

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche**  
**Scientifique**

**Université Mohamed Seddik Ben Yahia-Jijel**



Faculté des sciences exactes et informatique  
Département de chimie

**Mémoire de fin d'études**

En vue de l'obtention du diplôme de Master en chimie  
Option : Chimie Pharmaceutique

## **Thème**

**Etude de l'effet antioxydant de quelques  
analogues ouverts de Dihydrobenzopyrane**

Réalisé par :

**KERBOUCHE Khawla & BOUMENDJEL Yousra**

**Soutenu le : 14/09/2021**

**Devant le jury :**

<b>Dr. BOUDEBAZ Khadidja</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Jijel</b>	<b>Présidente</b>
<b>Dr. BOUHEDJA Mourad</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Jijel</b>	<b>Encadreur</b>
<b>Dr. BOUIDER Nafila</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Jijel</b>	<b>Examinatrice</b>

**Année Universitaire : 2020/2021**

# *Dédicace*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut  
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect,  
reconnaissance... Je dédie ce mémoire ...*

*A mes très chers parents*

*Aucun mot ne saurait exprimer ma profonde gratitude et ma sincère  
reconnaissance envers les deux personnes les plus chères à mon cœur.*

*Que Dieu tout puissant vous procure la santé, le bonheur et la  
prospérité*

*A mes très chères sœurs Besma, Radia, feryal, Hasna Et Meriem  
pour leur encouragement*

*A mon seul frère Youcef, Que dieu te protège pour nous*

*Aux deux anges, ma nièce Rital et mon neveu Zeid*

*A mon très cher ami Mohamed Sadek ... A toute ma famille et mes  
chères amies... A tout ce qui me sont chères*

*A moi-même ...*

*KHAWLA*

## *Dédicace*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que : Je dédie ce travail de mémoire à :*

*A Ma tendre Mère : Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager de prier pour moi. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*A Mon très cher Père : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous êtes consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.*

*A ma belle-sœur pour leur soutien moral et qui ne cessé pas de m'encourager et me conseillée. Je vous souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de sérénité.*

*A mon fiancé Ilyess pour ton aide, tes conseils et tes encouragements.*

*A toute ma famille petite et grande ainsi qu'à mes chers amis.*

*YOUSRA*

## *Remerciement*

Nous exprimons nos grands remerciements et nos sincères gratitudes à notre encadreur **Dr. Bouhedja Mourad**, d'avoir proposé et dirigé ce travail, pour ses conseils du début à la fin de ce travail. Nous avons eu l'honneur d'être parmi vos étudiants et de bénéficier de votre riche enseignement. Vos qualités pédagogiques et humaines sont pour nous un modèle.

Nous tenons également à remercier **Dr. Boubebaz Khadjidja**, qui nous fait l'honneur de présider ce jury. Qu'elle soit assurée de notre profond respect et notre sincère reconnaissance.

Nous remercions vivement **Dr. Bouider Nafila** d'avoir accepté d'examiner ce travail, Tous nous remercions pour son aide et le soutien qui nous apporté au cours de la réalisation de ce mémoire au sein de laboratoire.

Nous remercions notre Co-encadreur **Dr. Sahra Khalil** pour son aide, soutien, et conseils.

Nous remercions également **Dr. HABILA Safia** et **Dr. LAHOUAL Asma**, enseignantes d'université de Jijel, pour l'aide qu'elles nous ont apporté au cours de la réalisation des tests.

Encore nous remercions à tous les doctorants et les membres de laboratoire de pharmacologie et de phytochimie contribuent par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable.

Nous remercions à toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté à nous rencontrer et répondre à nos questions durant ce travail.

# Sommaire

Dédicace.....	i
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des abréviations.....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	xi
INTRODUCTION GENERALE.....	01

## CHAPITRE I: ANTIOXYDANTS ET ACTIVITE ANTIOXYDANTE

I.1.L'oxydation biologique.....	03
I.2. Les radicaux libre.....	03
I.2.1. Généralité sur les radicaux libres.....	03
I.2.2. Définition des radicaux libres .....	03
I.2.3.Types des radicaux libres .....	04
I.2.3.1 Radicaux libres primaires .....	04
I.2.3.2 Radicaux libres secondaires .....	04
I.2.4. Natures des radicaux libres.....	05
I.2.4.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène .....	05
I.2.4.1.1. Espèces réactives radicalaires .....	05
I.2.4.1.2.Espèces libres non radicalaires .....	05
I.2.4.2. Espèces libres non oxygénées .....	06
I.2.4.3. Autres radicaux libres.....	06
I.2.5. Sources et Production des radicaux libres .....	07
I.2.6. Formation des radicaux libres.....	08
I.2.7. Rôle bénéfique des radicaux libres.....	08
I.3. Stress Oxydatif.....	09
I.3.1. Définition.....	09
I.3.2. Origine du stress oxydatif.....	09

I.3.3 Conséquences du stress oxydant .....	10
<b>I.4. Les Antioxydants.....</b>	<b>12</b>
I.4.1. Définition.....	12
I.4.2. Classification des antioxydants.....	12
I.4.2.1. Selon leurs natures .....	12
I.4.2.1.1. Les antioxydants de synthèse .....	12
I.4.2.1.2. Les antioxydants naturels.....	14
I.4.2.1.3. Les antioxydants synergiques.....	15
I.4.2.2. Selon leur mode d'action .....	15
I.4.2.2.1. Les antioxydants type I.....	15
I.4.2.2.2. Les antioxydants type II .....	16
I.4.2.2.3. Les antioxydants type III.....	16
I.4.3. Système de défense antioxydant.....	16
I.4.3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	16
I.4.3.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	17
I.4.4. Propriétés et mécanisme d'action des antioxydants .....	19
<b>I.5. Méthodes d'évaluation des propriétés Antioxydantes .....</b>	<b>20</b>
I.5.1. DPPH.....	20
I.5.2. ABTS.....	21
I.5.3. FRAP.....	21
I.5.4. Méthode par résonance paramagnétique électronique (RPE).....	21

## **CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES**

<b>II.1. Introduction.....</b>	<b>22</b>
<b>II.2. Matériel.....</b>	<b>22</b>
II.2.1. Produits chimiques à tester.....	22
II.2.2. Voies de synthèse des molécules testées.....	23
II.2.3. Réactifs et produits utilisés.....	27
II.2.4. Matériels et outils.....	27
<b>II.3. Méthodes d'évaluation.....</b>	<b>28</b>
II.3.1. Piégeage du radical libre DPPH .....	28
II.3.2. Test de piégeage du radical-cation ABTS.....	30
II.3.3. Test de pouvoir réducteur FRAP .....	31

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>III.1. Introduction.....</b>	<b>35</b>
<b>III.2. Test de piégeage du radical DPPH.....</b>	<b>35</b>
<b>III.3. Test de piégeage du radical-cation ABTS .....</b>	<b>37</b>
<b>III.4. Test de pouvoir réducteur FRAP.....</b>	<b>40</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>45</b>
<b>Référence bibliographique .....</b>	<b>47</b>

## *Liste des abréviations*

<b>A.A</b>	Acide Ascorbique
<b>AAPH</b>	2,2'-Azobis(2-AmidinoPropane) diHydrochloride
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ABTS</b>	2,2-Azinobis (3-éthyle-BenzoThiazoline-6-Sulphonate
<b>AGPI</b>	Acide Gras Poly-Insaturé
<b>BHA</b>	ButylHydroxyAnisole
<b>BHT</b>	ButylHydroxyToluène
<b>DPPH</b>	2,2'-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl
<b>DMSO</b>	DiMéthylSulfOxide
<b>DMF</b>	DiMethylFormamide
<b>DCE</b>	DiChloroEthane
<b>ERA</b>	Espèces Réactives de l'Azote
<b>ERO</b>	Espèce Réactive de l'Oxygène
<b>FRAP</b>	Pouvoir Réducteur Au Ferricyanure de Potassium
<b>GSH</b>	Glutathione
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'Hydrogène
<b>HO<sup>•</sup></b>	Radical Hydroxyle
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration Inhibitrice médiane
<b>LO<sup>•</sup></b>	Radical alcoxyle

<b>LOO<sup>•</sup></b>	Radical peroxyde
<b>NADPH</b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
<b>NO<sup>•</sup></b>	Monoxyde d'azote
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxygène singulet
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Anion superoxyde
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Anion peroxydinitrite
<b>ONOO<sup>•</sup></b>	Peroxydinitrite
<b>ONOOH</b>	Nitroperoxyde
<b>ORAC</b>	Capacité d'Absorbance de l'Oxygène Radicalaire
<b>PI</b>	Pourcentage d'Inhibition
<b>R<sup>•</sup></b>	Radical libre oxydant
<b>RO<sup>•</sup></b>	Radical Oxy.
<b>ROO<sup>•</sup></b>	Radical peroxy.
<b>RPE</b>	Résonance Paramagnétique Electronique
<b>SOD</b>	SuperOxyde Dismutase.
<b>SIDA</b>	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
<b>TCA</b>	TriChloroacide Acétique
<b>TRAP</b>	Total Radical-trapping Antioxydant Parameter
<b>Trolox</b>	Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroma-2-carboxylique

