthanol absolu. Ce mélange est chauffé à 60 °C pendant 6h, puis le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et hydrolysé avec une solution aqueuse de carbonate de potassium 5% jusqu'à pH 7-8. La phase aqueuse est extraite trois fois à l'acétate d'éthyle et les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre, filtrées et concentrées. L'amine obtenue est dissoute immédiatement dans 5 ml de pyridine. On y ajoute la quantité équivalente (+10%) de chlorure d'aryle sulfonyle et le milieu réactionnel est abandonné sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Après évaporation de la pyridine, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane 2/8).

N-(4-Chloro-1-méthyl-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthylbenzènesulfonamide (24a)

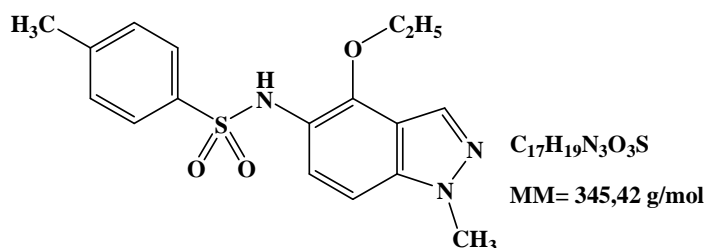


PF: 159-161°C

RMN¹H (CDCl₃): δ 2,34 (s, 3H, CH₃), 4,05 (s, 3H, NCH₃), 6,85 (s, 1H, NH), 7,14 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,29 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,54 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,74 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 7,87 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 21,6 (CH₃), 35,9 (NCH₃), 108,4 (CH), 118,6 (C), 122,9 (C), 124,5 (CH), 126,4 (C), 127,2 (2CH), 129,6 (2CH), 130,8 (C), 131,4 (CH), 135,7 (C), 138,7 (C), 144,1 (C).

***N*-(4-Ethoxy-1-méthyl-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthylbenzènesulfonamide (25a)**

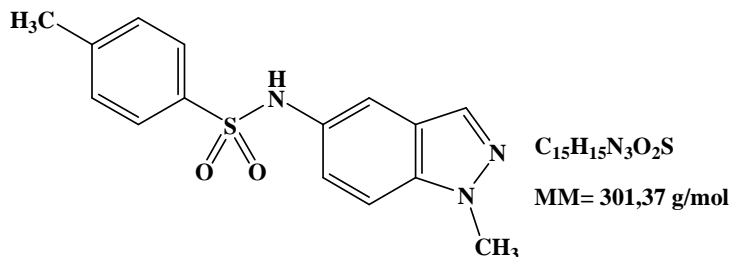


PF : 125-127 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 1,20 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 2,31 (s, 3H, CH₃), 4,01 (s, 3H, NCH₃), 4,20 (q, 2H, CH₂O, J = 7,2 Hz), 6,81 (s, 1H, NH), 6,97 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,14 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,51 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,67 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,92 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 15,3 (CH₃), 21,5 (CH₃), 35,7 (NCH₃), 67,8 (CH₂O), 102,2 (CH), 113,0 (CH), 118,1 (C), 122,9 (C), 124,6 (CH), 126,4 (C), 127,2 (2CH), 129,2 (2CH), 130,2 (CH), 136,1 (C), 140,4 (C), 143,5 (C).

4-Méthyl-*N*-(1-méthyl-1*H*-indazol-5-yl)benzènesulfonamide (26a)



PF: 182-184 °C

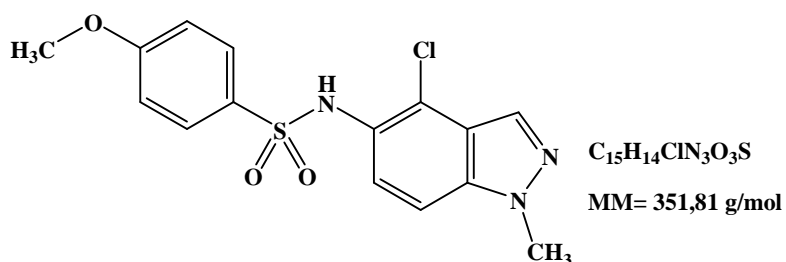
RMN¹H (DMSO-*d*₆): δ 2,27 (s, 3H, CH₃), 3,94 (s, 3H, NCH₃), 7,09 (dd, 1H, J = 9,0 Hz et 2,1 Hz), 7,25 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,38 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 7,46 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,55 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,92 (s, 1H, H-3), 10,01 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆): δ 21,4 (CH₃), 35,8 (NCH₃), 110,6 (CH), 113,2 (CH), 122,5 (CH), 123,8 (C), 127,2 (2CH), 130,0 (2CH), 130,9 (C), 132,6 (CH), 136,1 (C), 136,9 (C), 137,8 (C), 143,5 (C).

Les données du monocristal du composé **26a** sont reportées dans le tableau suivant:

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.046$ $wR(F^2) = 0.134$ $S = 1.02$ 4048 réflexions 190 paramètres $\Delta\rho_{\max} = 0.25 \text{ e } \text{Å}^{-3}$ $\Delta\rho_{\min} = -0.32 \text{ e } \text{Å}^{-3}$
Masse moléculaire	301,37 g/mol	
Système cristallin	Monoclinique	
Groupe d'espace et Z	<i>P2</i> ₁ / <i>c</i> (Z = 4)	
Paramètres de maille	$a = 8.0026 (3) \text{ Å}$ $b = 12.8195 (4) \text{ Å}$ $c = 14.1321 (4) \text{ Å}$ $\beta = 91.602 (2)^\circ$	
Volume	$V = 1449.24 (8) \text{ Å}^3$	
Radiation	K _α du Mo	
μ	= 0.23 mm ⁻¹	
Température	= 296 K	
Dimensions du monocristal	0.43×0.36×0.28 mm	

***N*-(4-Chloro-1-méthyl-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxybenzènesulfonamide (24b)**

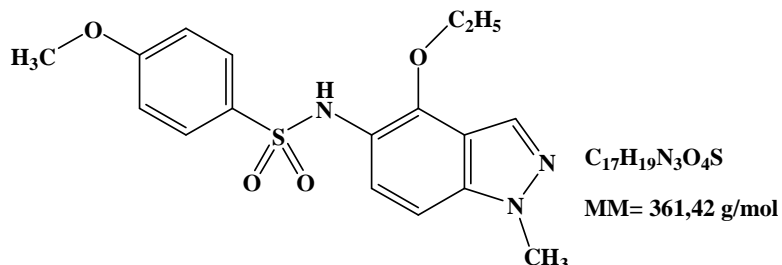


PF : 134-136 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 3,79 (s, 3H, CH₃O), 4,06 (s, 3H, NCH₃), 6,81 (m, 3H, NH et 2H), 7,29 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,58 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,73 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,87 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 35,9 (NCH₃), 55,5 (CH₃O), 108,4 (CH), 114,1 (2CH), 118,7 (C), 124,7 (CH), 126,6 (C), 129,4 (2CH), 130,2 (C), 131,4 (CH), 138,8 (C), 163,3 (C).

***N*-(4-Ethoxy-1-méthyl-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxybenzènesulfonamide (25b)**

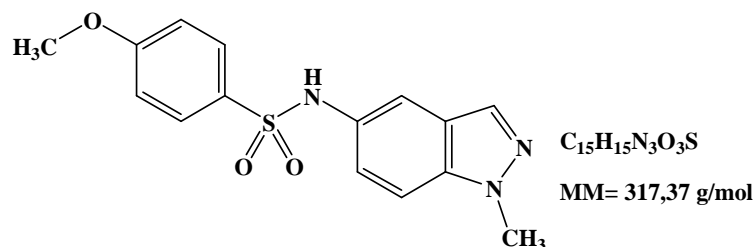


PF : 56-58 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 1,24 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 3,78 (s, 3H, CH₃O), 4,04 (s, 3H, NCH₃), 4,12 (q, 2H, CH₂O, J = 7,2 Hz), 6,79 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 6,98 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,55 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,69 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,95 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 15,4 (CH₃), 35,6 (NCH₃), 55,5 (CH₃O), 67,8 (CH₂O), 102,3(CH), 114,0 (2CH), 118,7 (C), 124,8 (CH), 129,3 (2CH), 131,3 (CH), 132,9 (C), 140,3 (C), 143,4 (C), 162,9 (C), 164,0 (C).

4-Méthoxy-N-(1-méthyl-1*H*-indazol-5-yl)benzènesulfonamide (26b)



PF: 148-150 °C

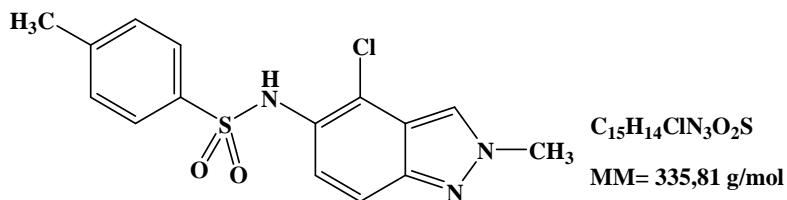
RMN¹H (DMSO-d₆): δ 3,75 (s, 3H, CH₃O), 3,98 (s, 3H, NCH₃), 6,98 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,06 (dd, 1H, J = 1,8 et 9,0 Hz), 7,37-7,40 (m, 2H), 7,59 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,97 (s, 1H, H-3), 9,90 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆): δ 35,8 (NCH₃), 56,0 (CH₃O), 110,6 (CH), 114,2 (2CH), 122,5 (CH), 123,8 (C), 129,7 (2CH), 130,9 (C), 132,6 (CH), 136,1 (C), 137,8 (C), 162,5 (C).

Les données du monocristal du composé **26b** sont reportées dans le tableau suivant:

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₃ S	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.041$ $wR(F^2) = 0.125$ $S = 1.02$ 4178 réflexions 199 paramètres $\Delta\rho_{\max} = 0.29 \text{ e } \text{Å}^{-3}$ $\Delta\rho_{\min} = -0.28 \text{ e } \text{Å}^{-3}$
Masse moléculaire	317,37 g/mol	
Système cristallin	Monoclinique	
Groupe d'espace et Z	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i> (Z = 4)	
Paramètres de maille	$a = 10.1069 (3) \text{ Å}$ $b = 13.6178 (3) \text{ Å}$ $c = 10.8530 (2) \text{ Å}$ $\beta = 90.777 (2)^\circ$	
Volume	$V = 1493.60 (6) \text{ Å}^3$	
Radiation	K α du Mo	
μ	$= 0.23 \text{ mm}^{-1}$	
Température	$= 296 \text{ K}$	
Dimensions du monocristal	0.39×0.33×0.23 mm	

***N*-(4-Chloro-2-méthyl-2*H*-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzènesulfonamide (27a)**

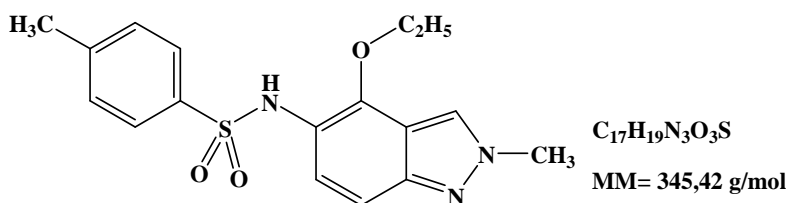


PF: 113-115 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 2,33 (s, 3H, CH₃), 4,23 (s, 3H, NCH₃), 6,92 (s, 1H, NH), 7,16 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,30 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,56 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,68 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,88 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 21,7 (CH₃), 40,5 (NCH₃), 116,1 (CH), 122,6 (C), 124,6 (CH), 125,2 (CH), 126,0 (C), 127,2 (2CH), 129,3 (C), 129,5 (2CH), 135,8 (C), 144,2 (C), 145,2 (C).

***N*-(4-Ethoxy-2-méthyl-2*H*-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzènesulfonamide (28a)**

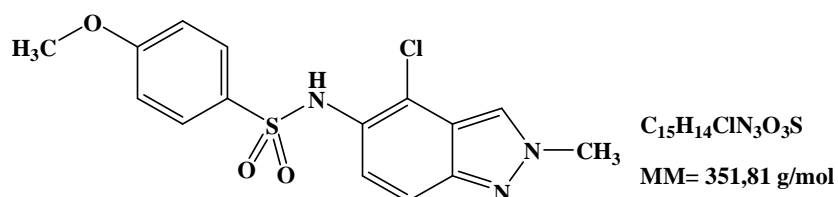


PF : 158-160 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 1,25 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 2,34 (s, 3H, CH₃), 4,09 (s, 3H, NCH₃), 4,20 (q, 2H, CH₂O, J = 7,2 Hz), 6,88 (s, 1H, NH), 7,01 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 7,16 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,58 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,70 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 8,02 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 15,6 (CH₃), 21,5 (CH₃), 40,8 (NCH₃), 66,5 (CH₂O), 115,4 (CH), 121,3 (C), 122,6 (C), 124,2 (CH), 125,5 (CH), 126,4 (C), 127,3 (2CH), 129,6 (2CH), 137,1 (C), 144,8 (C), 146,0 (C).

***N*-(4-Chloro-2-méthyl-2*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxy-benzènesulfonamide (27b)**

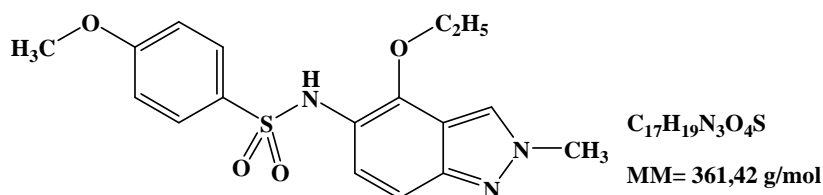


PF: 104-106°C

RMN¹H (CDCl₃): δ 3,80 (s, 3H, CH₃O), 4,22 (s, 3H, NCH₃), 6,80-6,85 (m, 3H), 7,58-7,69 (m, 4H), 7,85 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 40,5 (NCH₃), 55,6 (CH₃O), 114,1 (2CH), 116,4 (CH), 117,5 (C), 121,4 (C), 124,0 (C), 124,2 (CH), 124,8 (CH), 127,8 (C), 129,3 (C), 129,5 (2CH), 130,2 (C), 144,2 (C), 163,3 (C).

***N*-(4-Ethoxy-2-méthyl-2*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxy-benzènesulfonamide (28b)**



PF : 108-110 °C

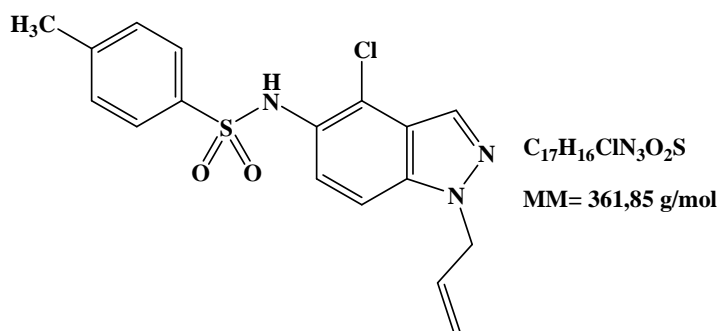
RMN¹H (DMSO-d₆): δ 1,12 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 3,75 (s, 3H, CH₃O), 3,92 (q, 2H, CH₂O, J = 7,2 Hz), 4,07 (s, 3H, NCH₃), 6,98 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,11 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,45 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,76 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 8,30 (s, 1H, H-3), 9,07 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆): δ 15,6 (CH₃), 40,4 (NCH₃), 56,0 (CH₃O), 67,3 (CH₂O), 110,7 (CH), 114,3 (2CH), 118,5 (C), 122,6 (C), 124,3 (CH), 126,9 (CH), 129,3 (2CH), 132,8 (C), 149,2 (C), 162,6 (C), 162,8 (C).

Synthèse des *N*-(allyl-indazol-5-yl)-arylsulfonamides

Mode opératoire : 1 mmol de *N*-allyl-5-nitro-1*H*-indazole et 6 mmol de SnCl₂ anhydre sont mis en suspension dans 25 ml d'éthanol absolu. Ce mélange est chauffé à 60 °C pendant 6h, puis le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et hydrolysé avec une solution aqueuse de carbonate de potassium 5% jusqu'à pH 7-8. La phase aqueuse est extraite trois fois à l'acétate d'éthyle et les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre, filtrées et concentrées. L'amine obtenue est dissoute immédiatement dans 5 ml de pyridine. On y ajoute la quantité équivalente (+10%) de chlorure d'aryle sulfonyle et le milieu réactionnel est abandonné sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Après l'évaporation de la pyridine, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane 2/8).

N-(1-Allyl-4-chloro-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthylbenzènesulfonamide (24c)

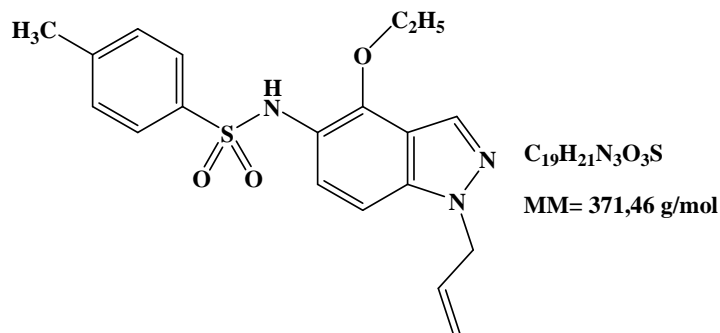


PF : 105-107 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 2,35 (s, 3H, CH₃), 4,98 (m, 2H, NCH₂), 5,12-5,28 (m, 2H, =CH₂), 5,94-6,05 (m, 1H, =CH), 6,83 (s, 1H, NH), 7,15 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,29 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,55 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,72 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 7,91 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 21,5 (CH₃), 52,2 (NCH₂), 108,8 (CH), 118,4 (=CH₂), 118,6 (C), 123,1 (C), 124,4 (CH), 126,6 (C), 127,2 (2CH), 129,6 (2CH), 131,8 (CH), 132,1 (CH), 135,8 (C), 138,3 (C), 144,1 (C).

***N*-(1-Allyl-4-éthoxy-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthylbenzenesulfonamide (25c)**

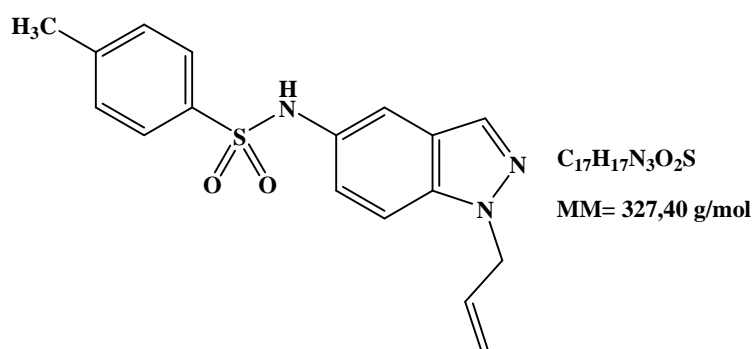


PF : 109-111 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 1,21 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 2,34 (s, 3H, CH₃), 4,06 (q, 2H, CH₂O, J = 7,2 Hz), 4,96 (m, 2H, NCH₂), 5,11-5,26 (m, 2H, =CH₂), 5,93-6,01 (m, 1H, =CH), 6,80 (s, 1H, NH), 6,98 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,13 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,53 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,65 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,95 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 15,4 (CH₃), 21,5 (CH₃), 51,8 (NCH₂), 67,8 (CH₂O), 102,6 (CH), 118,3 (=CH₂), 117,3 (C), 124,6 (CH), 127,2 (2CH), 129,4 (2CH), 130,7 (CH), 131,3 (C), 132,1 (CH), 136,2 (C), 139,9 (C), 143,3 (C), 143,5 (C).

***N*-(1-Allyl-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzènesulfonamide (26c)**



PF: 100-102°C

RMN¹H (DMSO-d₆): δ 2,27 (s, 3H, CH₃), 4,95 (m, 2H, NCH₂), 5,02-5,12 (m, 2H, =CH₂), 5,87-5,98 (m, 1H, =CH), 7,09 (dd, 1H, J = 9,0 Hz et 1,8 Hz), 7,26 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,40

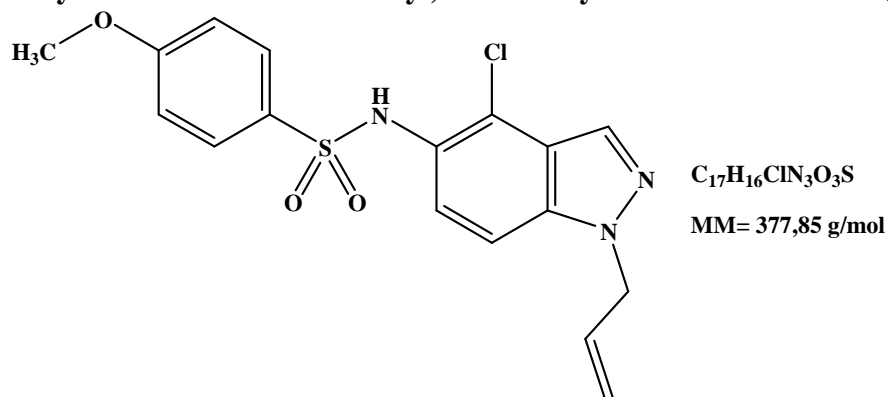
(d, 1H, J = 1,8 Hz), 7,47 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,56 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,97 (s, 1H, H-3), 10,03 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆): δ 21,4 (CH₃), 51,3 (NCH₂), 110,8 (CH), 113,2 (CH), 117,8 (=CH₂), 122,5 (CH), 124,1 (C), 127,2 (2CH), 130,0 (2CH), 131,1 (C), 133,1 (CH), 134,0 (CH), 137,0 (C), 137,4 (C), 143,5 (C).