## *Liste des figures*

<b>N° de Figure</b>	<b>Titres</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 1</b>	Structures chimiques de quelques composés antioxydants.....	<b>02</b>
<b>Figure 2</b>	Molécule instable dû à la perte d'un électron.....	<b>04</b>
<b>Figure 3</b>	Structure d'un radical primaire.....	<b>04</b>
<b>Figure 4</b>	Les acteurs du stress oxydant : espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO).....	<b>06</b>
<b>Figure 5</b>	Sites de production intracellulaire des ERO.....	<b>07</b>
<b>Figure 6</b>	Mécanisme de formation d'un radical libre.....	<b>08</b>
<b>Figure 7</b>	Origine de stress oxydatif.....	<b>10</b>
<b>Figure 8</b>	Balance antioxydants-radicaux libres régulée par les antioxydants	<b>12</b>
<b>Figure 9</b>	Structure chimique de Trolox.....	<b>13</b>
<b>Figure 10</b>	Structure chimique de BHT.....	<b>13</b>
<b>Figure 11</b>	Structure chimique de BHA I et II.....	<b>13</b>
<b>Figure 12</b>	Mécanisme putatifs des effets des flavonoïdes.....	<b>14</b>
<b>Figure 13</b>	Structure chimique d'acide lactique.....	<b>15</b>
<b>Figure 14</b>	Quelques structures d'antioxydants de type I.....	<b>15</b>
<b>Figure 15</b>	Structure chimiques de quelques antioxydants type II.....	<b>16</b>
<b>Figure 16</b>	Régulation de la production d'ERO par les systèmes de défenses antioxydantes.....	<b>17</b>
<b>Figure 17</b>	Structure chimique de la vitamine C.....	<b>18</b>

<b>Figure 18</b>	Structure de la vitamine E.....	<b>18</b>
<b>Figure 19</b>	Structure chimique de la 2-phénylbenzopyrane.....	<b>19</b>
<b>Figure 20</b>	Mécanisme de piégeage des radicaux libre par les antioxydants	<b>19</b>
<b>Figure 21</b>	Structure de base des molécules à tester portant des groupements variés.....	<b>22</b>
<b>Figure 22</b>	Voie de synthèse des molécules cibles de la série I : 4a, 5a-d, 6a-b, A1-11, B1-3, C1-2 et D1.....	<b>23</b>
<b>Figure 23</b>	Voie de synthèse des molécules cibles de la série II : 9a et 10a-b..	<b>24</b>
<b>Figure 24</b>	Voie de synthèse des molécules cibles de la série III : 13a, 14a et 15a.....	<b>24</b>
<b>Figure 25</b>	Réaction d'un donneur d'hydrogène avec le radical DPPH.....	<b>28</b>
<b>Figure 26</b>	Modification de l'ABTS <sup>•</sup> lors du transfert électronique.....	<b>30</b>
<b>Figure 27</b>	Modification de l'ABTS <sup>•</sup> lors du transfert électronique.....	<b>31</b>
<b>Figure 28</b>	Coloration bleu cyanée de la réduction de fer (d'A.A).....	<b>32</b>
<b>Figure 29</b>	Coloration bleu cyanée de la réduction de fer des produits actifs..	<b>33</b>
<b>Figure 30</b>	Histogramme de pourcentage d'inhibition des échantillons, de blanc et de l'acide ascorbique.....	<b>36</b>
<b>Figure 31</b>	variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration des composés: A.A, C1, C2 et 13a.....	<b>39</b>
<b>Figure 32</b>	variation de PI% du ABTS de : A.A, C1, C2 et 13a en fonction de concentration.....	<b>39</b>
<b>Figure 33</b>	Structures chimiques des composés C1 et C2.....	<b>41</b>
<b>Figure 34</b>	Variation de l'absorbance en fonction de la concentration des composés actifs (A6, A7, A11 et C1).....	<b>43</b>
<b>Figure 35</b>	Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP pour les composés A6, A7, A11, C1 et A.A.....	<b>44</b>

## *Liste des tableaux*

<b>N° de tableaux</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 01</b>	Structure et nomenclature de différents composés à tester comme antioxydant.....	<b>25</b>
<b>Tableau 02</b>	Préparation des solutions mère et diluées.....	<b>29</b>
<b>Tableau 03</b>	Les concentrations réelles de chaque solution.....	<b>34</b>
<b>Tableau 04</b>	Absorbance des composés, d'A.A et de contrôle négatif.....	<b>35</b>
<b>Tableau 05</b>	pourcentage d'inhibition des composés actifs.....	<b>37</b>
<b>Tableau 06</b>	IC <sub>50</sub> de nos composés et d'acide ascorbique avec le test ABTS..	<b>39</b>
<b>Tableau 07</b>	Résultats du pouvoir antioxydant par la méthode FRAP.....	<b>40</b>

# **I**NTRODUCTION GÉNÉRALE

## Introduction générale

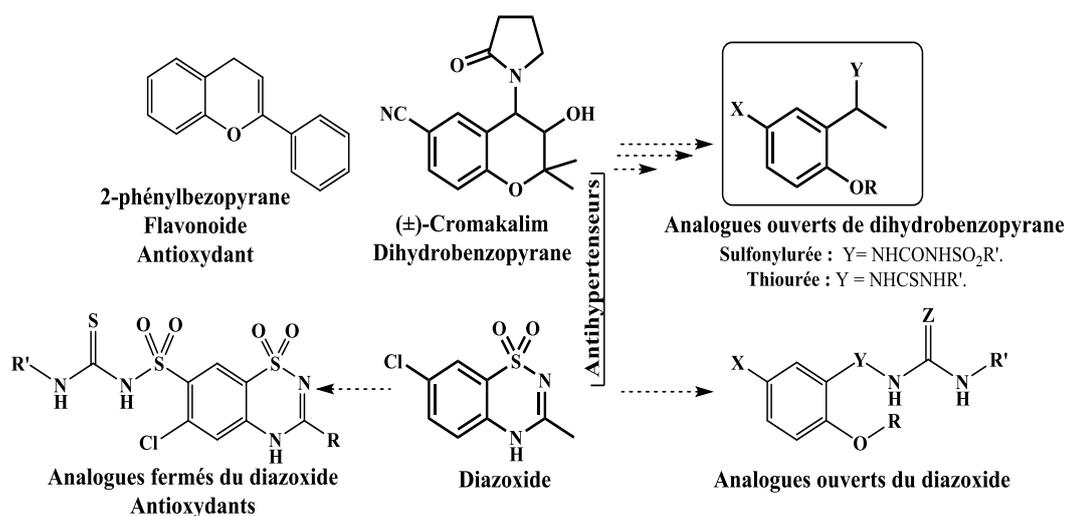
L'oxygène, la molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables et présente également une toxicité sur l'organisme, via la formation des radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (ERO). L'effet néfaste de l'oxygène n'est pas causé par l'oxygène lui-même, mais par les espèces réactives de l'oxygène formées sur le site, conduisant à la formation des radicaux libres. Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines. Le corps humain possède son propre système de défense contre la génération et la propagation des ERO. Cependant, la surgénération de ces radicaux prédateurs peut provoquer un déséquilibre conduisant à un stress oxydatif [1].

Le stress oxydatif cellulaire, produit par une augmentation des espèces réactives radicalaires, joue un rôle majeur dans la pathogenèse du vieillissement et d'autres maladies, telles que le cancer, le diabète et la maladie d'Alzheimer, par conséquent, la recherche et le développement d'antioxydants ont beaucoup attiré l'attention ces dernières années. Les antioxydants présentent un grand intérêt en raison de leur implication dans des processus biologiques et industriels importants. En général, des composés ayant une activité antioxydante présentent des propriétés anticancéreuses, anti-cardiovasculaires, anti-inflammatoires et de nombreuses autres activités [2].

Les antioxydants synthétiques sont utilisés depuis de nombreuses années. Plusieurs chercheurs ont procédé à la synthèse des analogues de molécules antioxydante naturelles, les résultats expérimentaux ont montré que les nouvelles molécules synthétiques possèdent généralement des pouvoirs antioxydants plus importants que celles des molécules mères naturelles [3].

En plus de leur fonction vasodilatatrice, les benzopyranes comme les flavonoïdes et les benzothiadiazine (Figure.1) portant une fonction sulfonylthiourée ont fait l'objet de plusieurs études concernant l'activité antioxydante [4,5]. Il a été démontré que la combinaison du cycle benzothiadiazine avec des fragments sulfonylthiourée a conduit à des dérivés hybrides du diazoxide (analogues fermés), Ces composés ont été testés pour un éventuel pouvoir antioxydant sur six tests analytiques, les résultats obtenus ont démontré une forte activité antioxydante [5]. Des études plus récentes sur des analogues ouverts du cromakalime

et du diazoxide (Figure.1) ont montrées une forte activité antioxydante dans les essais DPPH, FRAP et ABTS [6].



**Figure 1:** Structures chimiques de quelques composés antioxydants [5,6].

Ce travail a pour but d'évaluer l'activité antioxydante de quelques analogues ouverts de dihydrobenzopyrane portant des fonctions variées : cétone, alcool, amide, amine, oxime, carbamate, sulfonylurée et thiourée, commencé par une introduction générale, et organisé en trois chapitres avec une conclusion générale et référence bibliographique.

Dans la première partie, nous avons commencé par une étude bibliographique consacrée à des généralités sur les radicaux libres, le stress oxydatif et sur l'activité antioxydante, puis nous avons expliqué en détail les différentes méthodes les plus utilisées dans l'évaluation de l'activité antioxydante. Dans la seconde partie, on aborde tous les travaux expérimentaux réalisés au cours de ce travail, méthode de synthèse de 30 molécules issues de la synthèse organique qui a été effectuée par M. BOUHEDJA et *al*, y compris les matériels utilisés dans l'évaluation de l'activité antioxydante de ces produits, les résultats obtenus et discussion, afin de pouvoir tirer une conclusion générale.

# **C**HAPITRE **I**

## **ANTIOXYDANTS ET ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE**

# **I. Antioxydant et activité antioxydante**

## **I.1. Oxydation biologique**

L'oxydation est une réaction chimique de base présente partout dans la nature, c'est le phénomène qui fait rouiller les métaux, qui fait altérer les légumes et les fruits et qui rancir les graisses. Il change le goût et la couleur des aliments. L'organisme subit également le phénomène d'oxydation, mais il est assuré pour lutter contre ces dégradations. Un énorme système de défense est en permanence en place, avec des systèmes enzymatiques et/ou des systèmes dégénéralifs de complexe, mettant en jeu par exemple l'acide ascorbique (vitamine C) ou le glutathion. Mais ce système de défense est parfois débordé, surtout quand les agressions sont renforcées sous l'effet de plusieurs phénomènes tel que la fumée du tabac, la pollution, le soleil ou d'un effort physique intense, dans des conditions de stress et alors l'oxydation augmente au point de ne peut pas être régulée, ou dans des conditions de mauvais alimentation et alors des quantités insuffisantes d'antioxydants apportés pour rétablir l'équilibre [7].

## **I.2. Les radicaux libres**

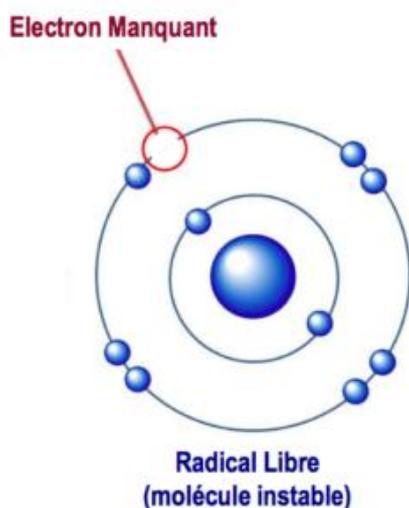
### **I.2.1. Généralités**

La molécule de dioxygène est en réalité bi-radicalaire. Elle possède, en effet, deux électrons célibataires sur des orbitales différentes. Le dioxygène est susceptible de récupérer quatre électrons, mais ses capacités oxydantes sont limitées par une barrière cinétique importante. En présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes, il est capable de capter un électron et former des espèces libres. Cet élément est essentiel pour les organismes multicellulaires car il permet de produire de l'énergie par oxydation de la matière organique, mais nos cellules transforment une partie de cet oxygène en métabolites toxiques appelée : les radicaux libres organiques [8].

### **I.2.2. Définition**

Les radicaux libres constituent une proportion importante des ERO. On définit par le terme de radicaux libres, tout atome, groupe d'atomes ou molécules qui possède(nt) sur son orbital externe un électron célibataire non apparié (Fig.2). Les radicaux libres sont des

substances chimiques très instables, de durée de vies très courtes ( $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  s) et très réactives par rapport à leur électron célibataire lui conférant une grande instabilité et donc une grande réactivité [8].



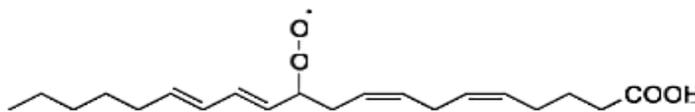
**Figure 2 :** Molécule instable dû à la perte d'un électron.

Leur principal danger vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants ( l'ADN ou la membrane cellulaire), avec risque de multiplication anormale des cellules, entraînant un dysfonctionnement, une mort cellulaire, un cancer et autres maladies mortifère [9].

### I.2.3. Types des radicaux libres

#### I.2.3.1. Radicaux libres primaires

Formés directement à partir de l'oxygène. Sa durée de vie est assez courte lui permettant d'être diffusion dans l'organisme loin de son lieu de production [10].



**Figure 3 :** Structure d'un radical primaire.

#### I.2.3.2. Radicaux libres secondaires

Telles que l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ), se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule [11].

## I.2.4. Nature des radicaux libres

### I.2.4.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

Proviennent de la molécule d'oxygène (Fig.4), par réaction d'addition d'un électron, les principales espèces réactives de l'oxygène sont :

#### I.2.4.1.1. Espèces réactives radicalaires

##### a. Ion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )

Formées par réduction d'une molécule d'oxygène, l'ion superoxyde est un dérivé très réactif, relativement stable et peu toxique pour l'organisme, l'origine principale du radical superoxyde est sans conteste la chaîne respiratoire mitochondriale, par addition d'un électron à l'oxygène moléculaire, réaction catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial [12].

##### b. Radical libre hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ )

Peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides et les protéines, il joue un rôle dans l'auto oxydation lipidiques, lui rendre le radical le plus dangereux dans l'organisme. Est un dérivé de l'ion superoxyde, principalement formé lors de réactions d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène, ces réactions sont décrites sous le nom de réactions de Fenton [13].

##### c. Espèces réactives de l'azote

Les espèces réactives de l'azote proviennent de la réaction des ERO avec le monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$ . Il interagit avec l'anion superoxyde pour donner le peroxydinitrite, composé extrêmement réactif et toxique. Le monoxyde d'azote et peroxydinitrite interagissent avec des protéines et modifier leurs propriétés. Ces réactions sont catalysées par la NO synthase et entraîne la formation de réactifs ayant une réactivité élevée [12].

#### I.2.4.1.2. Espèces libres non radicalaires

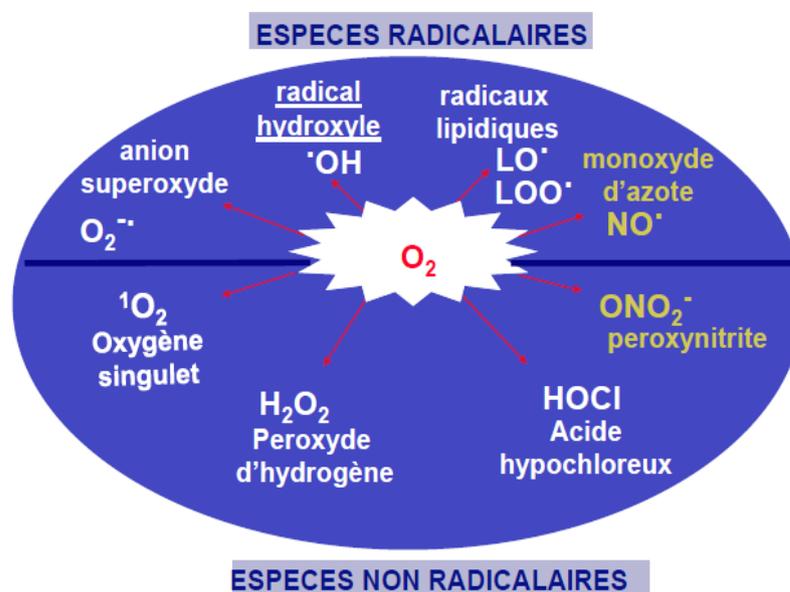
##### a. Oxygène singulet ( $^1O_2$ )

Il est produit selon plusieurs processus sous l'action du rayonnement UV, la peroxydation lipidique ou encore des réactions enzymatiques, formé à partir de l'ion superoxyde [13].

## b. Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

La double protonation de l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  peut se passer dans des conditions favorables en milieu acide. Cette réaction est catalysée par le superoxyde dismutase (SOD) aboutissant à la formation de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  [13].

Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  n'est pas un radical libre, présente une plus grande stabilité par rapport aux radicaux libres. Toutefois, il est considéré comme une espèce réactive d'oxygène car il intervient comme intermédiaire de synthèse d'autres radicaux libres. Ses propriétés physico-chimiques lui permettent de traverser la membrane lipidique, il joue donc un rôle important comme vecteur et diffuseur du stress oxydant [14].



**Figure 4 :** Les acteurs du stress oxydant : espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) [14].

### I.2.4.2. Espèces libres non oxygénées

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO). Ils peuvent réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs [15].

### I.2.4.3. Autres radicaux libres

Il existe des radicaux libres « non biologiques » qui vont permettre d'évaluer l'activité antioxydante des composés. Parmi ces radicaux, on peut citer le radical DPPH (1,1- diphényl-2-picrylhydrazyle) ainsi que le radical cation  $ABTS^{+\bullet}$  (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-

azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)). Le AAPH (le sel dihydrochloré du 2,2'-azobis (2-amidinopropane)) n'est pas un radical libre mais cette molécule peut être utilisée comme générateur de radicaux libres notamment dans les études de la peroxydation lipidique [16].

### I.2.5. Sources et Production des radicaux libres

Toute réaction biochimique impliquant la molécule d'oxygène a la capacité de générer des radicaux libres. La chaîne respiratoire qui provoque la libération massive des radicaux libres, d'autres activités enzymatiques libèrent également des espèces réactives de l'oxygène (ERO), en particulier, au cours de l'inflammation oxydases, les NADPH et les cytochromes P450 au cours de la détoxication des xénobiotiques. La mitochondrie, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique sont les sièges principaux de libération des ERO (Fig.5) [17].