Les données du monocristal du composé **26c** sont reportées dans le tableau suivant:

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₂ S	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.042$ $wR(F^2) = 0.120$ $S = 1.02$ 6791 réflexions 415 paramètres $\Delta\rho_{\max} = 0.32 \text{ e } \text{Å}^{-3}$ $\Delta\rho_{\min} = -0.28 \text{ e } \text{Å}^{-3}$
Masse moléculaire	327.40g/mol	
Système cristallin	Triclinique	
Groupe d'espace et Z	<i>P</i> 1 (Z = 4)	
Paramètres de maille	$a = 8.8200 (4) \text{ Å}$ $b = 10.4769 (5) \text{ Å}$ $c = 19.7407 (10) \text{ Å}$ $\alpha = 80.211 (1)^\circ$ $\beta = 78.984 (1)^\circ$ $\gamma = 69.784 (1)^\circ$	
Volume	$V = 1669.51 (14) \text{ Å}^3$	
Radiation	K _α du Mo	
μ	$= 0.21 \text{ mm}^{-1}$	
Température	$= 296 \text{ K}$	
Dimensions du monocristal	0.42×0.35×0.28 mm	

***N*-(1-Allyl-4-chloro-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxybenzènesulfonamide (24d)**

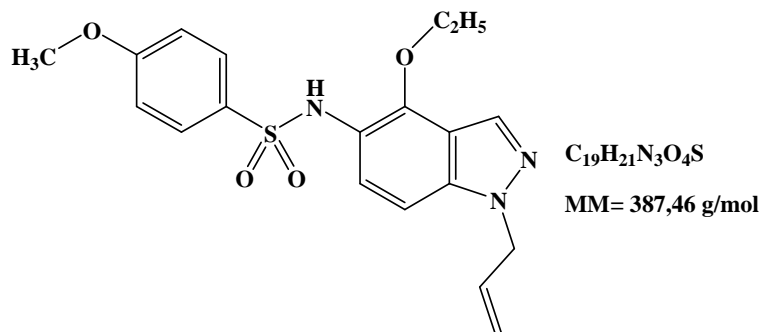


PF: 106-108 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 3,80 (s, 3H, CH₃O), 4,98 (m, 2H, NCH₂), 5,12-5,27 (m, 2H, =CH₂), 5,94-6,01 (m, 1H, =CH), 6,82 (m, 3H, NH et 2H), 7,29 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,59 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,71 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,91 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 52,2 (NCH₂), 55,5 (CH₃O), 108,8 (CH), 114,1 (2CH), 118,4 (=CH₂), 118,6 (C), 123,1 (C), 124,6 (CH), 126,7 (C), 129,4 (2CH), 130,3 (C), 131,8 (CH), 132,1 (CH), 138,3 (C), 163,3 (C).

***N*-(1-Allyl-4-éthoxy-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxybenzènesulfonamide (25d)**

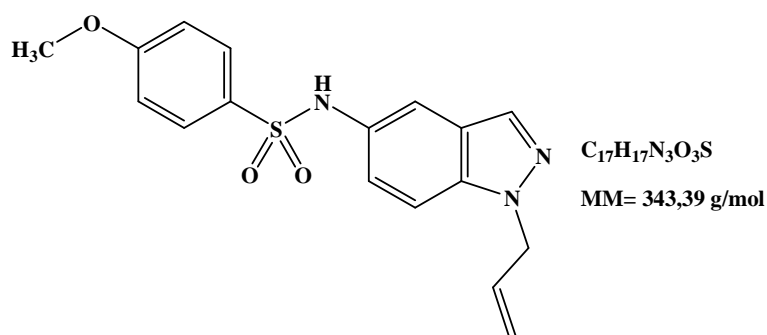


PF : 130-132 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 1,24 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 3,79 (s, 3H, CH₃O), 4,13 (q, 2H, CH₂O, J = 7,2 Hz), 4,95 (m, 2H, NCH₂), 5,12-5,28 (m, 2H, =CH₂), 5,94-6,07 (m, 1H, =CH), 6,81 (m, 3H, NH et 2H), 6,98 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,58 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 7,65 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,96 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 15,4 (CH₃), 51,8 (NCH₂), 55,5 (CH₃O), 67,7 (CH₂O), 102,6 (CH), 113,7 (2CH), 117,3 (C), 118,3 (=CH₂), 124,0 (C), 124,5 (CH), 129,3 (2CH), 130,8 (CH), 131,3 (C), 132,1 (CH), 133,7 (C), 161,4 (C), 162,9 (C).

***N*-(1-Allyl-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxy-benzènesulfonamide (26d)**



PF : 96-98 °C

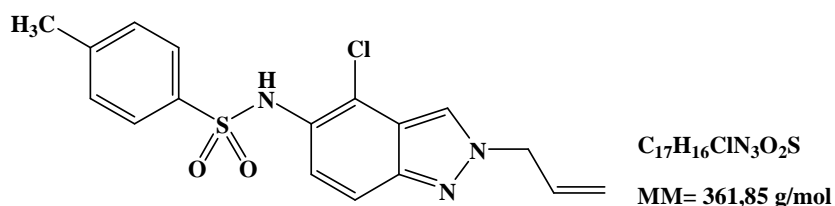
RMN¹H (DMSO-*d*₆): δ 3,73 (s, 3H, CH₃O), 4,96 (m, 2H, NCH₂), 5,02-5,12 (m, 2H, =CH₂), 5,87-5,97 (m, 1H, =CH), 6,98 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,09 (dd, 1H, J = 9,0 Hz et 2,1 Hz), 7,40 (d, 1H, J = 2,1 Hz), 7,47 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,61 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,97 (s, 1H, H-3), 9,95 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 51,3 (NCH₂), 56,0 (CH₃O), 110,8 (CH), 112,8 (CH), 113,2 (2CH), 117,5 (=CH₂), 122,5 (CH), 124,1 (C), 129,3 (2CH), 131,2 (C), 131,5 (CH), 133,1 (CH), 134,0 (C), 137,4 (C), 162,7 (C).

Les données du monocristal du composé **26d** sont reportées dans le tableau suivant:

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	2C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃ S,0.5H ₂ O	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.042$ $wR(F^2) = 0.119$ $S = 1.01$ 4088 réflexions 266 paramètres 2 restrictions $\Delta\rho_{\max} = 0.15 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$ $\Delta\rho_{\min} = -0.17 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$
Masse moléculaire	704.81 g/mol	
Système cristallin	Monoclinique	
Groupe d'espace et Z	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i> (Z = 2)	
Paramètres de maille	$a = 8.2099 (7) \text{ \AA}$ $b = 13.8928 (12) \text{ \AA}$ $c = 15.0495 (14) \text{ \AA}$ $\beta = 92.327 (3)^\circ$	
Volume	$V = 1715.1 (3) \text{ \AA}^3$	
Radiation	K α du Mo	
μ	$= 0.21 \text{ mm}^{-1}$	
Température	$= 296 \text{ K}$	
Dimensions du monocristal	$0.38 \times 0.36 \times 0.25 \text{ mm}$	

***N*-(2-Allyl-4-chloro-2*H*-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzènesulfonamide (27c)**

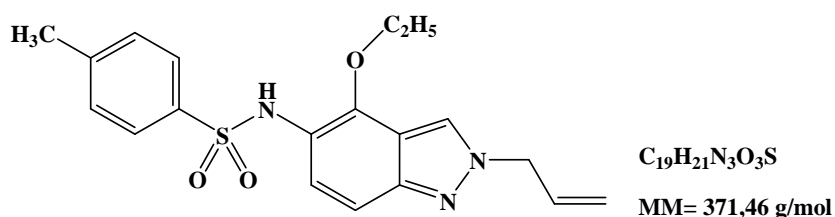


PF: 47-49 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 2,34 (s, 3H, CH₃), 5,02 (m, 2H, NCH₂), 5,33-5,40 (m, 2H, =CH₂), 6,03-6,16 (m, 1H, =CH), 6,90 (s, 1H, NH), 7,15 (d, 2H, J = 8,1 Hz), 7,58-7,67 (m, 4H), 7,87 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 21,6 (CH₃), 56,3 (NCH₂), 116,9 (CH), 119,6 (C), 120,8 (=CH₂), 122,9 (CH), 124,5 (CH), 127,3 (2CH), 127,7 (C), 129,0 (C), 129,6 (2CH), 131,2 (CH), 135,9 (C), 144,1 (C), 146,3 (C).

***N*-(2-Allyl-4-éthoxy-2*H*-indazol-5-yl)-4-méthyl-benzènesulfonamide (28c)**



PF : 115-117°C

RMN¹H (DMSO-*d*₆): δ 1,10 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 2,30 (s, 3H, CH₃), 3,92 (q, 2H, CH₂O, J = 7,2 Hz), 4,98 (m, 2H, NCH₂), 5,15-5,23 (m, 2H, =CH₂), 5,98-6,06 (m, 1H, =CH), 7,05 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,27 (d, 2H, J = 7,8 Hz), 7,44 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,56 (d, 2H, J = 7,8 Hz), 8,21 (s, 1H, H-3), 9,96 (s, 1H, NH).

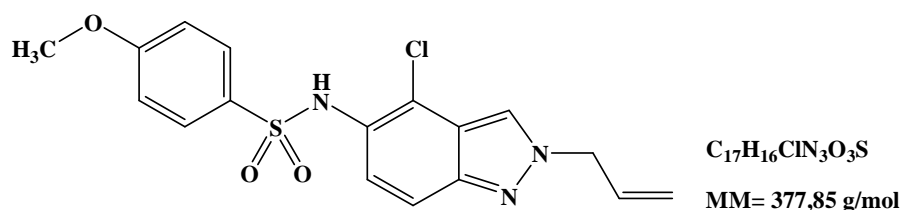
RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 15,6 (CH₃), 21,4 (CH₃), 55,6 (NCH₂), 67,4 (CH₂O), 111,0 (CH), 118,3 (CH), 119,0 (=CH₂), 117,3 (C), 124,0 (CH), 127,0 (2CH), 129,6 (2CH), 130,0 (CH), 131,4 (C), 133,8 (C), 137,1 (C), 143,0 (C), 146,4 (C).

Les données du monocristal du composé **28c** sont reportées dans le tableau suivant:

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	$C_{19}H_{21}N_3O_3S$	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.046$
Masse moléculaire	371.45g/mol	$wR(F^2) = 0.134$
Système cristallin	Monoclinique	$S = 1.07$

Groupe d'espace et Z	C2/c (Z = 8)	4059 réflexions
Paramètres de maille	a = 26.0808 (5) Å b = 7.9335 (2) Å c = 21.1573 (4) Å β = 122.839 (1)°	235 paramètres Δρ _{max} = 0.28 e Å ⁻³
Volume	V = 3678.13 (14) Å ³	Δρ _{min} = -0.36 e Å ⁻³
Radiation	K _α du Mo	
μ	= 0.20 mm ⁻¹	
Température	= 296 K	
Dimensions du monocristal	0.42×0.35×0.30 mm	

***N*-(2-Allyl-4-chloro-2*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxy-benzènesulfonamide (27d)**



PF : 98-100 °C

RMN¹H (DMSO-d₆): δ 3,78 (s, 3H, CH₃O), 5,03 (m, 2H, NCH₂), 5,18-5,25 (m, 2H, =CH₂), 6,02-6,11 (m, 1H, =CH), 7,02 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,06 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,51 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,56 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,37 (s, 1H, H-3), 9,73 (s, 1H, NH).

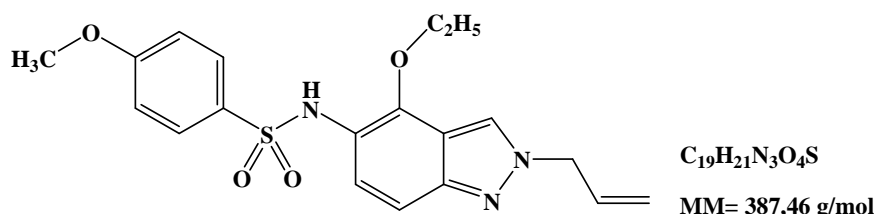
RMN¹³C (DMSO-d₆): δ 55,8 (CH₃O), 56,1 (NCH₂), 114,7 (2CH), 116,9 (CH), 119,3 (=CH₂), 121,0 (C), 121,9 (C), 124,5 (CH), 126,9 (C), 127,4 (CH), 129,4 (2CH), 132,5 (C), 133,6 (CH), 147,1 (C), 162,8 (C).

Les données du monocristal du composé **27d** sont reportées dans le tableau suivant:

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	C ₁₇ H ₁₆ ClN ₃ O ₃ S,0.5H ₂ O	R[F ² > 2σ(F ²)] = 0.047 wR(F ²) = 0.122 S = 1.02 4389 réflexions
Masse moléculaire	386.86g/mol	
Système cristallin	Monoclinique	
Groupe d'espace et Z	C2/c (Z = 8)	
Paramètres de maille	a = 23.5515 (9) Å	

	$b = 8.9081 (3) \text{ \AA}$ $c = 20.8278 (8) \text{ \AA}$ $\beta = 122.628 (2)^\circ$	231 paramètres $\Delta\rho_{\max} = 0.34 \text{ e \AA}^{-3}$ $\Delta\rho_{\min} = -0.33 \text{ e \AA}^{-3}$
Volume	$V = 3680.1 (2) \text{ \AA}^3$	
Radiation	K_{α} du Mo	
μ	$= 0.35 \text{ mm}^{-1}$	
Température	$= 296 \text{ K}$	
Dimensions du monocristal	$0.41 \times 0.38 \times 0.27 \text{ mm}$	

***N*-(2-Allyl-4-éthoxy-2*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxy-benzènesulfonamide (28d)**

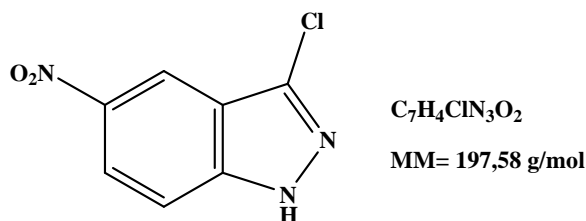


PF : 103-105 °C

RMN¹H (DMSO-d₆): δ 1,13 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 3,73 (s, 3H, CH₃O), 3,95 (q, 2H, CH₂O, J = 7,2 Hz), 4,97 (m, 2H, NCH₂), 5,14-5,22 (m, 2H, =CH₂), 6,00-6,10 (m, 1H, =CH), 6,86 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,06 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,45 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,61 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 8,21 (s, 1H, H-3).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 16,7 (CH₃), 55,6 (CH₃O), 56,1 (NCH₂), 67,4 (CH₂O), 111,1 (CH), 114,3 (2CH), 118,3 (C), 119,1 (=CH₂), 122,8 (C), 123,4 (CH), 127,1 (CH), 129,3 (2CH), 133,7 (CH), 132,8 (C), 145,7 (C), 149,2 (C), 162,7 (C).

Synthèse du 3-chloro-5-nitro-1*H*-indazole (29)



Mode opératoire : Dans un ballon de 100 ml, on place 1 g du 5-nitroindazole (1mol) et 2,46 g (3mol) de N- chlorosuccinimide dans 25 ml d'acétonitrile. Le mélange est porté au reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, le solvant est évaporé et le résidu est lavé

plusieurs fois à l'eau. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (Eluant : acétate d'éthyle/hexane 1/9).

Rendement : 87 %

PF : 208-210 °C

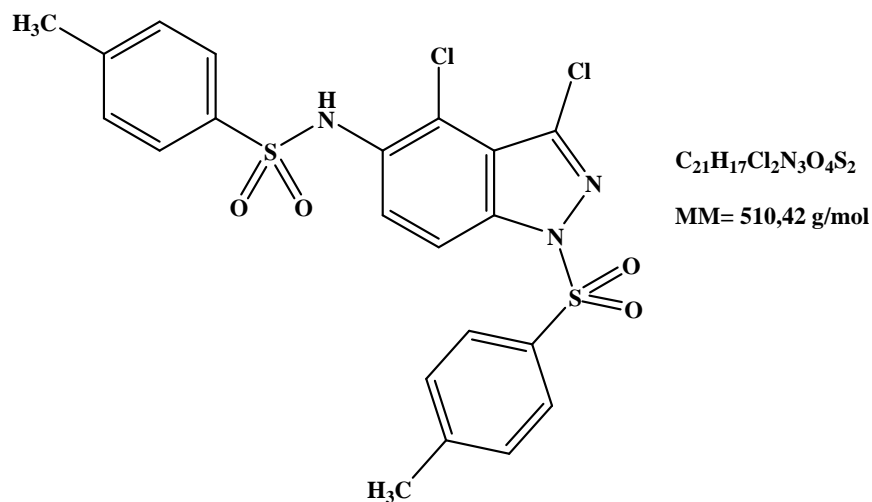
RMN ¹H (DMSO-d₆): δ 7,23 (d, 1H, *J* = 9,3 Hz), 8,22 (dd, 1H, *J* = 9,3 Hz, 2,4 Hz), 8,54 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz).

RMN ¹³C (DMSO-d₆): δ 112,7 (CH), 117,0 (CH), 122,6 (CH), 119,3 (C), 135,8 (C), 142,7 (C), 143,4 (C).

Synthèse des *N*-(3-chloro-1*H*-indazol-5-yl)-arylsulfonamides

Mode opératoire : 0,5 g (1 mmol) du 3-chloro-5-nitro-1*H*-indazole et 6 mmol de SnCl₂ anhydre sont mis en suspension dans 25 ml d'éthanol absolu. Ce mélange est chauffé à 60 °C pendant 6h, puis le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et hydrolysé avec une solution aqueuse de carbonate de potassium 5% jusqu'à pH 7-8. La phase aqueuse est extraite trois fois à l'acétate d'éthyle et les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre, filtrées et concentrées. L'amine obtenue est dissoute immédiatement dans 5 ml de pyridine. On y ajoute la quantité équivalente (+10%) de chlorure d'aryle sulfonyle et le milieu réactionnel est abandonné sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Après l'évaporation de la pyridine, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : dichlorométhane).

***N*-(3,4-Dichloro-1-(toluene-4-sulfonyl)-1H-indazol-5-yl)-4-méthylbenzène-sulfonamide (30a)**

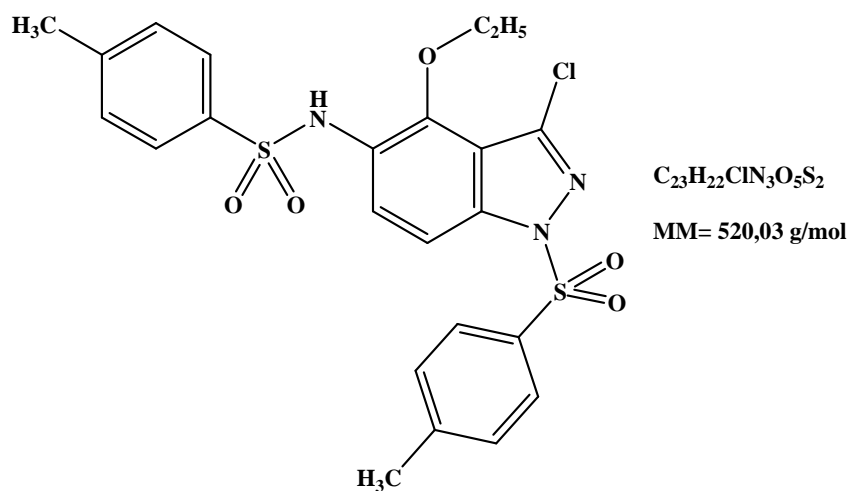


PF: 62-64 °C

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 2,43 (s, 3H, CH_3), 2,48 (s, 3H, CH_3), 7,17 (s, 1H, NH), 7,20-7,32 (m, 4H), 7,68 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,78-7,94 (m, 4H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 21,7 (CH_3), 21,8 (CH_3), 111,8 (CH), 123,7 (CH), 125,6 (C), 127,0 (2CH), 127,3 (2CH), 128,0 (C), 129,6 (2CH), 129,9 (2CH), 131,5 (C), 134,4 (C), 136,1 (C), 141,2 (C), 142,3 (C), 143,2 (C), 145,2 (C).