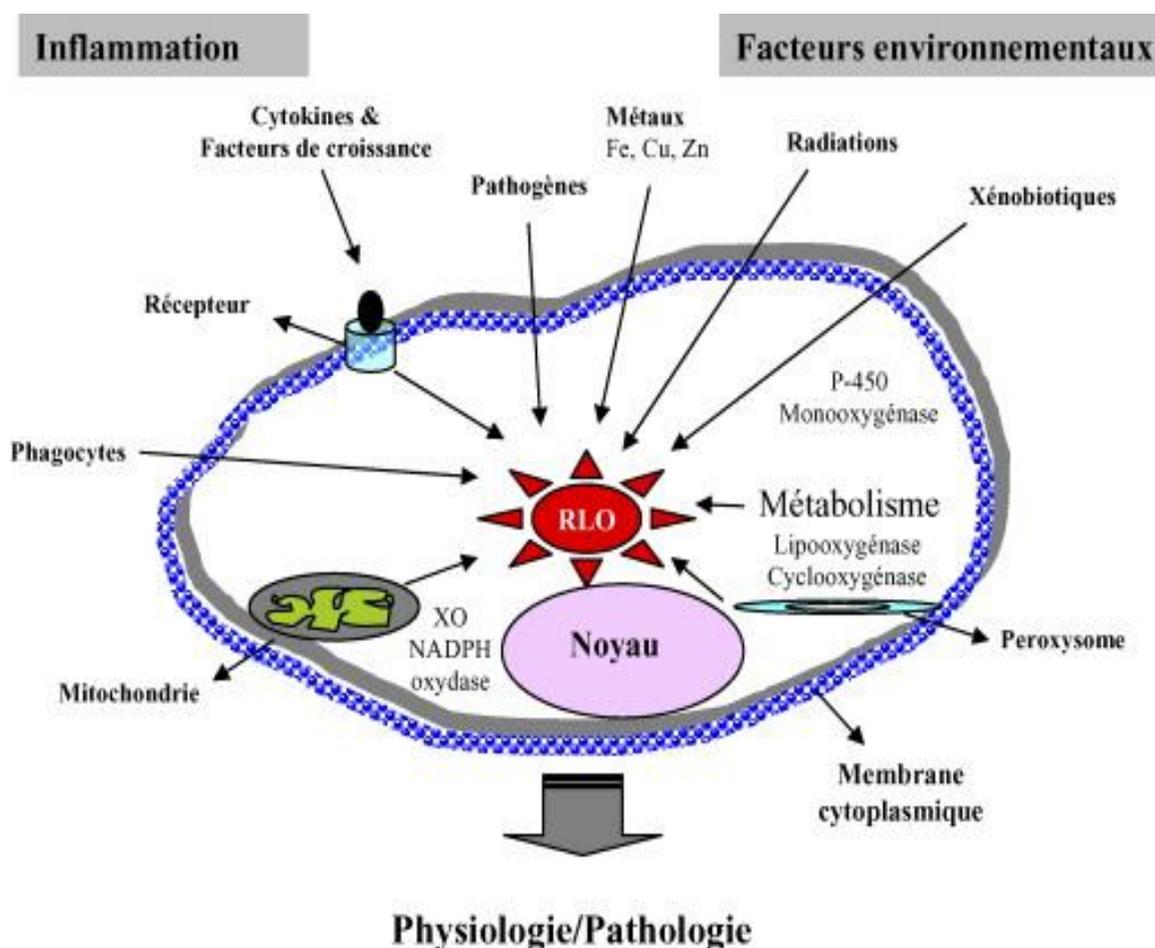


Figure 5 : Sites de production intracellulaire des ERO [13].

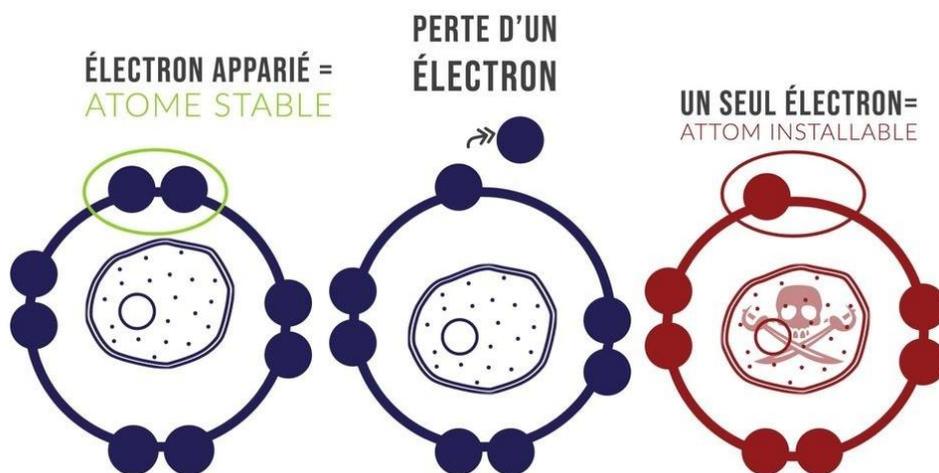
Les sources principales de radicaux libres peuvent être: endogènes et exogènes :

- **Les sources endogènes** : les cellules phagocytaires, la respiration oxydatives des mitochondries, le métabolisme...etc.
- **Les sources exogènes** : les polluants, le stress, les agents cancérigènes, les produits raffinés comme le sucre, l'excès de rayons UV, les pesticides, les médicaments, l'alcool, le tabac...etc [18].

### I.2.6. Formation des radicaux libres

Les radicaux libres sont instables et se couplent avec le premier électron possible qu'ils rencontrent par la force, l'électron expulsé redevient un radical libre, et on assiste à la destruction de molécules à longue chaîne, accompagnée d'une cascade de dégradation cellulaire. C'est ce qu'on appelle le stress oxydatif, et qui explique pourquoi la production des premiers radicaux libres peut provoquer des dommages importants dans les cellules [19].

La principale voie de formation des radicaux libres est la rupture homolytique d'une liaison covalente en deux entités possédant chacune un électron, perte d'un électron par une espèce non radicalaire (Fig.6), ou par addition d'un électron à une espèce non radicalaire [20].



**Figure 6** : Mécanisme de formation d'un radical libre [20].

### I.2.7. Rôle bénéfique des radicaux libres

Certes, les radicaux libres sont responsables du vieillissement et de nombreuses maladies chroniques. Mais pas seulement ! Ils sont impliqués dans la bonne marche de notre organisme [21].

- Les radicaux libres sont utilisés par les globules pour se débarrasser des bactéries et des virus. Ils sont chargés d'éliminer les vieilles cellules pour les remplacer par une nouvelle génération de cellules.
- La protection de la toxicité de l'alcool ou des graisses se fait par des cellules appelées peroxysomes en produisant des radicaux libres.
- Les traitements anti-cancers viennent à bout des cellules cancéreuses en bombardant de radicaux libres les tumeurs.
- Au sein de la cellule, les radicaux libres semblent être impliqués dans la croissance, la différenciation et aussi la communication entre les cellules.

### **I.3. Le stress oxydatif**

Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont impliquées dans des processus physiologiques à des faibles quantités. Cependant, l'excès de la production des ERO peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule, les lipides, les protéines et les acides nucléiques, et donne lieu au stress oxydatif qui sera impliqué dans diverses pathologies à savoir plusieurs maladies [22].

#### **I.3.1. Définition**

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire, c'est à dire un déséquilibre entre des taux élevés de dérivés réactifs de l'oxygène (ERO) et une activité antioxydante réduite [23].

#### **I.3.2. Origine du stress oxydatif**

Le stress oxydatif est à l'origine d'une altération des constituants de nos cellules. Les plus connues des molécules néfastes sont les radicaux libres. Les atteintes causées sont responsables d'un vieillissement cellulaire prématuré et pourraient être associés à certaines maladies. Une simple prise de sang permet de connaître son niveau de stress oxydatif au travers du bilan « profil de stress oxydatif [24].

Des composés à fort potentiel oxydant, sont produits constamment en situation physiologique au sein d'un organisme. Il se met alors en place un système antioxydant. En situation normale, la balance antioxydant/pro-oxydant est équilibré, mais l'organisme peut être confronté à une surexposition à des composés oxydants (Fig.7), lorsque la

production endogène d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) devient excessive ou suite à l'exposition à un phénomène toxique exogène [25].

L'exercice vigoureux accélère la formation des radicaux libres, tout comme l'inflammation, l'exposition à certains produits chimiques, la fumée de cigarette, l'alcool, la pollution de l'air ambiante et les diètes riches en matières grasses. Ainsi qu'ils peuvent se former lorsque l'oxygène interagit avec certaines molécules [25].

Un état de stress oxydant existe lorsqu'au moins une des trois conditions suivantes est présente :

- Excès des espèces réactives d'O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> ou Cl<sub>2</sub> ;
- Défenses insuffisantes (endogènes et exogènes) ;
- Mécanismes de réparation insuffisants.

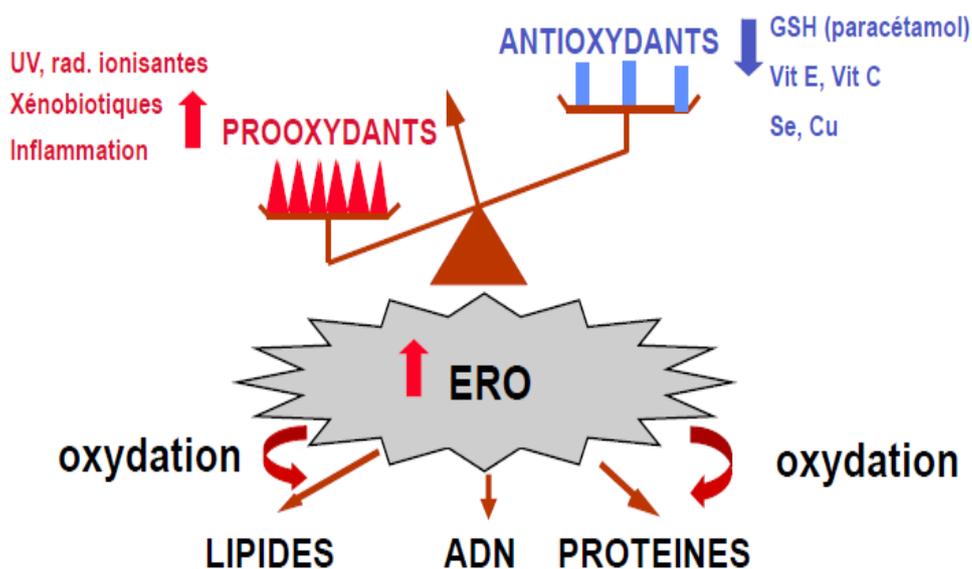


Figure 7 : Origine de stress oxydatif [25].

Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouve la majeure partie des antioxydants exogènes nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols) favorise une baisse de la capacité anti-oxydante [26].

### I.3.3. Conséquences du stress oxydant

Les radicaux libres sont instables et cherchent à s'apparier avec un électron d'une autre molécule. Ils sont à l'origine de réactions d'oxydation en chaîne. Conduisant à l'apparition d'une multitude de maladies, comme le cancer, la cataracte, le syndrome de détresse

pulmonaire aigu, le vieillissement accéléré, le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes, et les maladies cardiovasculaires [27].

➤ L'oxydation des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des modifications des bases azotées, des fragmentations de l'ADN, des ruptures de brins ou à des pontages entre des bases altérant ainsi l'expression génétique [28].

➤ La peroxydation des lipides surtout des acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont facilement oxydables, aboutissant à la désorganisation complète de la membrane cellulaire, altérant de ce fait ses fonctions d'échanges, de barrières et d'informations [28].

Il est important de noter que le stress oxydant peut être également la conséquence de l'effet de facteurs environnementaux. En effet, la vie moderne confronte notre organisme à des facteurs provoquant une surproduction de ERO tels que la pollution, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'exposition au soleil ou encore le tabagisme. Ceci conduit soit à un affaiblissement de nos défenses antioxydantes soit à la synthèse directe d'ERO, pouvant engendrer des dégâts cellulaires. Un stress oxydant peut se développer lors d'une chirurgie cardio-vasculaire, d'une transplantation d'organes ou d'une détresse respiratoire mais aussi en cas d'exercice intense mal maîtrisé. En parallèle de ces agressions, la situation s'aggrave du fait d'une alimentation moins saine et moins équilibrée qu'auparavant [29].

De ce fait, l'apport en antioxydants naturels est de plus en plus faible malgré leur rôle dans le contrôle des effets nocifs de l'oxygène. Ainsi, chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant. Celui-ci est en fonction du mode de vie, des caractéristiques génétiques mais également de l'environnement. Une bonne hygiène de vie ainsi que de bonnes habitudes alimentaires jouent également un rôle primordial dans le maintien d'un potentiel antioxydant optimal [29].

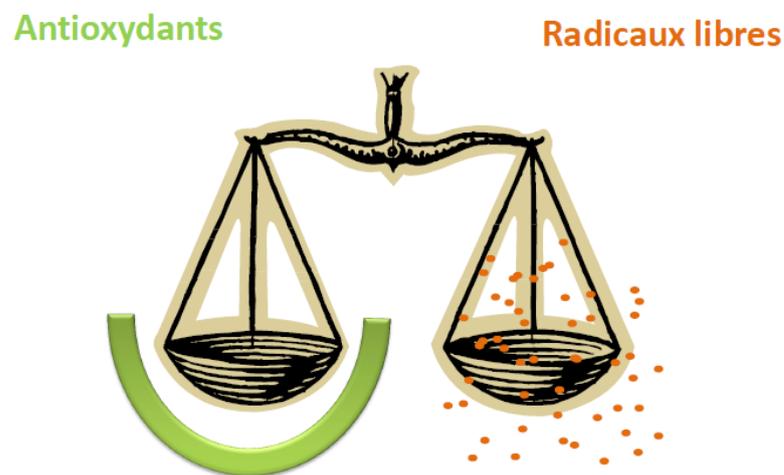
Déterminer le statut de stress oxydant d'un individu devient actuellement un sujet prioritaire en termes de prévention des maladies. En effet, de nombreuses études indiquent qu'il existe une association entre l'altération des systèmes de défense antioxydants et le développement de plus de 200 physiopathologies différentes comme l'athérosclérose ou le cancer mais également le SIDA, les maladies inflammatoires, le diabète et le vieillissement [29].

## I.4. Les antioxydants

### I.4.1. Définition

Les anti-oxydants représentent un ensemble de molécules capables de protéger les cellules contre le stress oxydatif, par exemple en piégeant les radicaux libres produits à partir de l'oxygène [30].

La surveillance du bon équilibre entre les radicaux libres et les systèmes de défenses de l'organisme pour les neutraliser est essentielle (Fig.8). Les anti-oxydants sont ainsi des composés qui permettraient de lutter contre le vieillissement cellulaire et certaines maladies qui y sont liées (diabète, hypertension, cancer) [30].



**Figure 8** : Balance antioxydants-radicaux libres régulée par les antioxydants [30].

### I.4.2. Classification des antioxydants

Les antioxydants sont classés selon leur origine, en antioxydants naturels ou synthétiques, et selon leur mode d'action en antioxydants primaires ou secondaires [31].

#### I.4.2.1. Selon leurs natures

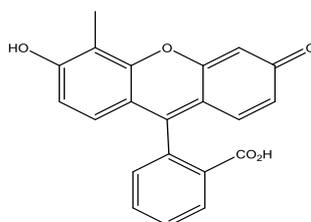
##### I.4.2.1.1. Les antioxydants de synthèse

Il existe de nombreux antioxydants synthétiques structurellement similaires aux antioxydants naturels (des analogues). Les antioxydants de synthèse sont introduits dans toutes les formulations contenant des corps gras insaturés et parfois aussi dans des phases aqueuses où se trouvent des extraits végétaux riches en oxydases [32].

A cause de l'instabilité des antioxydants naturels et pour stabiliser les matières grasses et les huiles, des antioxydants synthétiques sont alors utilisés [33].

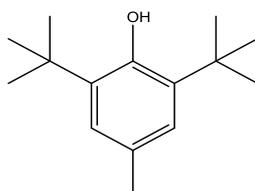
Les principaux antioxydants synthétiques sont :

- **Le Trolox** : ou acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique (Fig.9), est un analogue de la vitamine E. Il possède un fort potentiel antioxydant et sert souvent d'antioxydant de référence lors des tests biologiques [34].



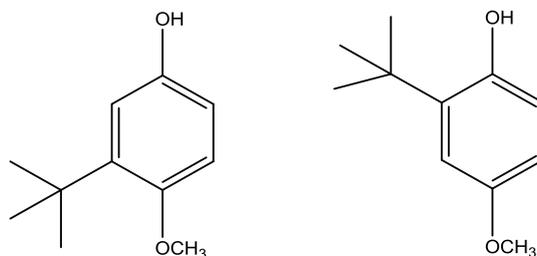
**Figure 9** : Structure chimique de Trolox

- **BHT** : Le 2,6-di-tertbutyl-4-méthoxyphénol, plus connu sous le nom de BHT (Fig.10). Est un antioxydant utilisé comme conservateur dans l'industrie agro-alimentaire [34].



**Figure 10** : Structure chimique de BHT

- **BHA** : est également utilisé dans ce domaine et possède deux isomères : le 3-tertbutyl-4-méthoxyphénol (I) et le 2-tertbutyl-4-méthoxyphénol (II) (Fig.11). L'isomère II a une activité antioxydante plus élevée que l'isomère I [34].



**Figure 11** : Structure chimique de BHA I et II

### I.4.2.1.2. Les antioxydants naturels

Plusieurs composés phénoliques et poly-phénoliques agissent comme antioxydants, et qui se trouvent largement dans l'alimentation. Il existe un très grand nombre de structures d'antioxydants naturels allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances polymérisées [35].

Les antioxydants d'origine naturelle sont des produits extraits de plantes et en particulier des épices comme : romarin, thym, cumin, sauge et origan [35].

Les molécules actives présentes dans ces sources naturelles d'antioxydants sont soit des flavonoïdes (Fig.12), qui du fait de leurs propriétés antioxydantes, liées à leur structure polyphénolique, les flavonoïdes ingérés avec nos aliments sont réputés protéger l'organisme contre les effets délétères des apports environnementaux oxydants, soit des dérivés d'acide benzoïque, soit des dérivés de l'acide cinnamique [36].

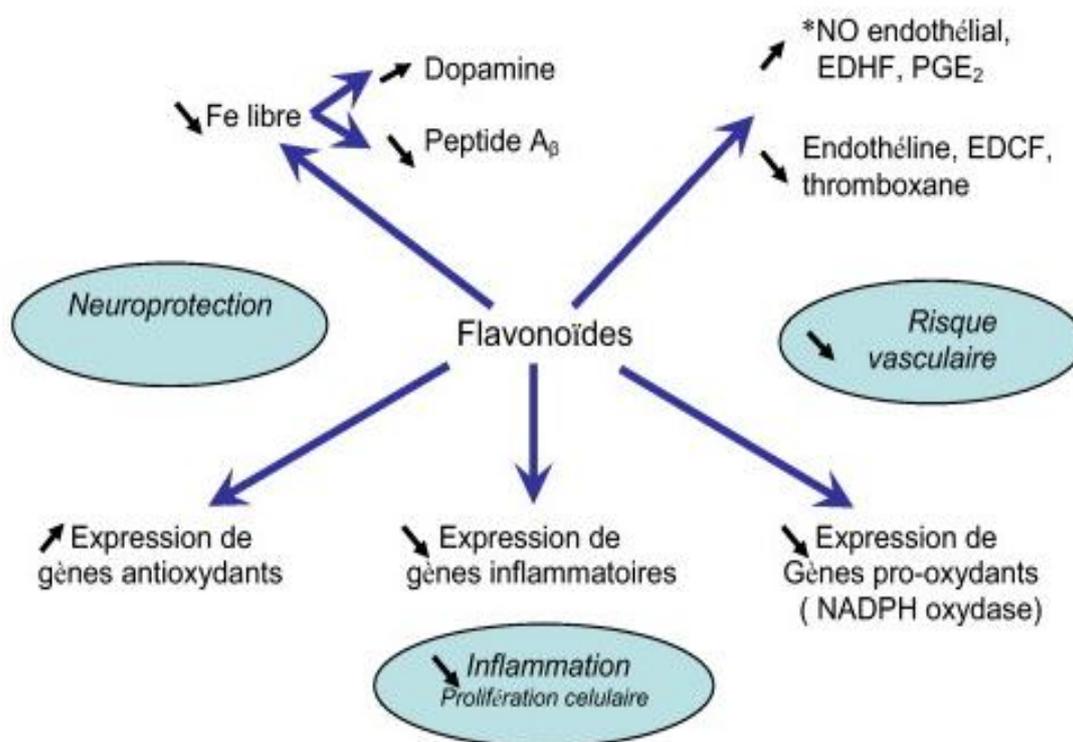


Figure 12 : Mécanisme putatifs des effets des flavonoïdes [36].

### I.4.2.1.3. Antioxydants synergiques

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants. Ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection, comme : les acides lactique (Fig.13), tartrique et orthophosphorique et leurs sels de sodium, potassium ou calcium [37].