***N*-[3-Chloro-4-éthoxy-1-(toluène-4-sulfonyl)-1H-indazol-5-yl]-4-méthylbenzène sulfonamide (31a)**

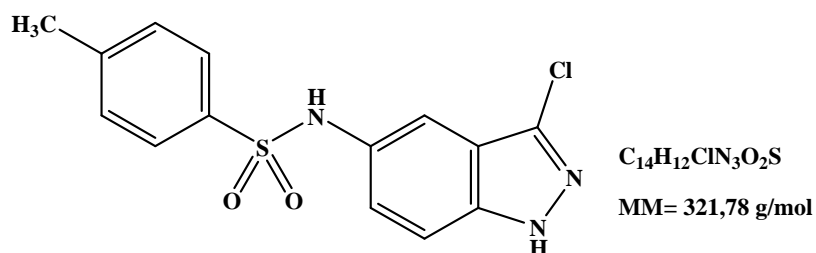


PF : 160-192 °C

RMN ¹H (DMSO-d₆): δ 1,32 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 2,36 (s, 3H, CH₃), 2,39 (s, 3H, CH₃), 3,65 (q, 2H, CH₃O, J = 7,2 Hz), 6,97 (s, 1H, NH), 7,22-7,29 (m, 4H), 7,67 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,84-7,93 (m, 4H).

RMN ¹³C (DMSO-d₆): δ 15,4 (CH₃), 21,5 (CH₃), 21,7 (CH₃), 73,2 (CH₂O), 109,7 (CH), 124,4 (CH), 126,8 (C), 127,1 (2CH), 127,8 (2CH), 129,8 (2CH), 128,9 (C), 130,1 (2CH), 130,4 (C), 133,8 (C), 136,0 (C), 140,2 (C), 141,5 (C), 144,0 (C), 146,1 (C).

***N*-(3-Chloro-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthylbenzènesulfonamide (32a)**

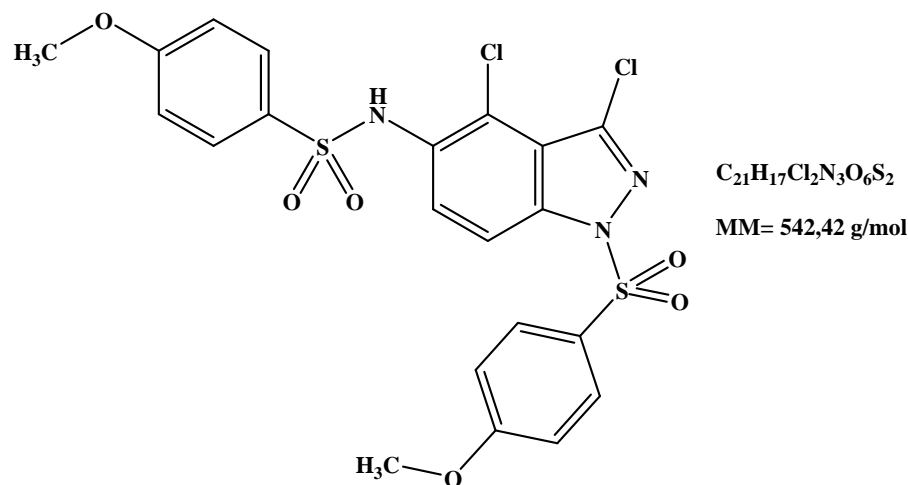


PF : 178-180 °C

RMN ¹H (DMSO-d₆): δ 2,28 (CH₃), 7,17 (dd, 1H, J = 9,0 Hz, 1,8 Hz), 7,24 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 7,28 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,42 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,58 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 10,19 (s, 1H, NH), 13,25 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (DMSO-d₆): δ 21,4 (CH₃), 109,9 (CH), 112,4 (CH), 119,9 (C), 123,6 (CH), 127,2 (2CH), 130,1 (2CH), 132,1 (C), 136,8 (C), 139,1 (C), 143,7 (C).

***N*-[3,4-Dichloro-1-(4-méthoxy-benzènesulfonyl)-1*H*-indazol-5-yl]-4-méthoxy-benzène sulfonamide (30b)**

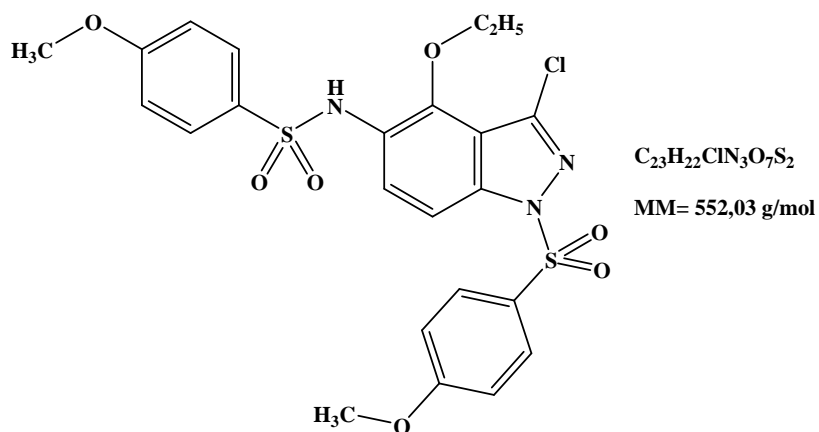


PF : 70-72 °C

RMN ¹H (CDCl₃): δ 3,82 (s, 3H, CH₃O), 3,84 (s, 3H, CH₃O), 6,86 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz), 6,94 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 6,97 (s, 1H, NH), 7,65 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 7,90 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,93 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 8,08 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃): δ 55,6 (CH₃O), 55,8 (CH₃O), 112,7 (CH), 114,4 (2CH), 114,8 (2CH), 124,7 (C), 125,9 (CH), 129,4 (2CH), 127,8 (C), 130,0 (C), 130,3 (2CH), 133,1 (C), 139,8 (C), 140,2 (C), 141,5 (C), 163,6 (C), 164,7 (C).

***N*-[3-Chloro-4-éthoxy-1-(4-méthoxy-benzènesulfonyl)-1H-indazol-5-yl]-4-méthoxy
benzènesulfonamide (31b)**

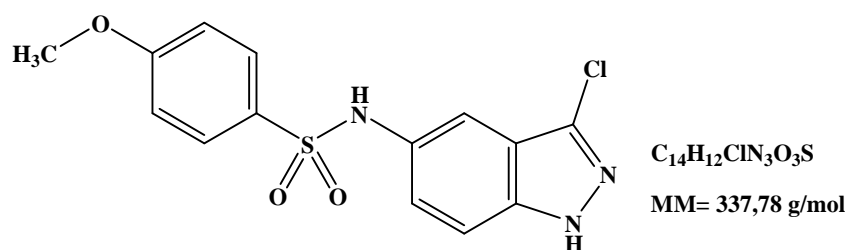


PF: 115-117 °C

RMN ¹H (DMSO-*d*₆): δ 1,05 (t, 3H, CH₃, *J* = 7,2 Hz), 3,74 (s, 3H, CH₃O), 3,77 (s, 3H, CH₃O), 4,28 (q, 2H, CH₂O, *J* = 7,2 Hz), 7,01 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 7,06 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 7,47 (d, 1H, *J* = 9,3 Hz), 7,65 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 7,82 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 8,04 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 10,55 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 56,1 (CH₃O), 56,4 (CH₃O), 109,4 (CH), 114,9 (2CH), 115,7 (2CH), 123,6 (C), 125,2 (CH), 127,2 (C), 129,4 (2CH), 130,0 (C), 130,3 (2CH), 131,0 (C), 136,2 (C), 137,9 (C), 141,5 (C), 163,1 (C), 164,9 (C).

***N*-(3-Chloro-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxybenzènesulfonamide (32b)**



PF : 171-173 °C

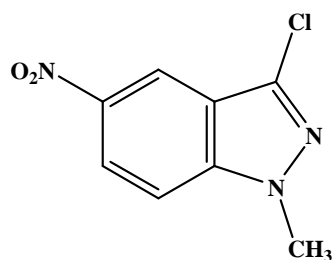
Les données du monocristal du composé **32b** sont reportées dans le tableau suivant :

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	$C_{14}H_{12}ClN_3O_3S$	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.040$ $wR(F^2) = 0.117$ $S = 1.03$ 4666 réflexions 199 paramètres $\Delta\rho_{\max} = 0.63 \text{ e } \text{Å}^{-3}$ $\Delta\rho_{\min} = -0.49 \text{ e } \text{Å}^{-3}$
Masse moléculaire	337,78 g/mol	
Système cristallin	Monoclinique	
Groupe d'espace et Z	$P2_1/c$ (Z = 4)	
Paramètres de maille	a = 16.1229 (5) Å b = 10.0562 (3) Å c = 9.7955 (2) Å $\beta = 105.388$ (1)°	
Volume	V = 1531.26 (7) Å ³	
Radiation	K_{α} du Mo	
μ	= 0.40 mm ⁻¹	
Température	= 296 K	
Dimensions du monocristal	0.42×0.35× 0.28mm	

Synthèse des *N*-alkylés de 3-chloro-5-nitro-1*H*-indazole

Mode opératoire : 1 g (5,07 mmol) du 3-chloro-5-nitro-1*H*-indazole est dissout dans 15 ml de l'acétone, on ajoute 0,31 g (1,1 mol) d'hydroxyde de potassium, puis on laisse le mélange sous l'agitation à 0°C pendant 15 min. Après on ajoute la quantité équivalente d'agent alkylant (Iodo-méthane et bromure d'allyle) avec un léger excès (10%). Après une heure d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous la pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane : 3/7).

3-Chloro-1-méthyl-5-nitro-1*H*-indazole (33a)



$C_8H_6ClN_3O_2$

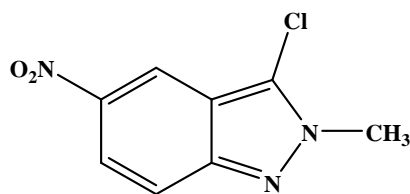
MM= 211,61 g/mol

PF : 197-199 °C

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 4,10 (s, 3H, NCH_3), 7,44 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz), 8,31 (dd, 1H, $J = 9,3$ Hz, 2,1 Hz), 8,66 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 36,4 (NCH_3), 109,8 (CH), 117,9 (CH), 120,5 (C), 122,5 (CH), 137,4 (C), 142,2 (C), 142,7 (C).

3-Chloro-2-méthyl-5-nitro-2*H*-indazole (34a)



$C_8H_6ClN_3O_2$

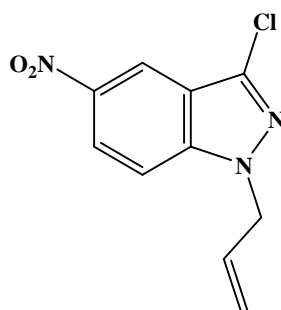
MM= 211,61 g/mol

PF : 140-142 °C

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 4,21 (s, 3H, NCH_3), 7,67 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz), 8,09 (dd, 1H, $J = 9,3$ Hz, 2,1 Hz), 8,61 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 38,2 (NCH_3), 117,9 (CH), 118,9 (CH), 121,1 (CH), 124,5 (C), 137,8 (C), 143,3 (C), 148,7 (C).

1-Allyl-3-chloro-5-nitro-1*H*-indazole (33b)



$C_{10}H_8ClN_3O_2$

MM= 237,64 g/mol

PF : 44-46 °C

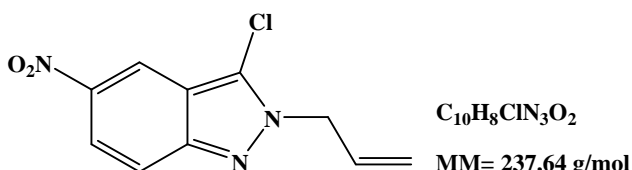
RMN ¹H (CDCl₃): δ 4,99-5,03 (m, 2H, =CH₂), 5,19-5,34 (m, 2H, NCH₂), 5,95-6,09 (m, 2H, =CH), 7,45 (d, 1H, *J* = 9,3 Hz), 8,29 (dd, 1H, *J* = 9,3 Hz, 2,1 Hz), 8,67 (d, 1H, *J* = 2,1 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃): δ 52,6 (NCH₂), 110,2 (CH), 117,9 (CH), 119,2 (=CH₂), 120,8 (C), 122,6 (CH), 131,3 (CH), 137,8 (C), 142,0 (C), 142,6 (C).

Les données du monocristal du composé **33b** sont reportées dans le tableau suivant:

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O ₂	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.047$ $wR(F^2) = 0.136$ $S = 1.02$ 3069 réflexions 145 paramètres $\Delta\rho_{\max} = 0.27 \text{ e } \text{Å}^{-3}$ $\Delta\rho_{\min} = -0.33 \text{ e } \text{Å}^{-3}$
Masse moléculaire	237,64 g/mol	
Système cristallin	Monoclinique	
Groupe d'espace et Z	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i> (<i>Z</i> = 4)	
Paramètres de maille	$a = 13.3025 (6) \text{ Å}$ $b = 11.2505 (5) \text{ Å}$ $c = 7.3092 (3) \text{ Å}$ $\beta = 91.343 (2)^\circ$	
Volume	$V = 1093.59 (8) \text{ Å}^3$	
Radiation	K _α du Mo	
μ	= 0.34 mm ⁻¹	
Température	= 296 K	
Dimensions du monocristal	0.41 × 0.34 × 0.22 mm	

2-Allyl-3-chloro-5-nitro-2H-indazole (34b)



PF : 58-60 °C

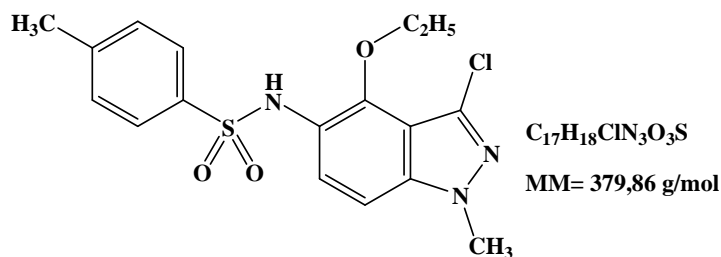
RMN ¹H (CDCl₃): δ 5,09-5,12 (m, 2H, =CH₂), 5,22-5,39 (m, 2H, NCH₂), 5,99-6,06 (m, 2H, =CH), 7,71 (d, 1H, *J* = 9,3 Hz), 8,10 (dd, 1H, *J* = 9,3 Hz, 2,1 Hz), 8,64 (d, 1H, *J* = 2,1 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃): δ 53,6 (NCH₂), 117,8 (C), 118,0 (CH), 119,2 (CH), 120,0 (=CH₂), 121,2 (CH), 130,2 (CH), 137,8 (C), 143,4 (C), 148,9 (C).

Synthèse des *N*-(1-alkyl-3-chloro-1*H*-indazol-5-yl)-arylsulfonamides

Mode opératoire : 1 mol de 1-alkyl-3-chloro-5-nitro-1*H*-indazole et 6 mol de SnCl₂ anhydre sont mis en suspension dans 25 ml d'éthanol absolu. Ce mélange est chauffé à 60 °C pendant 3-4h, puis le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et hydrolysé avec une solution aqueuse de carbonate de potassium 5% jusqu'à pH 7-8. La phase aqueuse est extraite trois fois à l'acétate d'éthyle et les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre, filtrées et concentrées. L'amine obtenue est dissoute immédiatement dans 5 ml de pyridine. On y ajoute la quantité équivalente (+10%) de chlorure d'aryle sulfonyle et le milieu réactionnel est abandonné sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Après l'évaporation de la pyridine, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : dichlorométhane).

N-(3-Chloro-4-éthoxy-1-méthyl-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthylbenzènesulfonamide (35a)

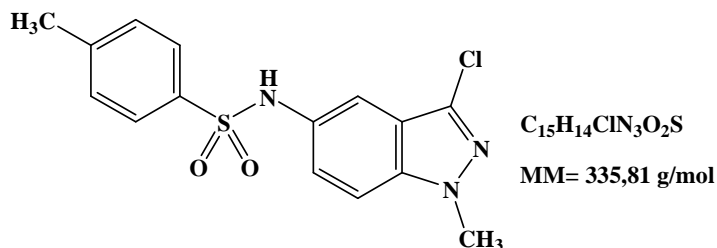


PF : 118-120 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 1,27 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 2,34 (s, 3H, CH₃), 3,62 (q, 2H, CH₂O, J = 7,2 Hz), 3,95 (s, 3H, NCH₃), 6,93 (s, 1H, NH), 7,06 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,18 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,62 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,75 (d, 1H, J = 9,0 Hz).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 15,4 (CH₃), 21,5 (CH₃), 36,0 (NCH₃), 72,5 (CH₂O), 105,7 (CH), 114,7 (C), 122,9 (C), 123,2 (CH), 124,4 (C), 127,1 (2CH), 129,7 (2CH), 136,2 (C), 141,2 (C), 141,8 (C), 144,0 (C).

N-(3-Chloro-1-méthyl-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthylbenzènesulfonamide (36a)



PF : 123-125 °C

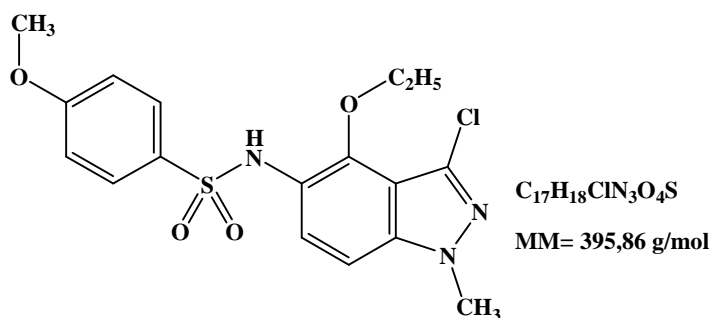
Produit confirmé par diffraction des rayons X

Les données du monocristal du composé **36a** sont reportées dans le tableau suivant:

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	C ₁₅ H ₁₄ ClN ₃ O ₂ S	R[F ² > 2σ(F ²)] = 0.048 wR(F ²) = 0.137 S = 1.04 7548 réflexions 398 paramètres Δρ _{max} = 0.36 e Å ⁻³ Δρ _{min} = -0.31 e Å ⁻³
Masse moléculaire	335,81 g/mol	
Système cristallin	Monoclinique	
Groupe d'espace et Z	P2 ₁ /n (Z = 8)	
Paramètres de maille	a = 8.4580 (13) Å b = 34.920 (6) Å c = 10.8333 (17) Å β = 97.226 (7)°	
Volume	V = 3174.2 (9) Å ³	
Radiation	K _α du Mo	
μ	= 0.38 mm ⁻¹	
Température	= 296 K	
Dimensions du monocristal	0.43×0.34×0.29 mm	

N-(3-Chloro-4-éthoxy-1-méthyl-1H-indazol-5-yl)-4-méthoxybenzènesulfonamide

(35b)



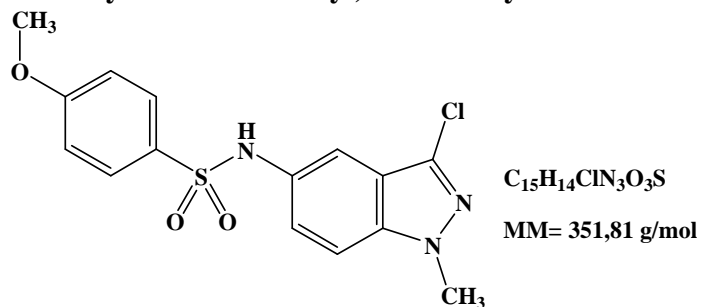
PF : 108-110 °C

Produit confirmé par diffraction des rayons X

Les données du monocristal du composé **35b** sont reportées dans le tableau suivant:

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	C ₁₇ H ₁₈ ClN ₃ O ₄ S	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.044$ $wR(F^2) = 0.128$ $S = 1.04$ 4353 réflexions 235 paramètres $\Delta\rho_{\max} = 0.51 \text{ e } \text{Å}^{-3}$ $\Delta\rho_{\min} = -0.62 \text{ e } \text{Å}^{-3}$
Masse moléculaire	395,86 g/mol	
Système cristallin	Triclinique	
Groupe d'espace et Z	P1 (Z=2)	
Paramètres de maille	$a = 8.5296 (9) \text{ Å}$ $b = 8.6165 (9) \text{ Å}$ $c = 12.9821 (14) \text{ Å}$ $\alpha = 91.810 (6)^\circ$ $\beta = 102.566 (5)^\circ$ $\gamma = 100.514 (5)^\circ$	
Volume	$V = 913.10 (17) \text{ Å}^3$	
Radiation	K α du Mo	
μ	$= 0.35 \text{ mm}^{-1}$	
Température	$= 296 \text{ K}$	
Dimensions du monocristal	0.40×0.36×0.31 mm	

***N*-(3-Chloro-1-méthyl-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxybenzènesulfonamide (36b)**

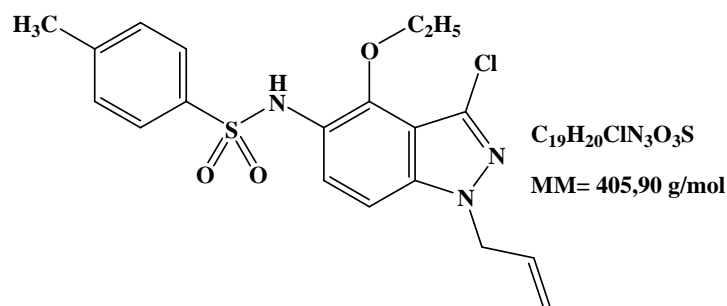


PF: 139-141 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 3,80 (s, 3H, CH₃O), 3,97 (s, 3H, NCH₃), 6,87 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,05 (s, 1H, NH), 7,21-7,31 (m, 3H), 7,64 (d, 2H, J = 9,0 Hz).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 35,9 (NCH₃), 55,6 (CH₃O), 110,2 (CH), 113,6 (CH), 114,2 (2CH), 121,1 (C), 124,7 (CH), 129,5 (2CH), 130,2 (C), 130,4 (C), 132,2 (C), 139,5 (C), 163,2 (C).