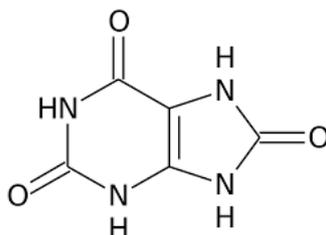


Figure 13 : structure chimique d'acide lactique

Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants [38].

### I.4.2.2. Selon leur mode d'action

Suivant leurs mécanismes d'action, les antioxydants peuvent être classés en trois types :

#### I.4.2.2.1. Les antioxydants de type I

Les antioxydants de type I sont des molécules ayant la capacité à inactiver les radicaux libres. Ils inhibent la propagation des réactions radicalaires en fournissant des hydrogènes aux radicaux libres présents dans le milieu. La figure 14 rapporte quelques structures d'antioxydants de type I [39].

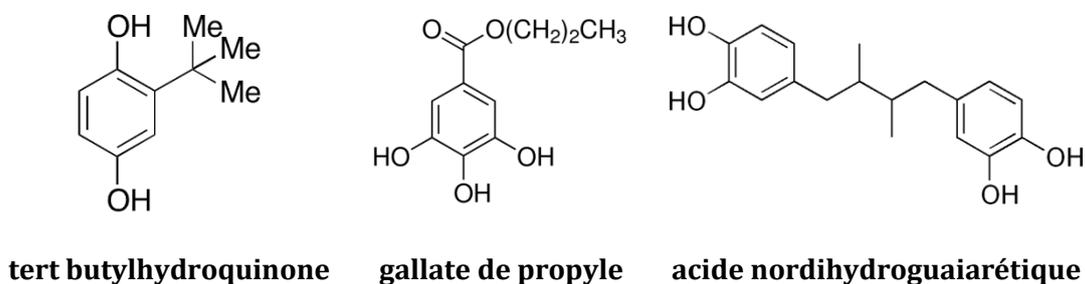


Figure 14 : Quelques structures d'antioxydants de type I.

#### I.4.2.2.2. Les antioxydants de type II

Ce type d'antioxydants prévient la formation des radicaux libres et peut intervenir par différents mécanismes. Les flavonoïdes (un énorme potentiel antioxydant naturel) rentrent dans cette catégorie d'antioxydants (Fig.15). Ils agissent en piégeant les radicaux libres et en complexant les métaux pro-oxydants [40].

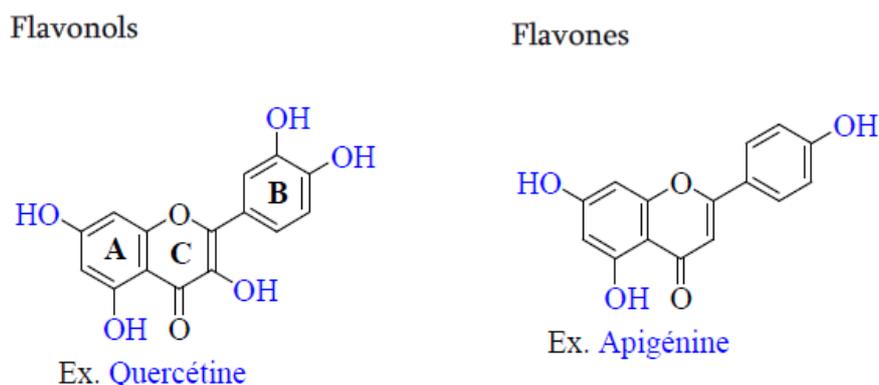


Figure 15 : Structure chimiques de quelques antioxydants type II

#### I.4.2.2.3. Les antioxydants de type III

Ils regroupent les facteurs de l'environnement qui ont une action antioxydante en agissant sur le potentiel redox du milieu, la température, la pression en oxygène, la lumière. L'efficacité des antioxydants peut être augmentée par l'utilisation d'un mélange d'antioxydants de type I et II. L'association de ces deux types d'antioxydants permet d'inhiber les phases d'initiation et de propagation de l'oxydation des lipides [41].

### I.4.3. Système de défense antioxydant

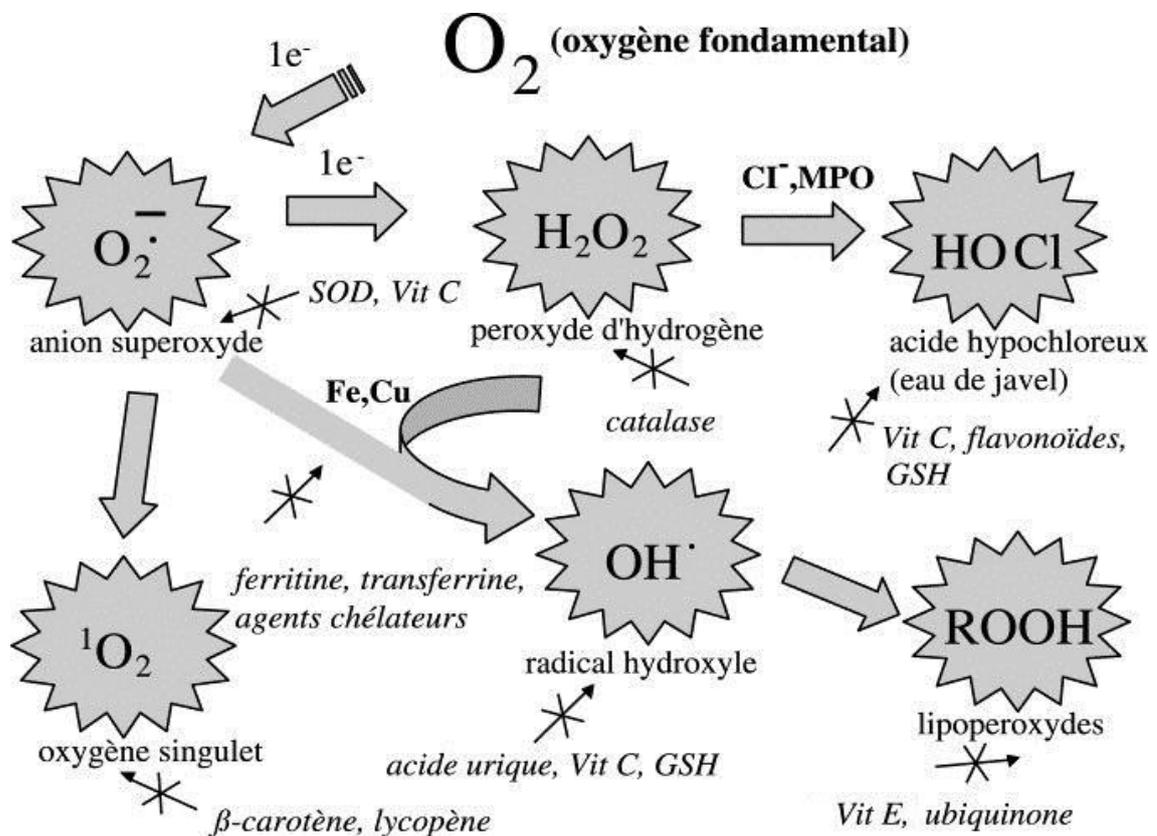
L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des ERO. Ces systèmes antioxydants interviennent donc pour protéger les cellules des dommages oxydatifs causés par les radicaux libres [42].

#### I.4.3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO. Ils assurent l'élimination de l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène (Fig.16). En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ERO, avec lesquelles elles réagissent très rapidement

pour les neutraliser [43]. Les différents systèmes enzymatiques connus par leur rôle antioxydant sont :

- **Superoxyde dismutase SOD** qui catalyse la dismutation de l'anion superoxydes oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène [44].
- **Catalase** La catalase est une enzyme très indispensable pour la détoxification des radicaux libres durant le stress dont la fonction principale est de catalyser la décomposition par dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène [44].
- **Glutathion peroxydase**, avec l'apport du Sélénium la glutathion peroxydase peut réduire le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques [44].



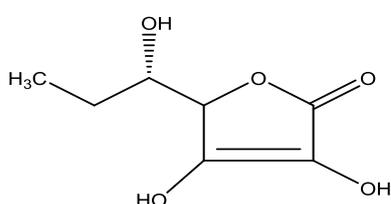
**Figure 16** : Régulation de la production d'ERO par les systèmes de défenses antioxydantes [45].

#### I.4.3.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart des antioxydants non enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Certains de ces composés ont le pouvoir de complexer des métaux de transition

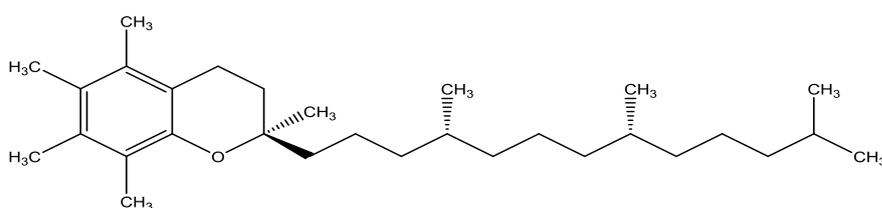
et empêcher la production des radicaux libres, d'autres antioxydants agissent en captant les électrons célibataires des radicaux libres et les transformer en molécules neutres ou ions stables ce sont des piègeurs [46].

- **Vitamine C** : La vitamine C, ou acide ascorbique, est une molécule hydrophile que l'on retrouve dans de nombreux fruits comme les oranges, les citrons et les fraises. Son caractère hydrophile ne lui permet pas d'avoir une activité intracellulaire. Sa formule chimique est  $C_6H_8O_6$ . Il possède une fonction ène-diol, deux fonctions alcool et une fonction lactone qui unit les carbones  $C_1$  et  $C_4$  [47].



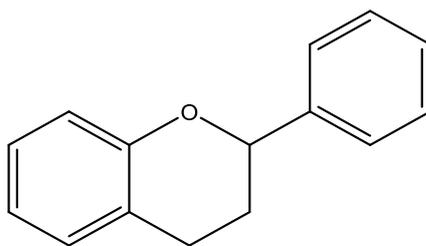
**Figure 17** : Structure chimique de la vitamine C.

- **Vitamine E** : Connue sous le nom des  $\alpha$ -tocophérols. Elle possède un pouvoir antioxydant très intéressant. La nature lipidique de l' $\alpha$ -tocophérol lui donne la capacité d'agir sur le site de la peroxydation lipidique membranaire. La vitamine E agit conjointement avec la vitamine C pour donner lieu à une chaîne de détoxications des radicaux libres [47].



**Figure 18** : Structure chimique de la vitamine E.

- **Composés phénoliques** : Ce sont des composés organiques qui font partie des métabolites secondaires des plantes. Ils sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs groupes phénoliques. Leur pouvoir antioxydant varie en fonction de leurs structures et leurs caractéristiques physico-chimiques. Ils peuvent être extraits à partir de plantes ou synthétiques [47].

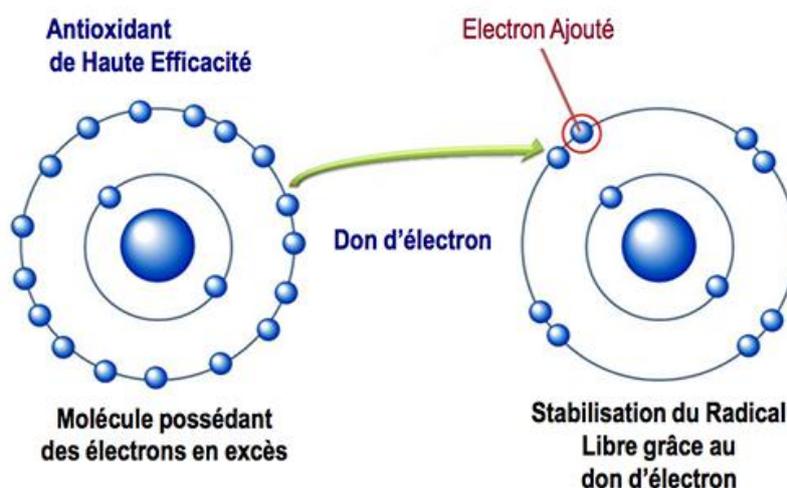


**Figure 19 :** Structure chimique de la 2-phénylbenzopyrane

- **Métaux** : ne sont pas des antioxydants en tant que tels, mais agissent comme cofacteurs des enzymes constituant la première ligne de défense face aux attaques oxydatives. Des métaux oligo-éléments comme le Cuivre le Manganèse et le Zinc, sont indispensables pour nombreuses réactions enzymatiques inhibitrices des ERO. Leur présence joue un rôle important dans la protection des cellules contre les stress oxydatifs [48].

#### I.4.4. Propriétés et mécanisme d'action des antioxydants

Vu du côté biochimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur, il joue un rôle donneur d'électrons lors de son réaction avec un oxydant pour le neutraliser (Fig.20). Les antioxydants vont ainsi réduire les radicaux libres dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé [49].



**Figure 20 :** Mécanisme de piégeage des radicaux libre par les antioxydants [49].

Les antioxydants intervient pour inhiber ou retarder l'oxydation d'autres molécules en inhibant. L'initiation ou propagation des réactions en chaîne oxydantes. Les antioxydants ont

acquis une grande importance en raison de leur potentiel en tant qu'agents prophylactiques et thérapeutiques dans de nombreuses maladies [50].

Les antioxydants piègent les radicaux libres en inhibant les réactions à l'intérieur des cellules provoqués par les molécules de dioxygène et de peroxyde radicalaires (ERO) et espèces azotées radicalaires (ERA) [50].

## I.5. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes

Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un produit pur ou de mélanges ont été examinées et regroupées selon leurs principes. Elles sont fondées sur la détermination de produits résultant de l'oxydation ou, au contraire, mesurent l'efficacité d'une substance à piéger des radicaux, souvent en donnant une forme H<sup>•</sup>.

Les principaux oxydants dans les milieux biologiques sont les radicaux libres et les métaux de transition. Les polyphénols désactivent les radicaux libres via trois mécanismes [48].

L'activité antioxydante est considérée comme la capacité à piéger les radicaux libres, par rapport d'un atome d'hydrogène ou d'un électron et la stabilisation des espèces formées. Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante dans le système biologique *in vitro* mais il reste très compliquées *in vivo*. Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron. Parmi ces techniques, nous citons:

- La méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle),
- La méthode TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox),
- La méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants),
- La méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène),
- La méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) [43].

### I.5.1. DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le DPPH (ou 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un composé cristallin violet que l'on peut conserver plusieurs mois à l'abri de la lumière [51].

Est un radical stable permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits. Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle. La réduction du DPPH° est facilement mesurée par spectrophotométrie à 515 nm ( $\lambda_{\max}$  DPPH°). La réaction sera plus ou moins rapide selon la nature de l'antioxydant, et la quantité de DPPH-H formée dépendra de la concentration en antioxydant [52].

### **I.5.2. ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate)**

Il est basé sur la capacité du composé à réduire le cation radicalaire ABTS<sup>•+</sup>, le composé à tester est ajouté au radical pré-formé, l'absorbance résiduelle du radical ABTS<sup>•+</sup> est mesurée à 734 nm. L'activité des composés est alors exprimée par la capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) [53].

Ce radical est utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant de fluides biologiques, de mélanges complexes ou de composés purs. Il est capable de réagir avec des antioxydants Classiques de type phénols et thiols, mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron [53].

### **I.5.3. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)**

Capacités réductrices ferriques d'antioxydants, cette méthode d'évaluation du potentiel antioxydant repose sur une mesure colorimétrique du transfert d'électrons d'un antioxydant vers un accepteur d'électron, elle est consisté à réduire les ions ferrique Fe<sup>3+</sup> [(Fe(III)-TPTZ] de couleur jaune aux ions ferreux Fe<sup>2+</sup> [(Fe(II)-TPTZ] de couleur vert-bleu, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électron [54].

### **I.5.4. Méthode par résonance paramagnétique électronique (RPE)**

La spectrométrie par résonance électronique (RPE) est la seule technique d'analyse capable de détecter spécifiquement les radicaux libres impliqués dans l'autoxydation et les processus associés. Cependant, bien que intrinsèquement sensible aux radicaux libres stables tels que le di-ter-butylnitroxyde, la RPE est malheureusement insensible à la détection de radicaux libres réactifs de courte durée impliqués dans l'autoxydation [55].

# **C**HAPITRE **II**

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Introduction

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par piégeage de différents radicaux, comme la méthode utilisant le radical libre «DPPH<sup>•</sup>», ou les radicaux «ABTS<sup>•</sup>», ainsi que les ions ferriques par la méthode «FRAP».

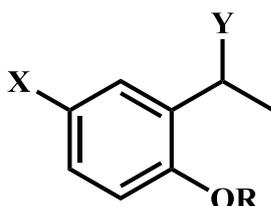
Comme nous avons déjà signalé brièvement dans l'introduction générale, nous nous sommes intéressés à évaluer le potentiel antioxydant de quelques analogues ouverts de Dihydrobenzopyrane.

Ce modeste travail a été réalisé au sein de laboratoire de pharmacologie et de phytochimie à la faculté des sciences exactes et informatique de l'université de Jijel.

### II.2. Matériel

#### II.2.1. Produits chimiques à tester

Nous avons évalué l'effet antioxydant de 30 molécules (Tableau 02, Fig.21), qui sont des analogues ouverts de dihydrobenzopyrane portant différentes fonctions, cétone, alcool, amide, amine, oxime, carbamate, sulfonylurée et thiourée. Ces molécules sont issues de la synthèse organique qui a été effectuée par M. BOUHEDJA et *al.* Certaines molécules ont été déjà montrées une importante activité relaxante sur l'aorte et la trachée de rat [56].