***N*-(1-Allyl-3-chloro-4-éthoxy-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthylbenzènesulfonamide (35c)**



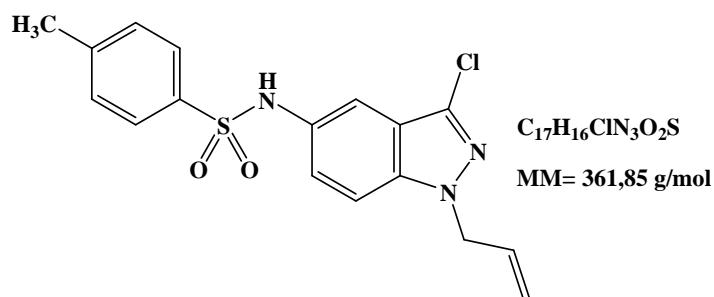
PF : 99-101 °C

Produit confirmé par diffraction des rayons X

Les données du monocristal du composé **35c** sont reportées dans le tableau suivant :

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	$C_{19}H_{20}ClN_3O_3S$	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.041$ $wR(F^2) = 0.126$ $S = 1.04$ 4792 réflexions 263 paramètres $\Delta\rho_{\max} = 0.42 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$ $\Delta\rho_{\min} = -0.35 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$
Masse moléculaire	405,90 g/mol	
Système cristallin	Triclinique	
Groupe d'espace et Z	P1 (Z=2)	
Paramètres de maille	$a = 10.0345 (2) \text{ \AA}$ $b = 10.5208 (2) \text{ \AA}$ $c = 10.7237 (2) \text{ \AA}$ $\beta = 69.601 (1)^\circ$ $\alpha = 71.561 (1)^\circ$ $\gamma = 83.039 (1)^\circ$	
Volume	$V = 1006.56 (3) \text{ \AA}^3$	
Radiation	K_α du Mo	
μ	$= 0.32 \text{ mm}^{-1}$	
Température	$= 296 \text{ K}$	
Dimensions du monocristal	$0.42 \times 0.35 \times 0.30 \text{ mm}$	

***N*-(1-Allyl-3-chloro-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthylbenzènesulfonamide (36c)**

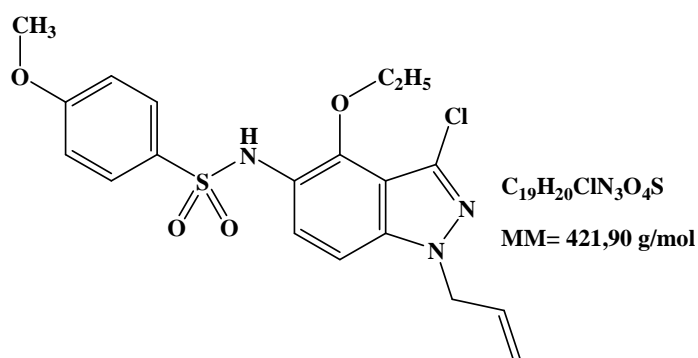


PF: 119-121 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 2,37 (s, 3H, CH₃), 4,88-4,91 (m, 2H, NCH₂), 5,13-5,25 (m, 2H, =CH₂), 5,90-9,01 (m, 1H, =CH), 7,04 (s, 1H, NH), 7,19-7,31 (m, 5H), 7,63 (d, 2H, J = 8,4 Hz).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 21,5 (CH₃), 52,2 (NCH₂), 110,5 (CH), 113,7 (CH), 118,5 (=CH₂), 121,5 (C), 124,7 (CH), 127,3 (2CH), 129,7 (2CH), 130,4 (C), 132,0 (CH), 132,8 (C), 135,8 (C), 139,0 (C), 144,0 (C).

***N*-(1-Allyl-3-chloro-4-éthoxy-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxybenzènesulfonamide (35d)**



PF : 122-124 °C

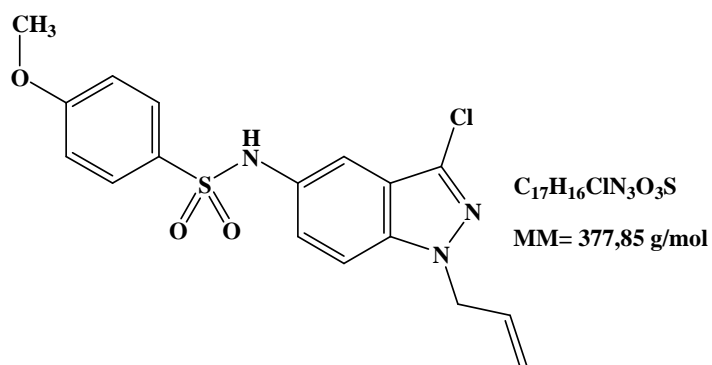
Produit confirmé par diffraction des rayons X

Les données du monocristal du composé **35d** sont reportées dans le tableau suivant:

Données cristallographiques		Affinement
Formule chimique	$C_{19}H_{20}ClN_3O_4S$	$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.035$
Masse moléculaire	421,89 g/mol	$wR(F^2) = 0.088$
Système cristallin	Monoclinique	S = 1.03
Groupe d'espace et Z	$P2_1$ (Z=2)	5605 réflexions

Paramètres de maille	a = 8.2699 (7) Å b = 13.1235 (12) Å c = 10.0026 (9) Å β = 110.379 (5)°	253 paramètres Δρ _{max} = 0.18 e Å ⁻³ Δρ _{min} = -0.20 e Å ⁻³
Volume	V = 1017.64 (16) Å ³	
Radiation	K _α du Mo	
μ	= 0.32 mm ⁻¹	
Température	= 296 K	
Dimensions du monocristal	0.42 × 0.32 × 0.28 mm	

***N*-(1-Allyl-3-chloro-1*H*-indazol-5-yl)-4-méthoxybenzènesulfonamide (36d)**



PF : 112-114 °C

RMN¹H (CDCl₃): δ 3,81 (s, 3H, CH₃O), 4,88-4,91 (m, 2H, NCH₂), 5,13-5,25 (m, 2H, =CH₂), 5,92-5,98 (m, 1H, =CH), 6,87 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 6,98 (s, 1H, NH), 7,18-7,31 (m, 1H), 7,67 (d, 2H, J = 9,0 Hz).

RMN¹³C (CDCl₃): δ 52,3 (NCH₂), 55,6 (CH₃O), 110,5 (CH), 113,7 (CH), 114,2 (2CH), 118,5 (=CH₂), 121,5 (C), 124,7 (CH), 129,5 (2CH), 130,3 (C), 130,5 (C), 132,0 (CH), 132,8 (C), 139,0 (C), 163,2 (C).

Chapitre III

**Etude de la Réduction du 3-Nitrophthalique Anhydride
avec SnCl_2 Dans Différents Alcools: Synthèse de
Nouveaux Dérivés de 2,1-Benzisoxazole**

La réduction des composés aromatiques nitrés en amines correspondantes est une transformation importante qui a fait l'objet de nombreux travaux de recherche dans le domaine de la synthèse organique. Dans des travaux antérieurs notre équipe s'est intéressée à la réduction des dérivés des nitroindazoles avec SnCl_2 anhydre dans différents alcools suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'arylsulfonyle en présence de la pyridine [1-3] (Schéma 1). Un nouveau type de transformation a été observé lors de la réduction des 4-, 6- et 7-nitroindazoles par SnCl_2 dans différents alcools. Deux produits ont été identifiés : les 4-, 6-, et 7-aminoindazoles attendus et les 4- et 7-alkoxyaminoindazoles observés pour la première fois dans cette série de composé. Dans cette réaction de réduction l'alcool réagit en tant que nucléophile suite à la réduction des dérivés de nitroindazole par SnCl_2 . Les aminoindazoles obtenus sont généralement instables, ils sont couplés immédiatement avec le chlorure d'arylsulfonyle pour accéder aux sulfonamides indazoliques qui ont montré des activités anticancéreuses très importantes [4-6].

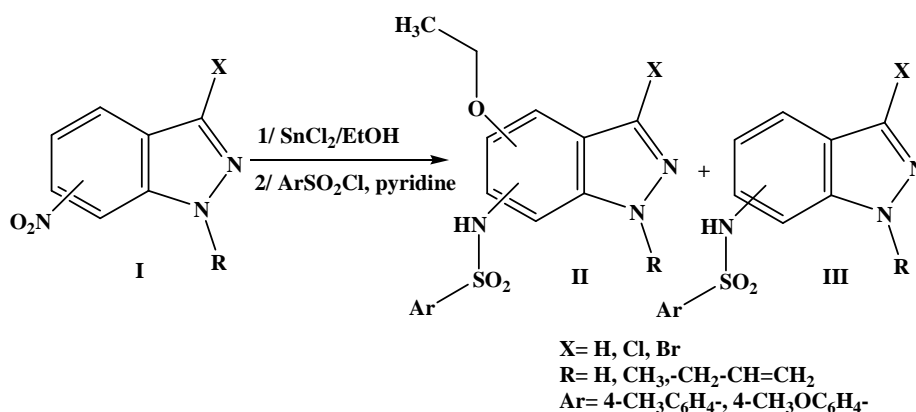


Schéma 1

1. L. Bouissane, S. El Kazzouli, J-M. Léger, C. Jarry, E. M. Rakib, M. Khouili, G. Guillaumet. *Tetrahedron*, **2005**, 61, 8218-8225.
2. N. Abbassi, E. M. Rakib, A. Hannioui, M. Alaoui, M. Benchidmi, E. M. Essassi, D. Geffken. *Heterocycles*, **2011**, 83 (4), 891-900.
3. N. Abbassi, E. M. Rakib, L. Bouissane, A. Hannioui, M. Khouili, A. El Malki, M. Benchidmi, and E. M. Essassi. *Synth. Commun.*, **2011**, 41, 999–1005.
4. L. Bouissane, S. El Kazzouli, S. Léonce, B. Pfeiffer, E. M. Rakib, M. Khouili, G. Guillaumet. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 1078–1088.
5. N. Abbassi, H. Chicha, E. M. Rakib, A. Hannioui, M. Alaoui, A. Hajjaji, D. Geffken, C. Aiello, R. Gangemi, C. Rosano, M. Viale. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 57, 240-249.
6. N. Abbassi, E. M. Rakib, H. Chicha, L. Bouissane, A. Hannioui, C. Aiello, R. Gangemi, P. Castagnola, C. Rosano, M. Viale. *Arch. Pharm. Chem.Life Sci.* **2014**, 347, 423-431.

Afin de généraliser les conditions de réduction mises au point précédemment, et pour examiner l'effet de la nature de la structure sur l'évolution de la réaction de réduction des dérivés nitrés par SnCl₂ dans ROH, nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à l'étude de la réduction du 3-nitrophtalique anhydride par le chlorure stanneux dans différents alcools et à l'évaluation pharmacologique des molécules synthétisées.

I- Synthèse de nouveaux 2,1-benzisoxazoles via la réduction du 3-nitrophtalique anhydride par SnCl₂ dans différents alcools.

Avant de présenter nos résultats expérimentaux nous donnons tout d'abord un aperçu bibliographique sur les méthodologies de synthèse et les propriétés biologiques des dérivés de 2,1-benzisoxazole. La chimie des dérivés de 1,2-benzisoxazole occupe un rôle extrêmement important dans les domaines pharmaceutique et médicinal [1-4]. Les composés 2,1-benzisoxazoles substitués sont largement utilisés comme anticonvulsivant [5], anti-psychothique [6,7] anticancéreux [8,9] anti-microbienne [10], anti-thrombotique [11], uricosuric [12], anti-inflammatoire [13], tuberculostatique [14], sédatif [15] et analgésique [16]. Plusieurs méthodes ont été développées pour accéder aux dérivés de 2,1-benzisoxazoles. Nous citons quelques exemples récents concernant la synthèse des 2,1-benzisoxazoles.

-
1. S. Batra, A.K. Roy, A. Patra, A. P. Bhaduri, W. R. Surin, S.A. V. Raghavan, P. Sharma, K. Kapoor, M. Dikshit, *Biorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 2059.
 2. H. Agirbas, S. Guner, F. Budak, S. Keceli, F. Kandemirli, N. Shvets, V. Kovalishyn, A. Dimoglo, *Biorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 2322.
 3. M. Pinho, M.V. D. Teresa, *Current Org Chem.*, **2005**, 9, 925.
 5. J. F. Swinbourne, H. J. Hunt, G. Klinkert, *Adv. Heterocycl. Chem.*, **1987**, 3, 103.
 6. D. D. Stiff, M.A. Zemaitis, *Drug Metab Dispos.*, **1990**, 18, 888.
 7. N. J. Hrib, J.G. Jurcak, K. L. Burgher, P.G. Conway, H. B. Hartman, L. L. Kerman, J. E. Roehr, A. T. Woods, *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 2308.
 8. M. Jain, C. H. Kwon, *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 5428.
 9. M. D. Scobie, *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 7008.
 10. H. D. Kendall, *J. Med. Chem.*, **1994**, 59, 7008.
 11. A. Nuhlich, M. Varache-Lembege, J. Vercauteren, R. Dokhan, P. Renard, G. Devaux, *Eur. J. Med. Chem.*, **1996**, 31, 957.
 12. A. Villalobos, J. F. Blake, C. K. Biggers, T.W. Butler, D. S. Chapin, Y. L. Chen, J. L. Ives, S. B Jones, D. R. Liston, *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 2721.
 13. J. Rajeev, D.D. Agarwal, Damodharan, *J. Indian Chem. Soc.*, **1995**, 72, 825.
 14. J. C. Saunder, W. R. N. Williamson, *J. Med. Chem.*, **1979**, 2, 1554.
 15. J. T. Strupczewski, R. C. Allen, B. A. Gardener, B. L. Schmid, U. Stache, E. J. Glamkowski, M.C. Jones, D. B. Ellis, F. P. Huger, R.W. Dunn, *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 761.
 16. P. B. Khedekar, R. H. Bahekar, R. S. Chopade, S. N. Umathe, A. R. Rao, K. P. Bhusari, *Drug Res.*, **2003**, 53, 640.

Ainsi, B. Boduszek et coll. [17] ont décrit la synthèse des dérivés de 3-amino-2,1-benzisoxazole par le clivage du phosphonate de 1-amino-2'-nitro-benzyle en milieu basique (Schéma 2). Les 2,1-benzisoxazoles **2** ont été obtenus avec de d'excellents rendements.

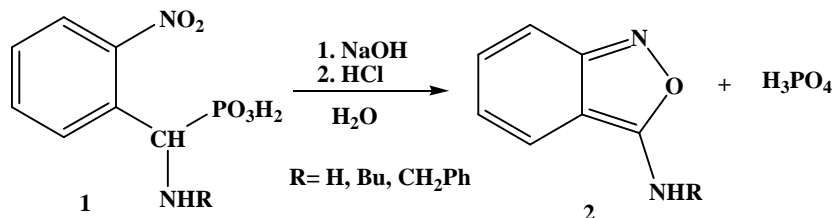


Schéma 2

Une autre méthode de synthèse, développée par B. H. Kim et coll. [7] consiste à faire cycliser les 2-nitroacylbenzènes **3** vers 2,1-benzisoxazoles **4** en présence de l'indium et 2-bromo-2-nitropropane (BNP) dans le mélange MeOH/H₂O (schéma 3). Cette méthodologie de synthèse a permis d'accéder aux 2,1-benzisoxazoles avec d'excellents rendements.

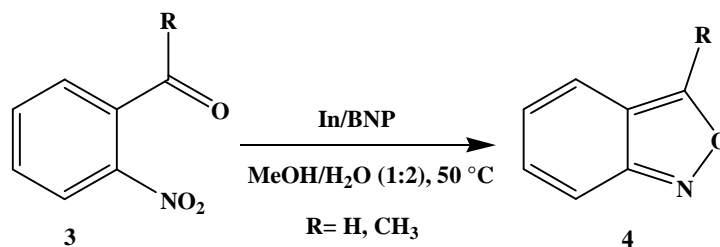


Schéma 3

Une étude similaire, effectuée par R. Han et coll. [19] basé sur la réduction des 2-nitroaryle aldéhydes et cétones **5** avec l'indium en présence de l'iode dans le méthanol, a permis d'obtenir les 2,1-benzisoxazoles **6** avec de bon rendement (Schéma 4):

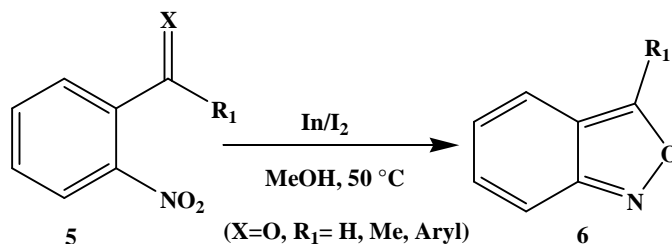


Schéma 4

17. B. Boduszek, A. Halama, J. Zoń. *Tetrahedron*, **1997**, 53, 11399.

18. B. H. Kim, Y. Jin, Y. M. Jun, R. Han, W. Baik, B. M. Lee. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 2137.

19. R. Han, K. I. Son, G. H. Ahn, Y. M. Jun, B. M. Lee, Y. Park, B. H. Kim. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 7295.

Récemment, J. Chauhan et coll [20] ont étudié la réaction tandem réduction/hétérocyclisation des 2-nitroacylbenzènes avec SnCl₂ hydraté en présence d'un mélange du solvant EtOAc / MeOH (1:1) (schéma 5).

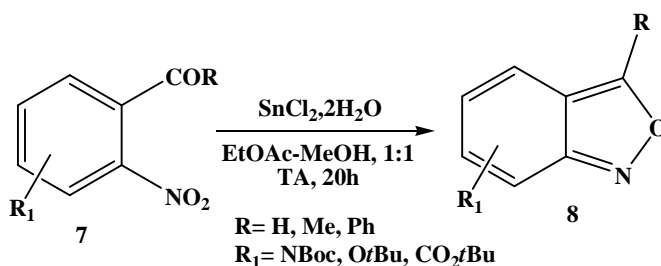


Schéma 5

K. S. Rangappa et coll. [21,22] ont synthétisé une nouvelle série de 6-fluoro-4-piperidinyl-1,2-benzisoxazole amides **11** à partir de l'intermédiaire 2,4-difluorobenzoyl-4-piperidine **9** (Schéma 6). Ils ont montré que les composés **11** présentent des activités antibactériennes prometteuses.

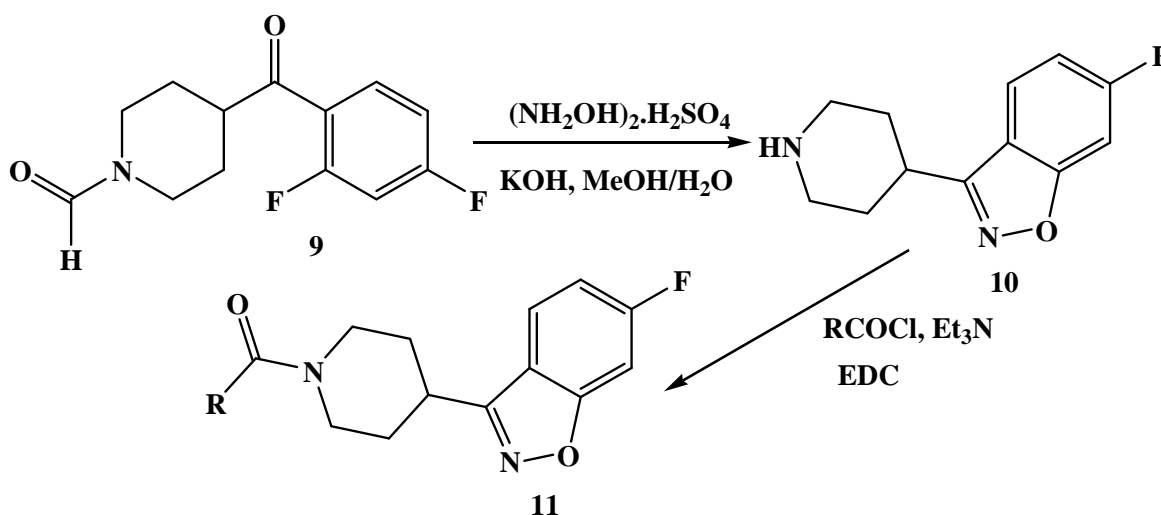


Schéma 6

Hoermann, en 2012, a décrit une autre méthode basée sur la conversion d'une série de 2-hydroxyaryliques cétoxyimes **12** en à 1,2-benzisoxazole 2-oxydes **13** par traitement avec du diacétate d'iodobenzène dans l'acide acétique ou méthanol [23] (schéma 7).

20. J. Chauhan, S. Fletcher. *Tetrahedron Lett.*, **2012**,53, 4951.

21. Basappa, K. Mantelingu, M. P. Sadashiva, K S Rangappa. *Indian J. Chem.* 43B, **2004**, 1954

22. B. S. Priya, Basappa, S. N. Swamy, K. S. Rangappa. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2623.

23. M. G. Kociolek, O. Hoermann. *Synth. Commun.* **2012**, 42, 2632.

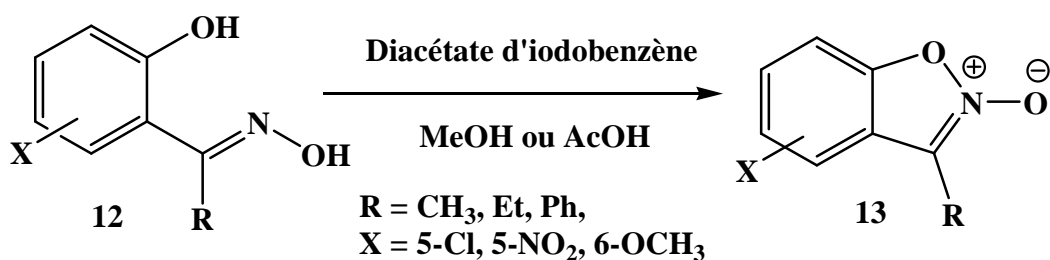


Schéma 7

Très récemment, le groupe indien [24] a développé une méthode de synthèse des 2-allylbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ones **15** par traitement de la 2-dihydroxybenzamide **14** avec le chlorure de thionyle dans THF puis avec le triéthylamine dans le dioxane à température de 5°C suivie de la réaction d'alkylation (Schéma 8). Les composés synthétisés sur la base de leur radical R ont montré des activités antioxydant et anticancéreuse importantes.

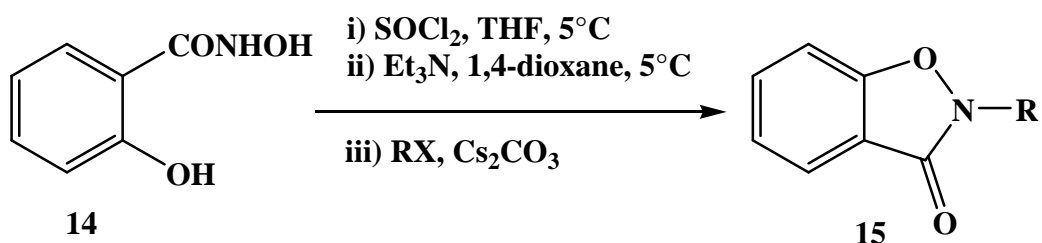


Schéma 8

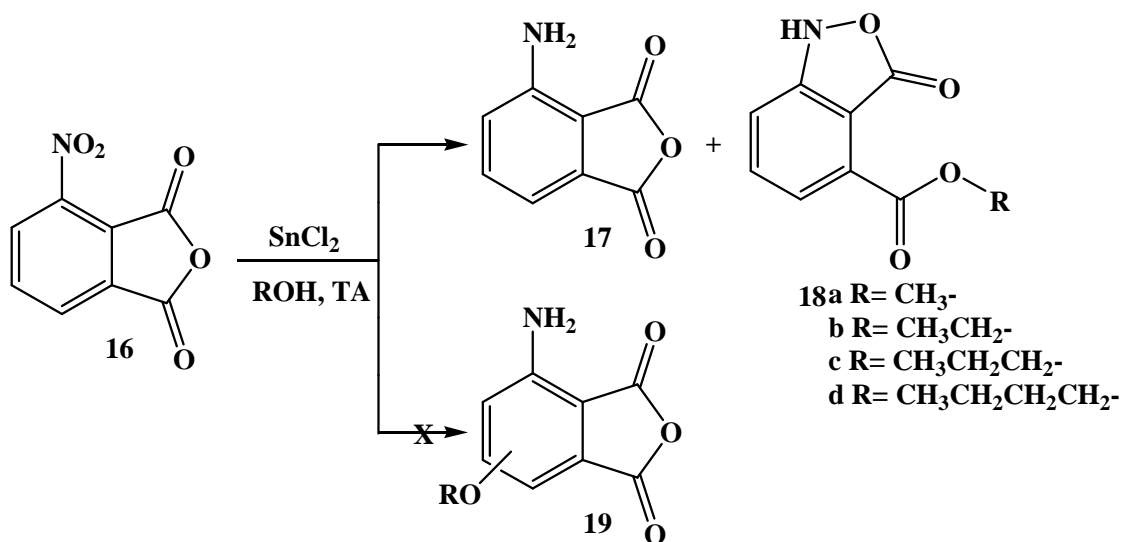
Ces exemples de la littérature fournissent des méthodes de synthèse des dérivés de 2,1-benzisoxazole diversifiés sur la nature de l'utilisation du précurseur de départ et les conditions opératoires adoptées pour chaque type de réaction. Les données bibliographiques montrent aussi que les dérivés de la 2,1-benzisoxazole occupent une place appréciable dans plusieurs domaines, notamment dans le domaine pharmaceutique. Aussi les modifications de structure de base de la 2,1-benzisoxazole, ont permis l'apparition de nouveaux dérivés présentant un large spectre d'activité biologique.

Après avoir rapporté des exemples qui illustrent la synthèse des 2,1-benzisoxazoles, nous rapportons dans le paragraphe suivant une nouvelle méthode de synthèse de nouveaux dérivés de la 2,1-benzisoxazole à partir de la réduction catalytique du 3-nitrophtalique anhydride par SnCl₂ dans différents alcools.

I-1 Réduction du 3-nitrophtalique anhydride par SnCl₂ dans différents alcools

L'action du chlorure d'étain anhydre, en excès, dans différents alcools sur le 3-nitrophtalique anhydride **16** à température ambiante, conduit à côté de l'amine correspondante **17** à un nouveau composé de type alkyl-3-oxobenzisoxazole-4-carboxylates **18a-d** (schéma 9). Les rendements des composés **17** et **18a-d** sont répertoriés dans le tableau 1.

Contrairement à ce qui a été observé dans le cas de la réaction de réduction des nitroindazoles par SnCl₂ dans différents alcools et qui a permis d'accéder à côté de l'amine correspondante aux dérivés alkoxyaminoindazoles, la réaction de réduction de 3-nitrophtalique anhydride **16** par les mêmes conditions citées précédemment n'a pas donné lieu à l'alkoxyaminophtalique anhydride **19**. Ce résultat montre que la nature de la structure joue un rôle fondamental pour l'obtention des dérivés alkoxy.



Les structures des composés **17** et **18a-d** ont été déterminées sur la base des données spectrales RMN¹H, RMN¹³C DEPT et SM. Dans les figures 1 et 2 nous présentons un exemple de spectres RMN¹H, RMN¹³C et DEPT des composés **18b** et **18c**.

Tableau 1: Le rendements des composés **17** et **18a-d** issus de la réaction de réduction du 3-nitrophtalique anhydride avec SnCl₂ dans différents alcools.

R	Rdt du composé 17	Rdt des composés 18a-d	Rdt global
CH ₃	42%	18a (44%)	86%
CH ₃ CH ₂ -	28%	18b (35%)	62%
CH ₃ CH ₂ CH ₂ -	31%	18c (36%)	67%
CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	26%	18d (37%)	63%

Les rendements des composés obtenus sont calculés après séparation par chromatographie sur colonne.

Les rendements des alkyl-3-oxobenzisoxazole-4-carboxylates **18a-d** sont meilleurs par rapport au 3-aminophtalique anhydride **17**. Le composé **18a** issu de la réduction du 3-nitrophtalique anhydride **16** dans le méthanol est obtenu avec un meilleur rendement (44%).

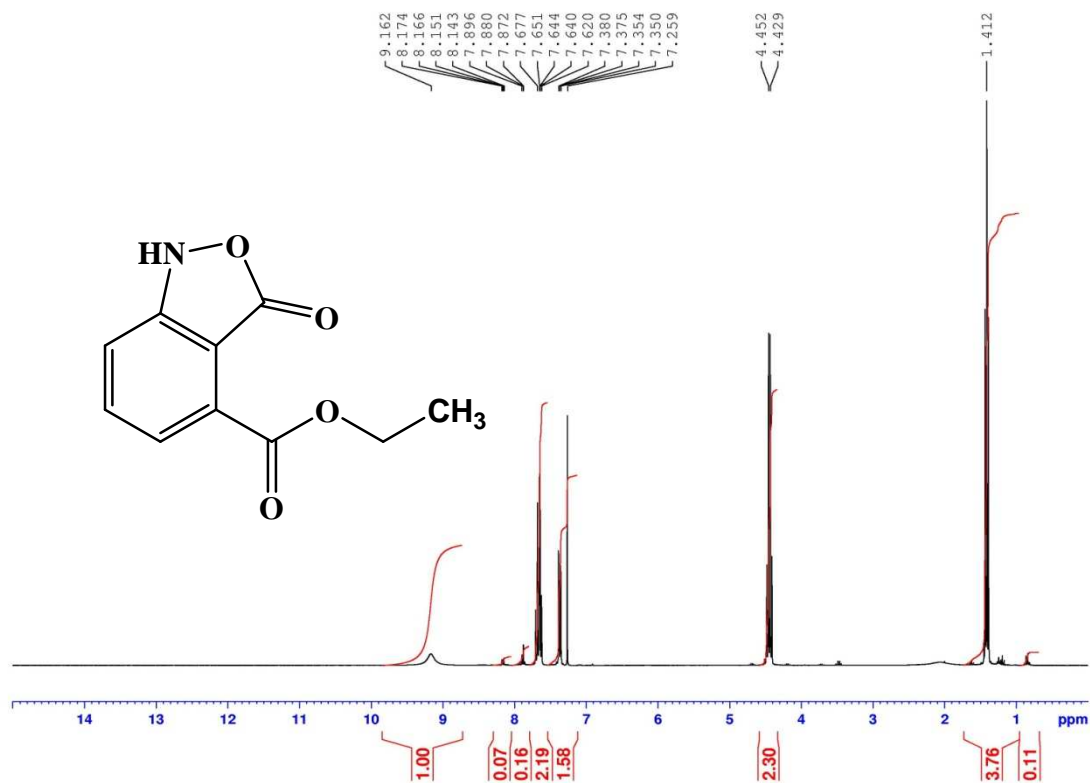


Figure 1 : Spectre RMN¹H du composé **18b**

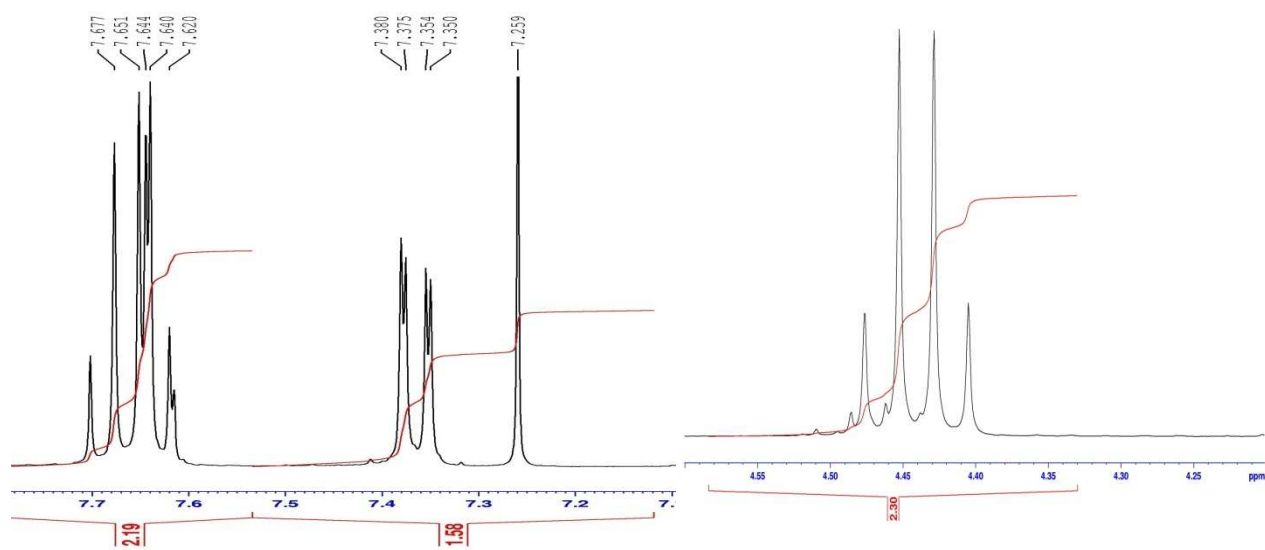


Figure 1 : Spectre RMN¹H étalé du composé **18b**

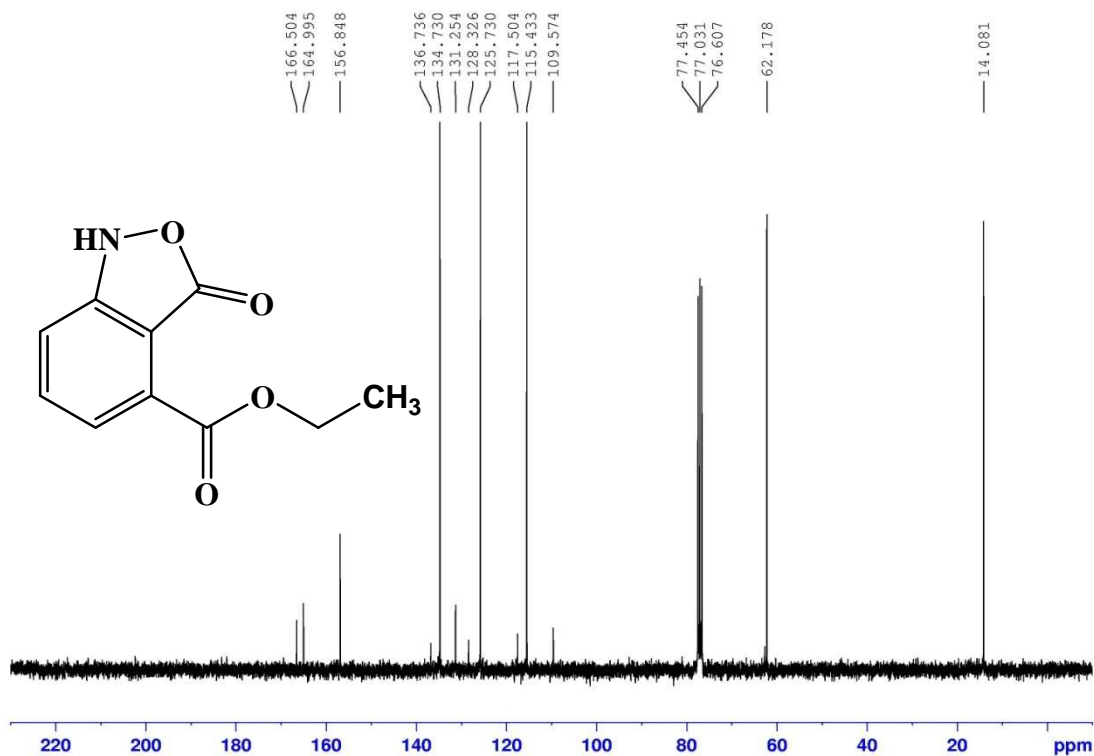


Figure 1 : Spectre RMN¹³C du composé **18b**

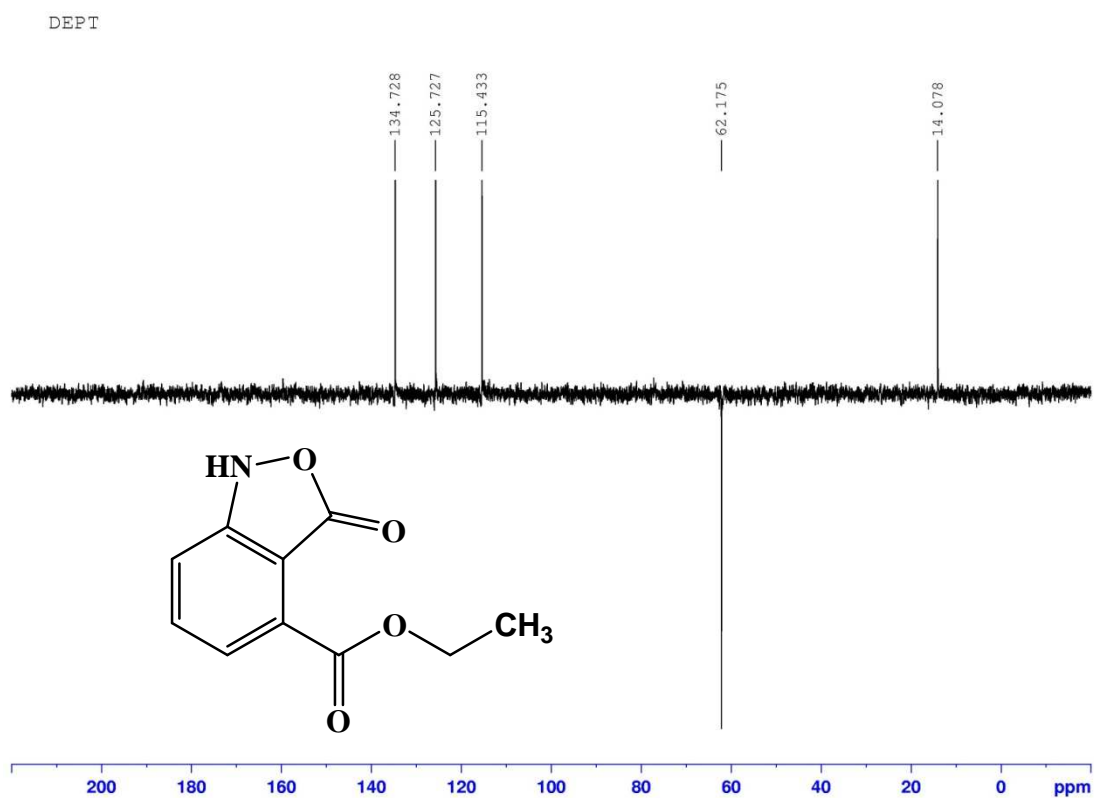


Figure 1 : Spectre RMN¹³C (DEPT) du composé **18b**

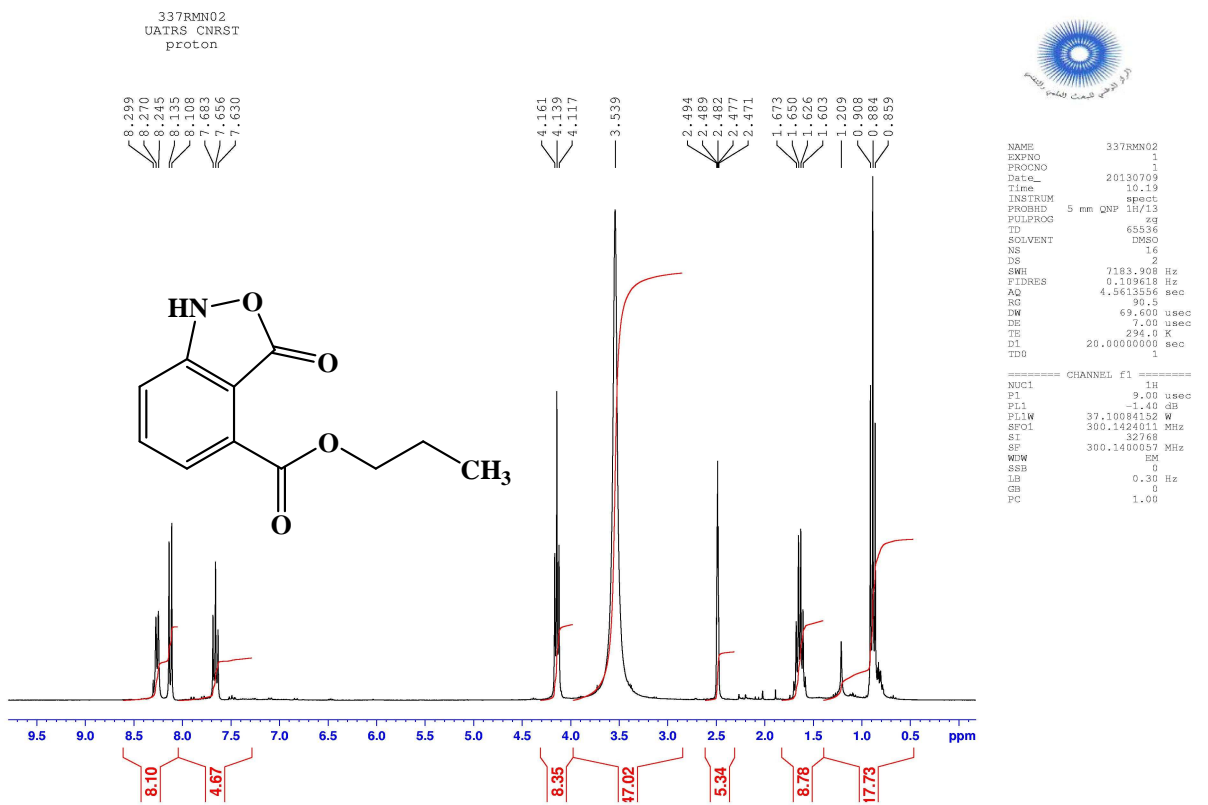


Figure 2 : Spectre RMN¹H du composé 18c

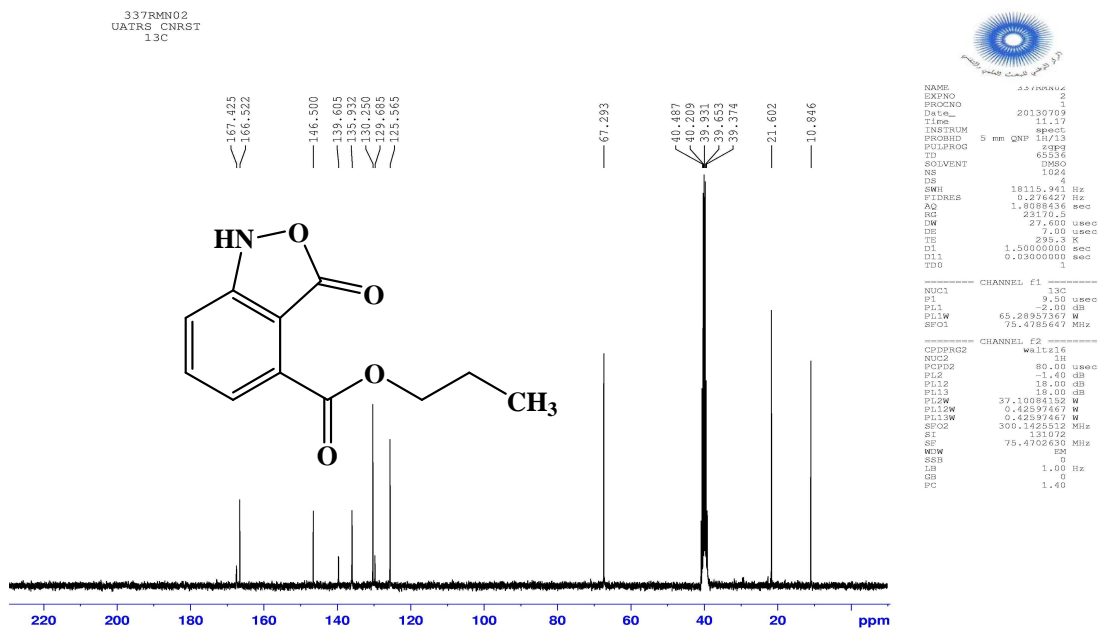


Figure 2 : Spectre RMN¹³C du composé 18c



Figure 2 : spectre RMN¹³C (DEPT) du composé **18c**

Pour expliquer la formation des alkyl-3-oxobenzisoxazole-4-carboxylates **18a-d**, nous avons proposé le mécanisme représenté sur le schéma 10. L'étape initiale de la réaction de réduction du composé **16** correspond à la formation de l'intermédiaire 5-hydroxylaminephtalique anhydride **A**. Ce dernier subit une cyclisation intramoléculaire et conduit à la formation de l'intermédiaire **B**. L'estérification de **B** conduit à l'obtention des 2,1-benzisoxazoles **18a-d**.

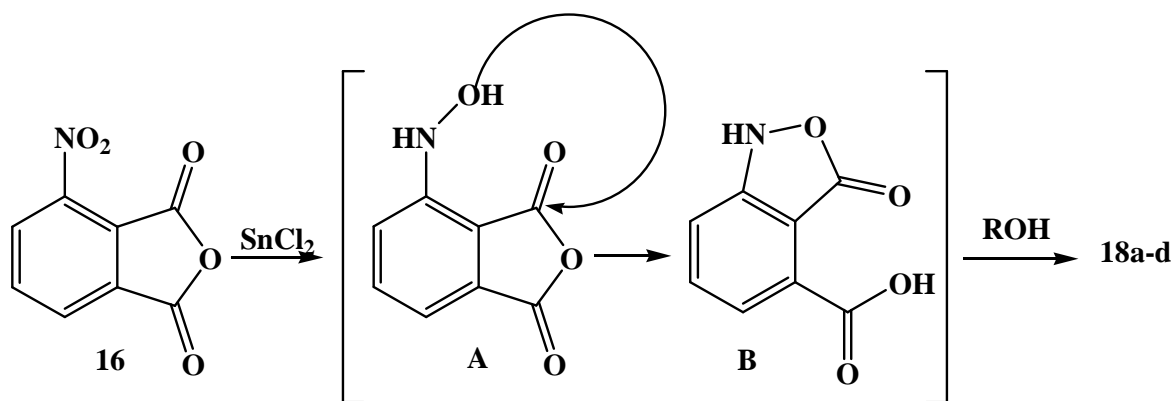


Schéma 10

Après ce premier résultat intéressant de la synthèse des alkyle-3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzisoxazole-4-carboxylates obtenus pour la première fois via la réaction de réduction du 3-nitrophtalique anhydride par SnCl_2 dans différents alcools, nous avons opté d'envisager d'autres conditions pour améliorer le rendement des dérivés de 2,1-benzisoxazole. Ainsi, le traitement de 3-nitrophtalique anhydride **16** par l'indium en présence de l'iode dans différents alcools selon le mode opératoire décrit par Kim et coll. [25] a permis d'obtenir les composés **18c,d** avec de bon rendements (schéma 11).

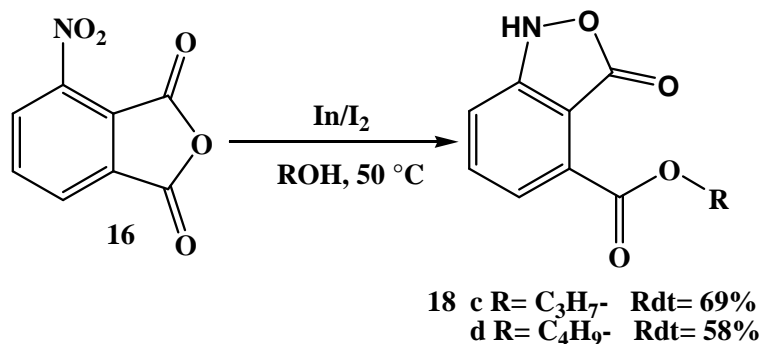


Schéma 11

Comme nous venons de le voir dans la partie bibliographique, les dérivés de la 2,1-benzisoxazole occupent une place notable dans plusieurs domaines, notamment dans le domaine pharmaceutique. Les modifications de structure de base de la 2,1-benzisoxazole, ont permis l'apparition de nouveaux dérivés présentant un large spectre d'activités biologiques. C'est dans ce contexte que nous sommes intéressés dans le paragraphe suivant à développer la synthèse de nouveaux alkyl-3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzisoxazoles substitués au niveau de la fonction NH par des arylsulfonyles et évaluer leur potentiel pharmacologique en tant que agent anticancéreux. Les produits de ce type de molécules contenant les arylsulfonyles ont montré des activités biologiques et pharmacologiques intéressantes. Nous citons à titre d'exemple la molécule benzo[d]isoxazol-3-ylmethanesulfonamide connue sous le nom Zonisamide utilisée comme drogue anti-épileptique [26].

25. R. Han, K. I. Son, G. H. Ahn, Y. M. Jun, B. M. Lee, Y. Park, B. H. Kim. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 7295.

26. J. C. Sackellares, P. D. Donofrio, J. G. Wagner, B. Abou-Khalil, S. Berent, K. Aasved-Hoyt, *Epilepsia* **1985**, 26, 206.

I-2 Synthèse des 1-arylsulfonyl-3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzisoxazoles

La réaction de réduction du 3-nitrophthalique anhydride **16** avec SnCl_2 dans différents alcools suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'arylsulfonyle en présence de la pyridine nous a permis d'isoler un mélange de deux produits : les alkyl-3-oxo-1,3-dihydro-1-arylsulfonyl-2,1-benzoxazole-4-carboxylates **20a-h** et les 4-(arylsulfonylamino)isobenzofuran-1,3-diones **21a,b** (Schéma 12). On observe une sélectivité meilleure en faveur des sulfonamides **20a-h** par rapport aux composés **21a,b** (tableau 2). Le rendement global des deux produits après séparation sur colonne de silice est excellent.

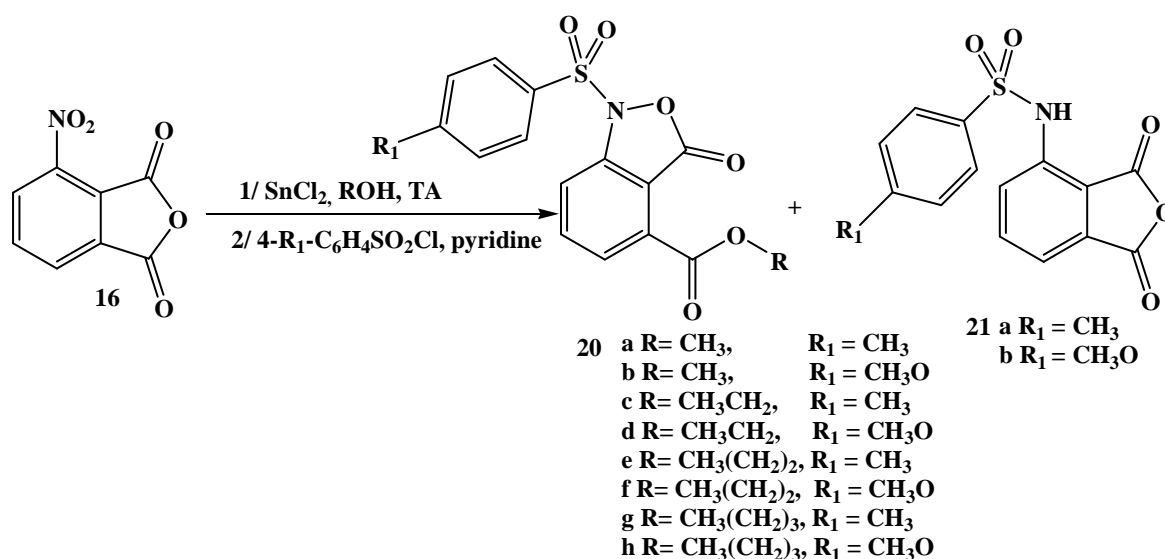


Schéma 12

Les structures des sulfonamides **20a-h** et **21a,b** ont été établies sur la base des données spectroscopiques RMN¹H, RMN¹³C, DEPT et SM. Nous présentons dans la figure 3 un exemple de spectres RMN¹H, RMN¹³C et DEPT du composé **20g**. En plus des données spectroscopiques de la RMN, la structure du composé **20d** a été confirmée sans ambiguïté par diffraction des rayons X (figure 4).

Tableau 2 : Réduction du composé **16** suivi du couplage par le chlorure d'arylsulfonyle.

R	R ₁	Rdt des composés 20a-h	Rdt des composés 21a,b
CH ₃	CH ₃	20a (42%)	21a (38%)
CH ₃	CH ₃ O	20b (46%)	21b (35%)
CH ₃ CH ₂	CH ₃	20c (40%)	21a (32%)
CH ₃ CH ₂	CH ₃ O	20d (48%)	21b (36%)
CH ₃ (CH ₂) ₂	CH ₃	20e (36%)	21a (26%)
CH ₃ (CH ₂) ₂	CH ₃ O	20f (50%)	21b (31%)
CH ₃ (CH ₂) ₃	CH ₃	20g (38%)	21a (19%)
CH ₃ (CH ₂) ₃	CH ₃ O	20h (46%)	21b (30%)

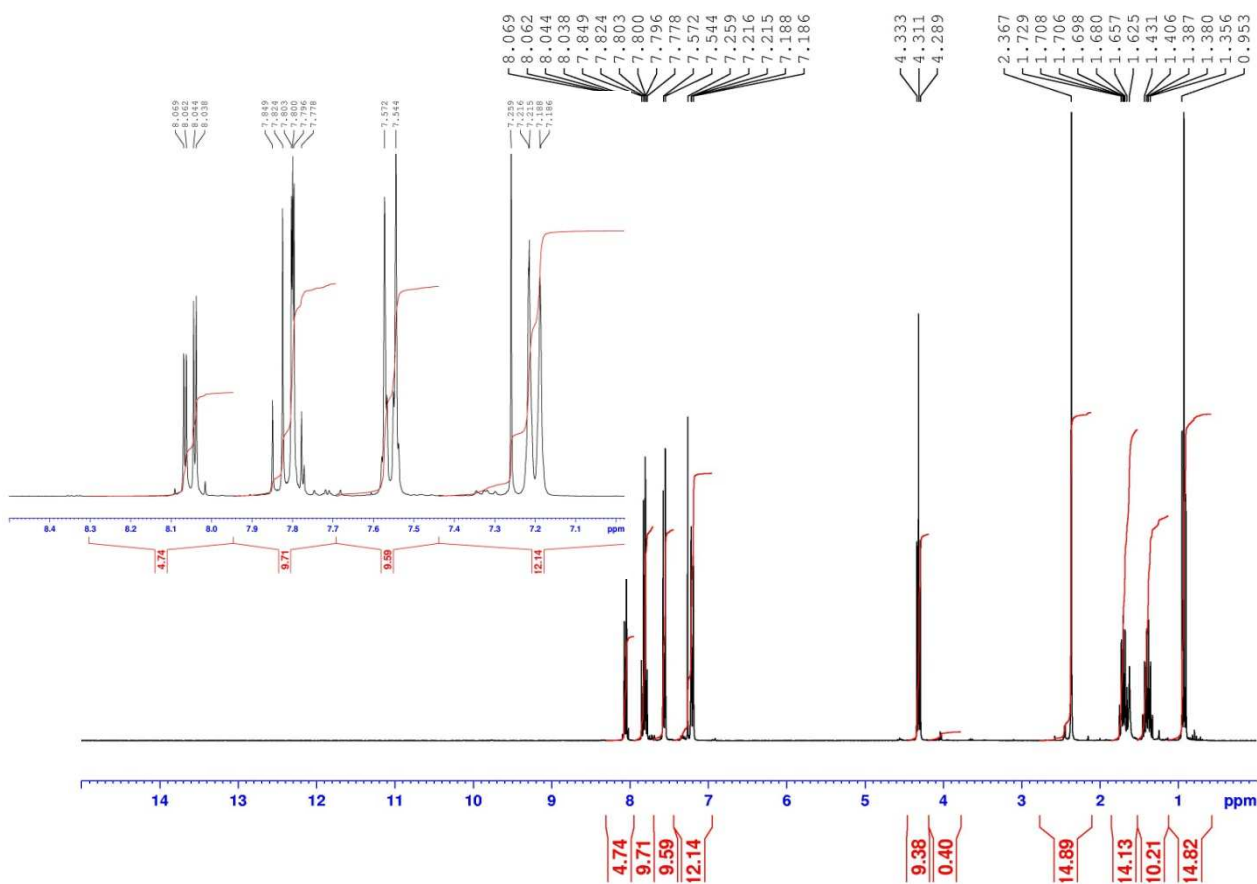


Figure 3 : Spectre RMN¹H du composé 20g

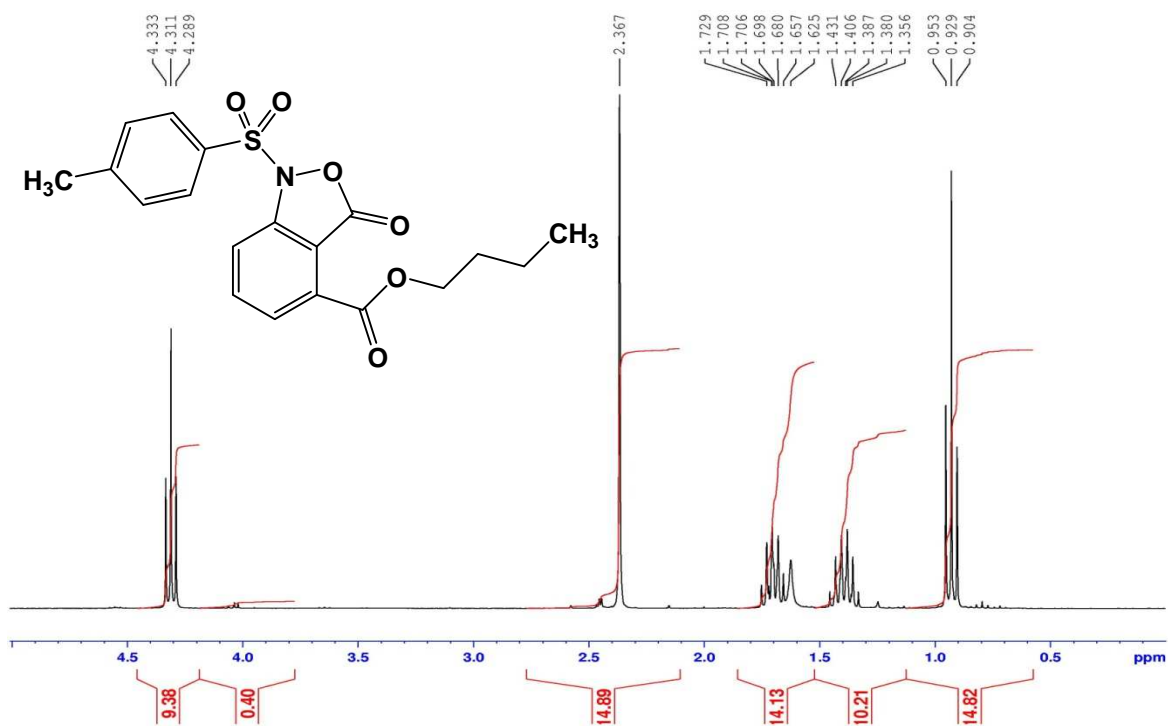


Figure 3: Spectre RMN¹H étalé du composé 20g

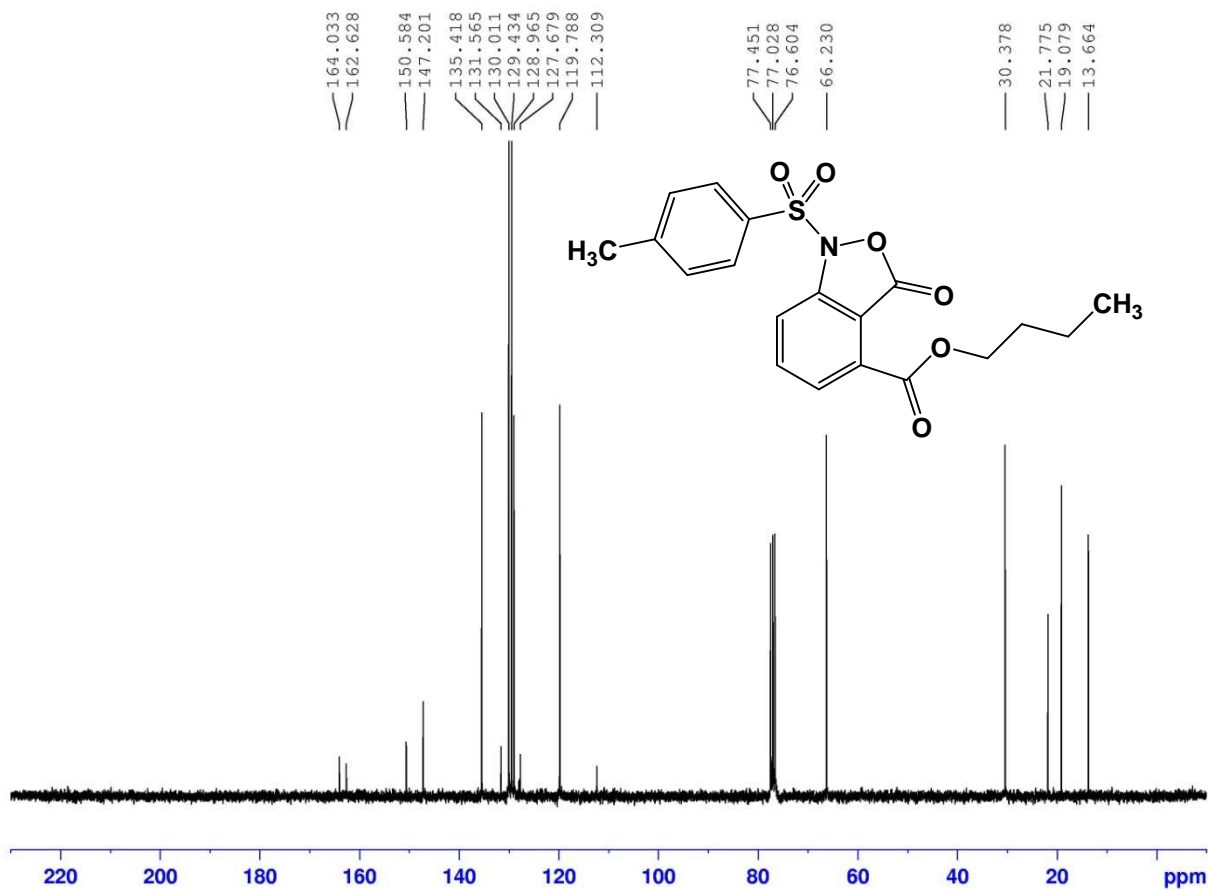


Figure 3 : Spectre RMN¹³C du composé 20g

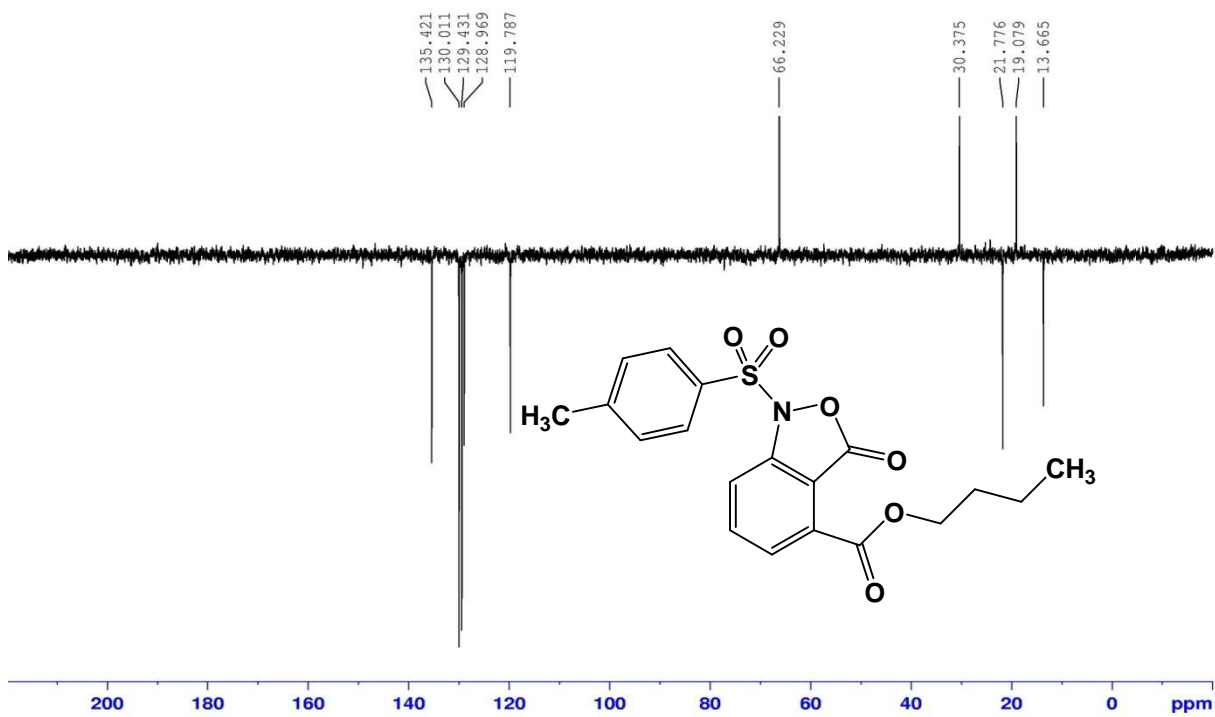


Figure 3 : Spectre RMN¹³C (DEPT) du composé 20g

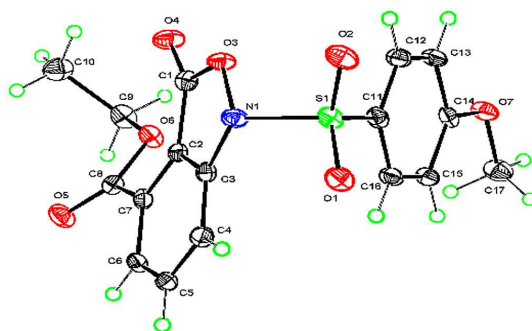


Figure 4 : Diagramme ORTEP du composé **20d**

II- Evaluation anticancéreuse de quelques dérivés de la 2,1-benzisoxazole

Les tests pharmacologiques préliminaires de quelques molécules dérivés de la 2,1-benzisoxazole ont été évalués *in vitro* sur deux lignées cellulaires tumorales: A2780 et A549. Les résultats sont exprimés en CI_{50} qui présente la concentration de la drogue inhibant 50% de la prolifération des cellules. Les CI_{50} sont données en μM . Les résultats de l'activité antiproliférative déterminée à l'aide du test colorimétrique MTT sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 3: Effet de quelques dérivés de l'alkyle 3-oxo-1,3-dihydro-1-arylsulfonyl-2,1-benzoxazole-4-carboxylate sur l'inhibition de la prolifération des cellules A2780 et A549

Composé	CI_{50} (μM) A2780	CI_{50} (μM) A549
<p>20c</p>	>100	>100
<p>20d</p>	>100	>100
<p>20h</p>	95.9±20.6	>100
<p>18a</p>	71.0±7.7	80.4±1.6

Les résultats obtenus montrent que les alkyl-3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzoxazole-4-carboxylates couplés avec l'arylsulfonyle **20c**, **20d** et **20h** présentent une activité antitumorale faible. Par contre le 2,1-benzisoxazole **18a** qui possède une fonction NH libre présente une activité antiproliférative significative. Les concentrations inhibitrices de **18a** contre les lignées cellulaires A2780 et A549 sont respectivement de l'ordre de 71,0 μM et 80,4 μM .

III- Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré que la réaction de réduction du 3-nitrophtalique anhydride avec le chlorure d'étain anhydre dans différents alcools suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'aryle sulfonyle, constitue une voie originale de synthèse de nouvelles molécules de type: alkyle 3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzisoxazole-4-carboxylates **18a-d** et alkyle 3-oxo-1,3-dihydro-1-arylsulfonyl-2,1-benzisoxazole-4-carboxylates **20a-h**. Nous avons proposé un mécanisme de formation des dérivés du 2,1-benzisoxazole à partir de la réduction du 3-nitrophtalique anhydride.

Nous avons envisagé un autre protocole expérimental qui a permis d'accéder aux alkyle 3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzisoxazole-4-carboxylates avec de meilleur rendement en utilisant l'indium comme catalyseur.

Les résultats préliminaires des tests biologiques sont encourageants. Le produit **18a** montre une activité antiproliférative significative contre les lignées cellulaires A2780 et A549.

Partie expérimentale

Les points de fusion non corrigés ont été pris en tube capillaire sur l'appareil Buchi-Tottoli. Toutes les masses molaires (MM) qui sont indiquées dans la partie expérimentale sont exprimées en grammes par mole.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés dans CDCl_3 , DMSO-d_6 et solution (sauf indication contraire) avec TMS comme référence interne en utilisant un appareil Bruker AC 300 (1H) ou 75MHz instruments (^{13}C). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence interne. La multiplicité des ressources de RMN ^{13}C ont été affectés par la mise en valeur sans distorsion par transfert des expériences de polarisation (DEPT).

Les spectres de masse à faible résolution (MS) ont été enregistrés sur un spectromètre Sciex API 3000 Perkin-Elmer.

La chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée sur des feuilles d'aluminium recouvertes de silice E.Merck 60 F254 (épaisseur 0,063-0.2 mm). La révélation des taches se fait sous une lampe UV. Les séparations chromatographiques flash sont effectuées sur gel de silice.

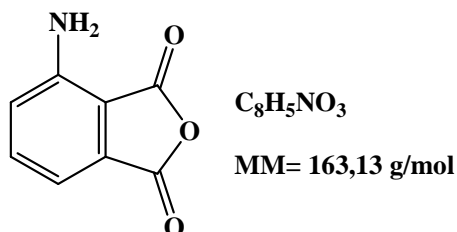
Les réactifs du commerce ont été utilisés sans aucune purification, sauf mention contraire.

Les spectres DRX-monocristal ont été enregistrés sur un diffractomètre Bruker X8 Apex II.

Mode opératoire général de la synthèse des alkyle 3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzisoxazole-4-carboxylates 17 et 18a-d

A 2,59 mmol du 3-nitrophthalique anhydride, on ajoute 15,5 mmol du chlorure d'étain (II) anhydride, les deux produits sont mis en solution dans 20 ml d'alcool (méthanol, éthanol, propanol ou butanol). L'agitation se fait à température ambiante pendant 6 heures. Le pH le mélange réactionnel est neutralisé pH= 7-8 avec l'addition de la solution de bicarbonate de potassium 5%. La solution est extraite avec l'acétate d'éthyle. La phase organique obtenue est séchée sur sulfate du magnésium anhydre et le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Acétate d'éthyle/Hexane : 1/9).

3-Aminophthalique anhydride (17)

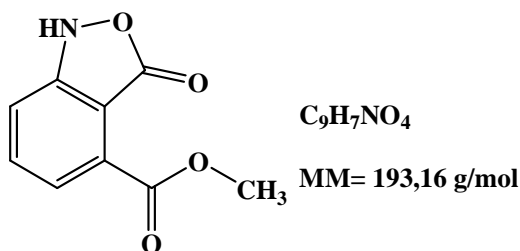


PF : 250-252 °C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 6.79 (s, 2H, NH_2), 7.08 (dd, 1H, H-Ar, $J = 0.64, 8.31$ Hz), 7.09 (dd, 1H, H-Ar, $J = 0.64, 7.18$ Hz), 7.56 (dd, 1H, $J = 7.18, 8.50$ Hz).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 108.0 (Cq), 112.6 (CH), 122.2 (CH), 131.3 (CH), 137.1 (Cq), 148.3 (Cq), 163.8 (CO), 163.9 (CO).

Méthyl 3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzisoxazole-4-carboxylate (18a)



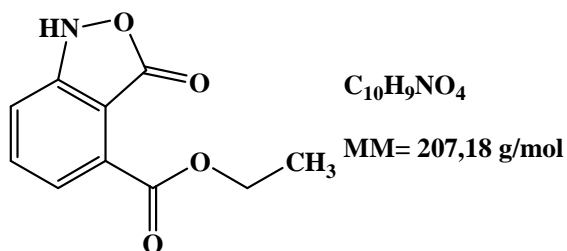
PF: 103-105 °C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 3.85 (s, 3H, CH_3O), 7.46-7.50 (m, 2H, HAr), 7.78 (t, 1H, HAr, $J = 7.5$ Hz), 12.02 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 52.9 (CH_3O), 107.2 (Cq), 115.5 (CH), 124.2 (CH), 130.6 (Cq), 135.7 (CH), 157.2 (Cq), 165.7 (CO), 166.6 (CO).

Spectre de masse : $m/z = 194 (M+H)^+$.

Ethyl 3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzisoxazole-4-carboxylate (18b)



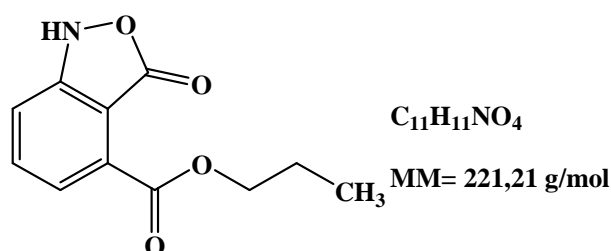
PF : 88-90 °C

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 1.41 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃), 4.44 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH₂O), 7.36 (dd, 1H, HAr, $J = 1.5, 7.5$ Hz), 7.62-7.70 (m, 2H, HAr), 9.16 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 14.1 (CH₃), 62.2 (CH₂O), 109.6 (Cq), 115.4 (CH), 125.7 (CH), 131.2 (Cq), 134.7 (CH), 156.8 (Cq), 165.0 (CO), 166.5 (CO).

Spectre de masse : $m/z = 208 (M+H)^+$.

Propyl 3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzisoxazole-4-carboxylate (18c)



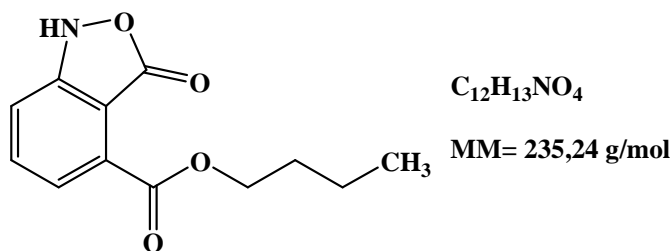
PF : 42-44 °C

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃), 1.60-1.67 (m, 2H, CH₂), 4.14 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH₂O), 7.65 (t, 1H, HAr, $J = 7.8$ Hz), 8.11 (d, 1H, HAr, $J = 8.1$ Hz), 8.25 (d, 1H, HAr, $J = 7.5$ Hz), 8.30 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 10.8 (CH₃), 21.6 (CH₂), 67.3 (CH₂O), 125.6 (CH), 129.6 (Cq), 130.2 (CH), 135.9 (CH), 139.6 (Cq), 146.5 (Cq), 166.5 (CO), 167.4 (CO).

Spectre de masse : $m/z = 222 (M+H)^+$.

Butyl 3-oxo-1,3-dihydro-2,1-benzisoxazole-4-carboxylate (18d)



PF : 44-46 °C

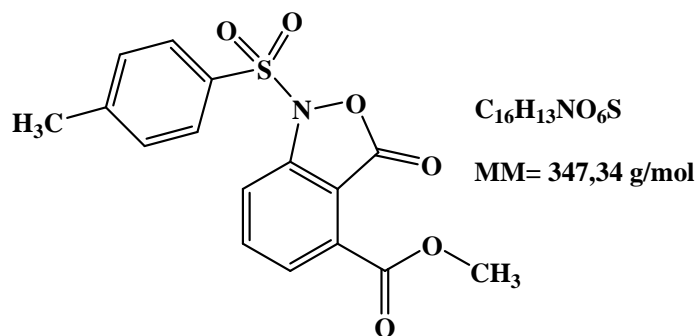
RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.94 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃), 1.42-1.50 (m, 2H, CH₂), 1.72-1.81 (m, 2H, CH₂), 4.38 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH₂O), 7.34 (dd, 1H, HAr, $J = 1.5, 7.5$ Hz), 7.61-7.69 (m, 2H, HAr), 9.10 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 13.7 (CH₃), 19.2 (CH₂), 30.4 (CH₂), 66.1 (CH₂O), 115.3 (CH), 125.8 (CH), 133.3 (Cq), 134.6 (CH), 147.9 (Cq), 148.4 (Cq), 156.7 (CO), 165.1 (CO).

Mode opératoire de la synthèse des alkyl 3-oxo-1,3-dihydro-1-arylsulfonyl-2,1-benzisoxazole-4-carboxylates

A 2,59 mmol du 3-nitrophtalique anhydride, on ajoute 15,5 mmol du chlorure d'étain (II) anhydride, les deux produits sont mis en solution dans 20 ml d'alcool (méthanol, éthanol, propanol ou butanol). L'agitation se fait à température ambiante pendant 6 heures. Le pH le mélange réactionnel est neutralisé pH= 7-8 avec l'addition de la solution de bicarbonate de potassium 5%. La solution est extraite avec l'acétate d'éthyle. La phase organique obtenue est séchée sur sulfate du magnésium anhydre et le solvant est évaporé. L'amine obtenue est dissoute immédiatement dans 5 ml de pyridine. On y ajoute 1,1 équivalent de chlorure d'arylsulfonyle et le milieu réactionnel est abandonné sous agitation à température ambiante pendant la nuit. Après évaporation de la pyridine, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (Acétate d'éthyle/Hexane : 1/9).

Methyl 3-oxo-1,3-dihydro-1-tosyl-2,1-benzisoxazole-4-carboxylate (20a)

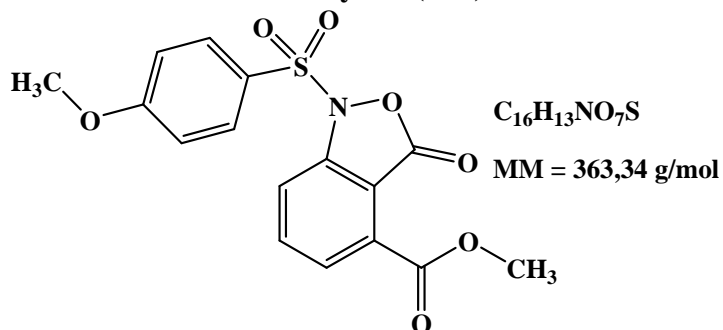


PF : 75-77°C

RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 2.37 (s, 3H, CH₃), 3.92 (s, 3H, CH₃O), 7.20 (d, 2H, HAr, $J = 8.4$ Hz), 7.56 (d, 2H, HAr, $J = 8.4$ Hz), 7.81-7.84 (m, 2H, HAr), 8.06 (dd, 1H, HAr, $J = 2.7, 6.7$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 21.8 (CH₃), 52.9 (CH₃O), 112.3 (Cq), 119.9 (CH), 127.7 (Cq), 129.1 (CH), 129.4 (2CH), 130.1 (2CH), 131.1 (Cq), 135.4 (CH), 147.3 (Cq), 150.6 (Cq), 162.6 (CO), 164.3 (CO).

Méthyl 3-oxo-1,3-dihydro-1-(4-méthoxy-benzènesulfonyl)-2,1-benzisoxazole-4-carboxylate (20b)

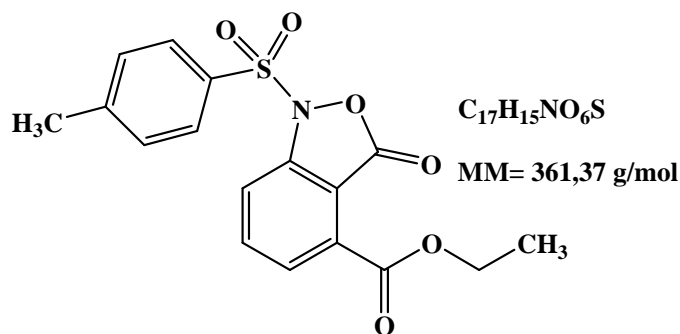


PF : 129-131°C

RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 3.82 (s, 3H, CH₃O), 3.91 (s, 3H, CH₃O), 6.84 (d, 2H, HAr, $J = 9$ Hz), 7.60 (d, 2H, HAr, $J = 9$ Hz), 7.79-7.86 (m, 2H, HAr), 8.05 (dd, 1H, HAr, $J = 2.4, 7.8$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 52.9 (CH₃O), 55.8 (CH₃O), 112.4 (Cq), 114.7 (2CH), 120.0 (CH), 121.6 (Cq), 129.1 (CH), 131.0 (Cq), 131.8 (2CH), 135.4 (CH), 150.8 (Cq), 162.8 (Cq), 164.3 (CO), 165.3 (CO).

Ethyl 3-oxo-1,3-dihydro-1-tosyl-2,1-benzisoxazole-4-carboxylate (20c)

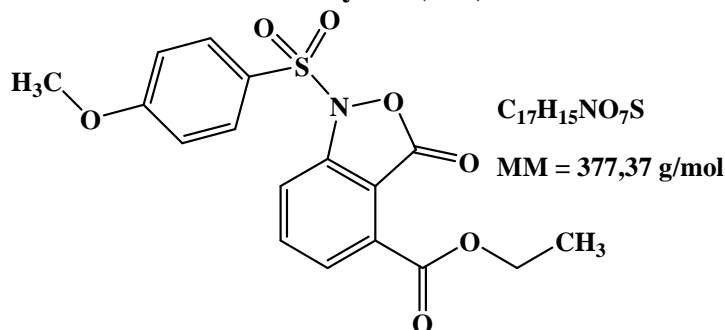


PF : 93-95°C

RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 1.38 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃), 2.37 (s, 3H, CH₃), 4.39 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH₂O), 7.20 (d, 2H, HAr, $J = 8.5$ Hz), 7.59 (d, 2H, HAr, $J = 8.5$ Hz), 7.75-7.79 (m, 2H, HAr), 8.05 (dd, 1H, HAr, $J = 2.2, 6.9$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 13.9 (CH₃), 21.8 (CH₃), 62.3 (CH₂O), 112.3 (Cq), 119.7 (CH), 127.7 (Cq), 128.9 (CH), 129.4 (2CH), 130.0 (2CH), 131.5 (Cq), 135.4 (CH), 147.2 (Cq), 150.5 (Cq), 162.6 (CO), 163.9 (CO).

Ethyl 3-oxo-1,3-dihydro-1-(4-méthoxy-benzènesulfonyl)-2,1-benzisoxazole-4-carboxylate (20d)

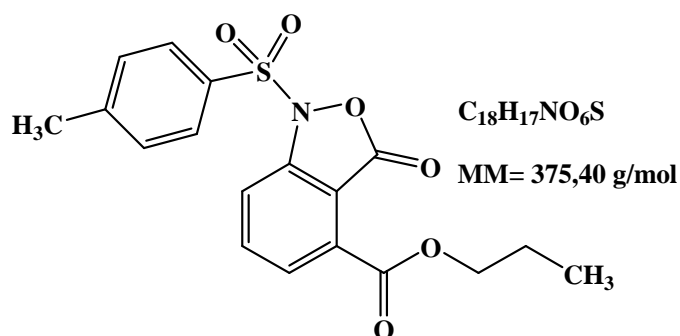


PF : 122-124°C

RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 1.36 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃), 3.82 (s, 3H, CH₃O), 4.37 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH₂), 6.84 (d, 2H, HAr, $J = 9$ Hz), 7.60 (d, 2H, HAr, $J = 9$ Hz), 7.78-7.84 (m, 2H, HAr), 8.05 (dd, 1H, HAr, $J = 3, 6.8$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 13.9 (CH₃), 55.8 (CH₃O), 62.3 (CH₂O), 112.4 (Cq), 114.6 (2CH), 119.8 (CH), 121.7 (Cq), 128.9 (CH), 131.5 (Cq), 131.8 (2CH), 135.4 (CH), 150.7 (Cq), 162.7 (Cq), 163.9 (CO), 165.2 (CO).

Propyl 3-oxo-1,3-dihydro-1-tosyl-2,1-benzisoxazole-4-carboxylate (20e)

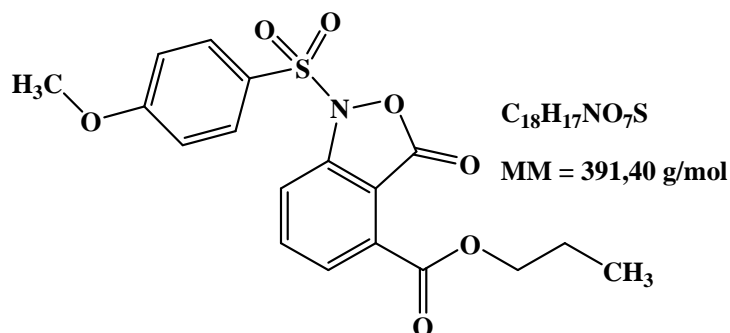


PF : 44-46°C

RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.95 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, CH₃), 1.70-1.77 (m, 2H, CH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃), 4.26 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz, CH₂O), 7.19 (d, 2H, HAr, $J = 8.4$ Hz), 7.55 (d, 2H, HAr, $J = 8.4$ Hz), 7.80-7.85 (m, 2H, HAr), 8.04 (dd, 1H, HAr, $J = 1.8, 7.2$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 10.3 (CH₃), 21.8 (CH₂), 21.8 (CH₃), 67.9 (CH₂O), 112.3 (Cq), 119.8 (CH), 127.6 (Cq), 129.0 (CH), 129.4 (2CH), 130.0 (2CH), 131.5 (Cq), 135.5 (CH), 147.2 (Cq), 150.6 (Cq), 162.6 (CO), 164.0 (CO).

Propyl 3-oxo-1,3-dihydro-1-(4-méthoxy-benzènesulfonyl)-2,1-benzisoxazole-4-carboxylate (20f)

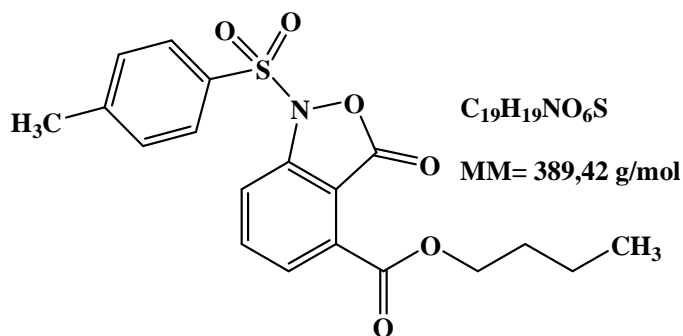


PF : 58-60°C

RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.96 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, CH₃), 1.72-1.79 (m, 2H, CH₂), 3.82 (s, 3H, CH₃O), 4.28 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz, CH₂O), 6.84 (d, 2H, HAr, $J = 9$ Hz), 7.60 (d, 2H, HAr, $J = 9$ Hz), 7.80-7.83 (m, 2H, HAr), 8.05 (dd, 1H, HAr, $J = 3.3, 6.2$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 10.4 (CH₃), 21.8 (CH₂), 55.8 (CH₃O), 67.9 (CH₂O), 112.4 (Cq), 114.6 (2CH), 119.9 (CH), 121.7 (Cq), 128.9 (CH), 131.5 (Cq), 131.8 (2CH), 135.3 (CH), 150.8 (Cq), 162.7 (Cq), 164.0 (CO), 165.2 (CO)

Butyl 3-oxo-1,3-dihydro-1-tosyl-2,1-benzisoxazole-4-carboxylate (20g)

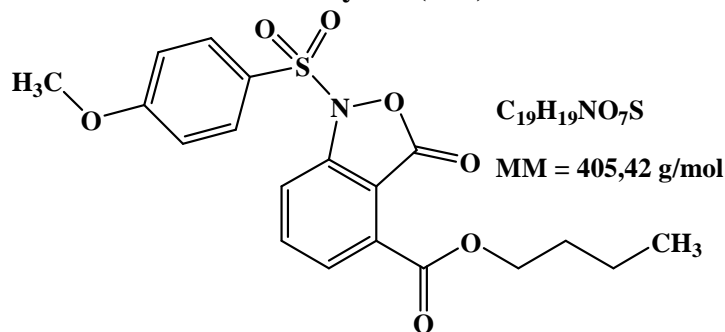


PF: 59-61°C

RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.92 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, CH₃), 1.35-1.43 (m, 2H, CH₂), 1.62-1.72 (m, 2H, CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃), 4.31 (q, 2H, $J = 6.6$ Hz, CH₂O), 7.19 (d, 2H, HAr, $J = 8.4$ Hz), 7.55 (d, 2H, HAr, $J = 8.4$ Hz), 7.78-7.84 (m, 2H, HAr), 8.05 (dd, 1H, HAr, $J = 2.1, 7.2$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 13.7 (CH₃), 19.1 (CH₂), 21.8 (CH₃), 30.4 (CH₂), 66.2 (CH₂O), 112.3 (Cq), 119.8 (CH), 127.7 (Cq), 128.9 (CH), 129.4 (2CH), 130.0 (2CH), 131.5 (Cq), 135.5 (CH), 147.2 (Cq), 150.6 (Cq), 162.6 (CO), 164.0 (CO).

Butyl 3-oxo-1,3-dihydro-1-(4-méthoxy-benzènesulfonyl)-2,1-benzisoxazole-4-carboxylate (20h)

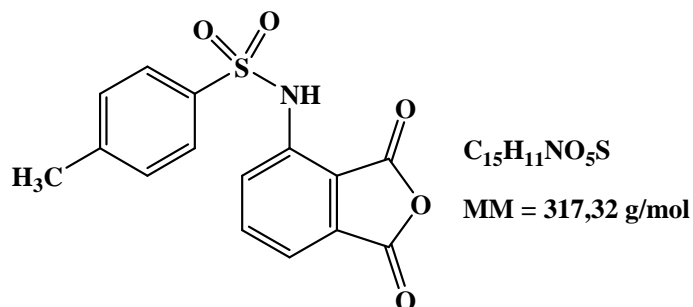


PF : 80-82°C

RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0.94 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, CH₃), 1.36-1.43 (m, 2H, CH₂), 1.68-1.73 (m, 2H, CH₂), 3.82 (s, 3H, CH₃O), 4.31 (q, 2H, $J = 6.6$ Hz, CH₂O), 6.84 (d, 2H, HAr, $J = 9$ Hz), 7.60 (d, 2H, HAr, $J = 9$ Hz), 7.79-7.82 (m, 2H, HAr), 8.05 (dd, 1H, HAr, $J = 3, 6.6$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 13.7 (CH₃), 19.1 (CH₂), 30.4 (CH₂), 55.8 (CH₃O), 66.2 (CH₂O), 112.4 (Cq), 114.6 (2CH), 119.8 (CH), 121.7 (Cq), 128.9 (CH), 131.5 (Cq), 131.8 (2CH), 135.4 (CH), 150.7 (Cq), 162.7 (Cq), 164.0 (CO), 165.2 (CO)

4-(4-Méthyl-phénylsulfonylamino)isobenzofuran-1,3-dione (21a)

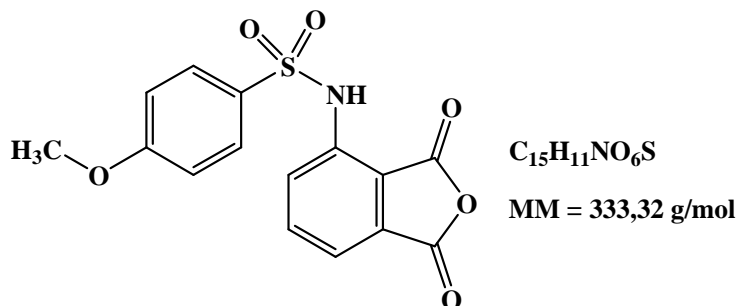


PF : 96-98°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 2.27 (s, 3H, CH₃), 7.10 (d, 2H, HAr, $J = 8.4$ Hz), 7.47 (d, 2H, HAr, $J = 8.4$ Hz), 7.62-7.69 (m, 1H, HAr), 7.90-7.98 (m, 2H, HAr), 9.00 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 21.2 (CH₃), 112.4 (Cq), 118.5 (CH), 121.2 (Cq), 125.9 (2CH), 128.6 (2CH), 128.7 (CH), 131.2 (Cq), 137.8 (CH), 145.8 (Cq), 162.5 (Cq), 164.2 (CO), 165.0 (CO).

4-(4-Méthoxy-phénylsulfonylamino)isobenzofuran-1,3-dione (21b)



PF: 114-116°C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 3.78 (s, 3H, CH₃O), 7.05 (d, 2H, HAr, $J = 9$ Hz), 7.56 (d, 2H, $J = 9$ Hz), 7.71-7.75 (m, 1H, HAr), 7.96-8.01 (m, 2H, HAr), 8.58 (s, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 56.5 (CH₃O), 111.0 (Cq), 115.6 (2CH), 119.1 (CH), 120.7 (Cq), 128.7 (CH), 131.2 (Cq), 132.2 (2CH), 137.5 (CH), 150.1 (Cq), 163.1 (Cq), 165.6 (CO), 165.7 (CO).

Spectre de masse : $m/z = 334$ (M+H)⁺.

Conclusion générale

Le présent travail avait pour but, l'évaluation pharmacologique de nouvelles molécules hétérocycliques synthétiques et naturelles extraites du caroubier. Les techniques et les séquences mises en jeu pour accéder aux composés souhaités ont fait appel à des analyses spectroscopiques et chromatographiques très avancées pour la caractérisation des molécules naturelles et à des synthèses multi-étapes, via des réactions d'alkylation, de réduction catalytique par le chlorure stanneux et de réaction de couplage des amines hétérocycliques par le chlorure d'aryle sulfonyle pour la synthèse de nouvelles molécules à propriétés pharmacologiques potentielles.

Dans le chapitre I, nous avons étudié la caractérisation chimique et l'évaluation biologique de l'extrait éthanolique de la cosse du caroubier recueillie de différentes régions marocaines. Dans la première partie, nous avons présenté un rappel bibliographique détaillé sur la composition chimique et l'importance biologique du caroubier. Les constituants principaux du caroubier sont doués des propriétés pharmacologiques et biologiques très diverses et intéressantes. Dans la deuxième partie, nous avons pu identifier et caractériser pour la première fois cinquante-deux composés poly phénoliques à partir de l'extrait éthanolique de la poudre de caroube de six régions du Maroc. L'identification et la quantification des extraits phénoliques issus de l'extraction de la poudre de la pulpe du caroubier par l'éthanol ont été réalisées par les techniques chromatographiques et spectroscopiques suivantes: HPLC, HPLC couplée avec électrospray-ionisation spectrométrie de masse (LC-ESI) et chromatographie en phase gazeuse couplée avec spectrométrie de masse (GC-MS). Dans la dernière partie de ce chapitre, l'évaluation pharmacologique des extraits bruts et fractionnés effectués sur quelques cellules tumorales ont montré des activités anticancéreuses significatives.

Dans le chapitre II, nous avons examinée la réaction de réduction du 5-nitroindazole et ces dérivés N-alkylés suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'arylsulfonyle. Dans la première partie, nous avons étudiée la réaction d'alkylation du 5-nitroindazole par différents groupements alkyles. Cette réaction nous a permis d'isoler dans tous les cas un mélange de deux produits: le 1-alkyl-5-nitroindazole et le 2-alkyl-5-nitroindazole avec des rendements influencés par les conditions opératoires utilisées. Dans la deuxième partie, nous avons étudiée la réaction de réduction des 5-nitroindazoles par SnCl_2 dans différents alcools suivi du couplage de l'amine

correspondante par le chlorure d'arylsulfonyle. Cette nouvelle méthodologie de synthèse organique nous a permis d'isoler à côté du sulfonamide indazolique attendu, deux nouveaux composés : le 5-indazolyl-arylsulfonamide fonctionnalisé en position 4 par un groupement alkoxy et le 5-indazolyl-arylsulfonamide substitué en position 4 par un atome de chlore observés pour la première fois dans cette série de réduction des 5-nitroindazoles. Pour étudier l'influence que peut avoir l'effet de l'insertion d'un substituant (halogène, alkyle) dans différentes positions de l'indazole sur la réaction de réduction de 5-nitroindazole, nous avons envisagé deux facteurs principaux: l'effet de l'atome d'halogène en position 3 de l'indazole et l'effet de l'agent alkylant en position 1 et/ou 2 de l'indazole. Ainsi, en présence de l'atome d'halogène en position 3, nous avons observée une sélectivité meilleure en faveur du sulfonamide non substitué. Pour les 5-nitroindazoles alkylés, nous avons montré que la réduction des 1-alkyl-5-nitroindazoles par SnCl_2 dans l'éthanol conduit à un mélange de trois produits mais avec une sélectivité meilleure en faveur du sulfonamide indazolique non substitué. Par contre, la protection de l'azote indazolique en position 2 favorise la synthèse de l'indazole substitué en position 4 par un groupement éthoxy et de l'indazole substitué en position 4 par un atome de chlore avec des rendements meilleurs. Ces résultats montrent aussi que la nature de l'agent alkylant en position 2 de l'indazole a un effet notable sur l'orientation de la réaction de réduction vers la synthèse des dérivés indazoliques substitués par un groupe éthoxy ou un atome de chlore en position 4.

Cette voie de synthèse originale nous a permis de localiser le site réactif vis-à-vis du mélange SnCl_2/ROH et de synthétiser une nouvelle famille de 5-indazolylarylsulfonamide fonctionnalisée en position 4 par un groupement alkoxy et/ou un atome de chlore. La présence des substituants de natures différents dans le squelette de l'indazole tels que le groupement 4-alkoxy-, 4-chloro-, le sulfonamide en position 5 et les groupements fonctionnels en position 1, 2 et 3, pourrait augmenter le spectre d'activité biologique de ce type de structure. Ces nouveaux sulfonamides ont été testés en tant qu'agents anticancéreux. Les résultats des tests pharmacologiques sont intéressants. Certains composés inhibent la prolifération des cellules tumorales à des faibles doses exprimées en micromole.

Pour examiner l'effet de la nature de la structure sur l'évolution de la réaction de réduction des dérivés nitrés par SnCl_2 dans ROH, dans le chapitre III, nous avons étudié la réaction de réduction du 3-nitrophtalique anhydride par le chlorure stanneux dans

différents alcools. Dans ce chapitre, nous avons préparé une nouvelle série des sulfonamides poly-fonctionnalisés à partir de la réduction de 3-nitrophtalique anhydride par le chlorure stanneux dans différents alcools, suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'arylsulfonyl. La réduction de 3-nitrophtalique anhydride par SnCl_2 dans l'éthanol, nous a permis d'identifier pour la première fois la synthèse de nouveaux systèmes hétérocycliques de type: éthyl 3-oxo-1,3-dihydro-1-(4-méthoxy-benzenesulfonyl)-2,1-benzoxazole-4-carboxylate. Un mécanisme détaillé a été proposé pour expliquer les transformations observées lors de la réduction du 3-nitrophtalique anhydride par le chlorure stanneux dans l'alcool pour accéder aux dérivés 2,1-benzisoxazole-4-carboxylate. La présence de plusieurs centres réactifs confère à ce type de produit une grande réactivité vis à vis des systèmes binucléophiles pour accéder à la synthèse de nouvelles molécules biologiquement actives.

Résumé

Evaluation Pharmacologique de Nouvelles Molécules Hétérocycliques Synthétiques et Naturelles Extraites du Caroubier

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules hétérocycliques et naturelles à caractère pharmacologique potentiel.

Dans la première partie, intitulée « Identification chimique et évaluation biologique des extraits éthanoliques de la cosse du caroubier Marocain », nous avons pu identifier pour la première fois via des techniques chromatographiques et spectroscopiques très avancées une cinquantaine de composés phénoliques à partir de l'extrait éthanolique de la poudre de la caroube. Les tests pharmacologiques effectués sur des cellules tumorales montrent que nos extraits éthanoliques de la poudre du caroubier marocain possèdent des activités anticancéreuses significatives.

Dans la deuxième partie, intitulée « Synthèse et évaluation pharmacologique de nouveaux dérivés de *N*-(5-indazolyl)-arylsulfonamide », nous avons étudié la réduction du 5-nitroindazole par le chlorure stanneux dans différents alcools suivie du couplage de l'amine correspondante par le chlorure d'aryle sulfonyle. Cette méthodologie nous a permis de faire varier les substituants alkyle de l'azote pyrazolique, et de localiser le site de fixation du groupement alkoxy et de l'atome de chlore sur l'homocycle benzénique du noyau indazolique. La synthèse de cette famille de dérivés indazoliques a enrichi les études de relation structure-activité, et nous ont permis d'obtenir une nouvelle classe d'anticancéreux prometteuse.

Enfin, dans une dernière partie intitulée « Etude de la réduction du 3-nitrophtalique anhydride avec SnCl_2 dans différents alcools: Synthèse de nouveaux dérivés de la 2,1-benzisoxazole », nous avons synthétisé de nouveaux systèmes hétérocycliques de type: alkyle 3-oxo-1,3-dihydro-1-arylsulfonyl-2,1-benzoxazole-4-carboxylate via la réduction de 3-nitrophtalique anhydride par SnCl_2 dans l'alcool. Un mécanisme détaillé a été proposé pour expliquer les transformations observées lors de la réduction du 3-nitrophtalique anhydride par le chlorure stanneux dans l'alcool pour accéder aux dérivés 2,1-benzoxazole-4-carboxylate.

Mots clés: Caroube, polyphénols, chromatographie, 5-nitroindazole, 3-nitrophtalique anhydride, Agents anticancéreux, Réactions de réduction, Chlorure stanneux, 4-alkoxy-*N*-(5-indazolyl)-arylsulfonamides, 4-chloro-*N*-(5-indazolyl)-arylsulfonamides, 2,1-benzoxazole-4-carboxylates.