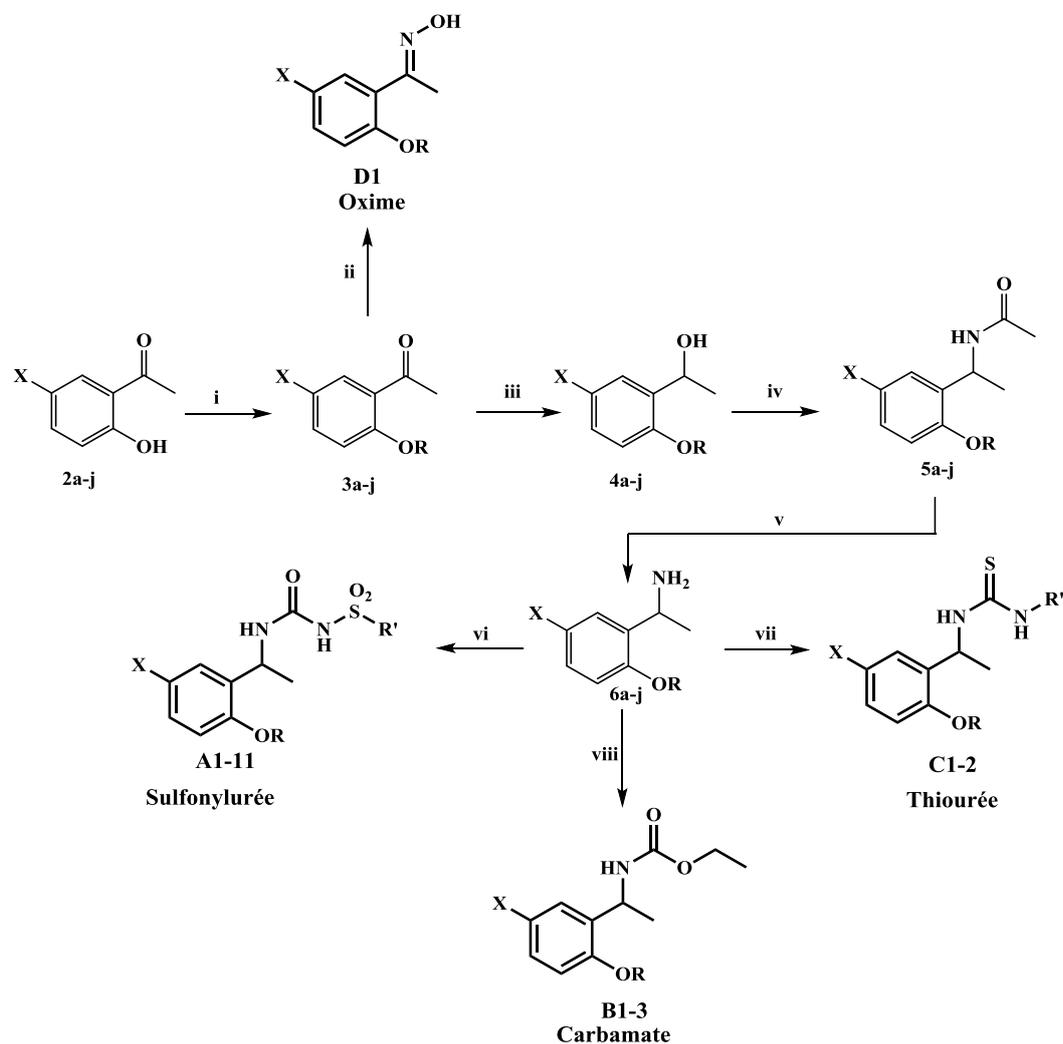


**Y= O=** , Cétone ; **Y= HO-N=**, Oxime; **Y= OH**, Alcool ; **Y= NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>**, Amine  
**Y= NHCOCH<sub>3</sub>**, Amide ; **Y= NHCOOEt**, Carbamate ;  
**Y= NHCONHSO<sub>2</sub>R'**, Sulfonylurée ; **Y= NHCSNHR'**, Thiourée.

**Figure 21:** Structure de base des molécules à tester portant des groupements variés.

## II.2.2. Voies de synthèse des molécules testées

### ➤ Synthèse des molécules de la série I

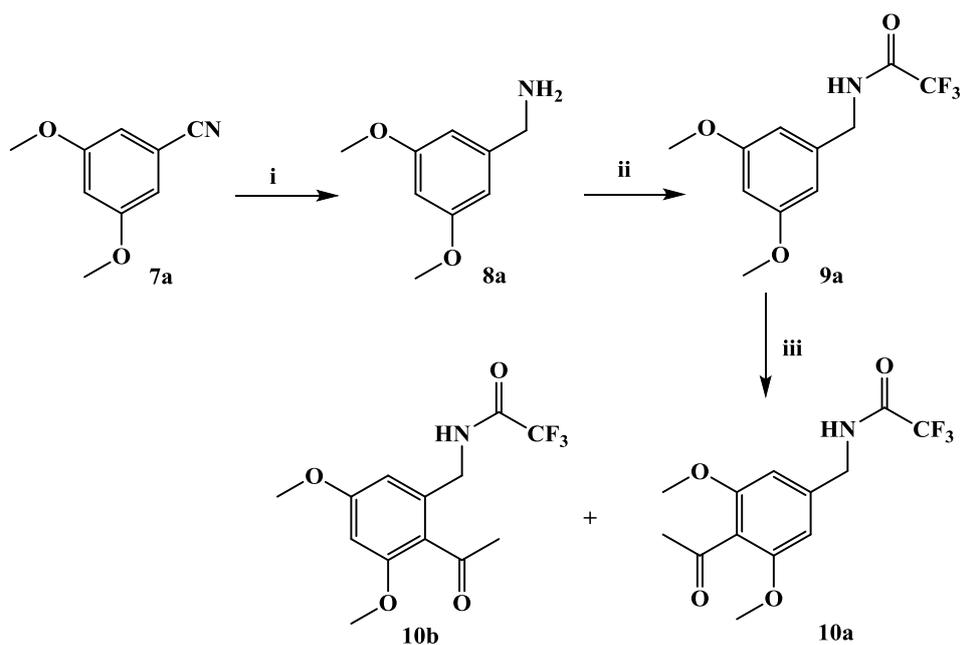


**Réactifs:** (i)  $K_2CO_3$ , RX, DMF; (ii)  $NH_2OH$ , HCl,  $CH_3COONa/EtOH$  (iii)  $NaBH_4$ , MeOH; (iv)  $CH_3CN$ ,  $H_2SO_4$ ; (v) NaOH, MeOH- $H_2O$  250 °C; (vi) 4- $ZC_6H_4SO_2NCO$ ,  $CH_2Cl_2$ ; (vii) 3/4- $CNC_6H_4NCS$ ,  $CH_2Cl_2$ ; (viii) 1)  $K_2CO_3/H_2O-AcOEt$ , 2)  $ClCO_2Et$ , 0 °C.

**Figure 22:** Voie de synthèse des molécules cibles de la série I : **4a**, **5a-d**, **6a-b**, **A1-11**, **B1-3**, **C1-2** et

**D1.**

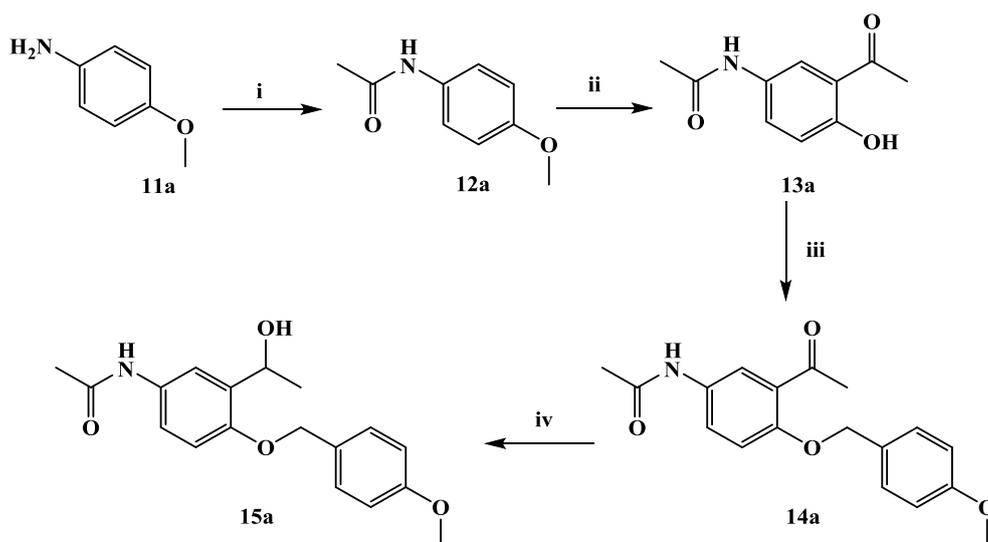
➤ Synthèse des molécules de la série II



Réactifs: (i)  $\text{AlCl}_3\text{-LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ ; (ii)  $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; (iii) 1)  $\text{SnCl}_4$ , DCE, 2)  $\text{CH}_3\text{COCl}$ .

Figure 23: Voie de synthèse des molécules cibles de la série II : 9a et 10a-b.

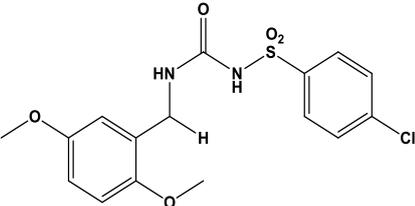
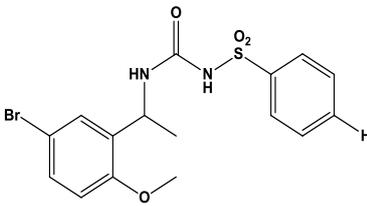
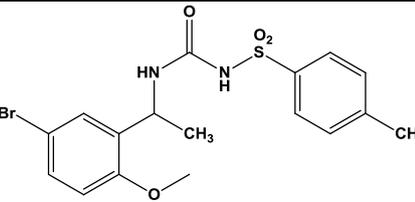
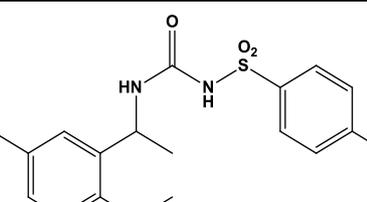
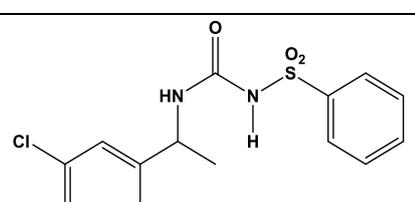
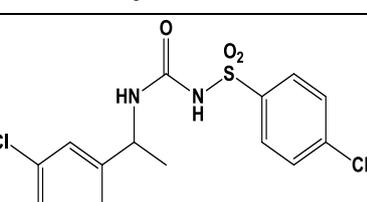
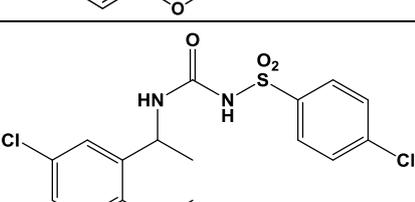
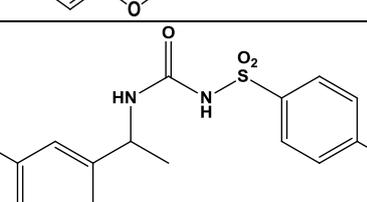
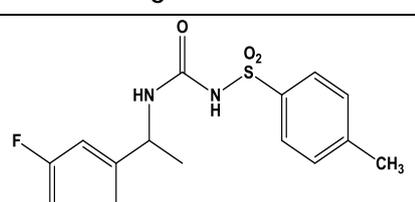
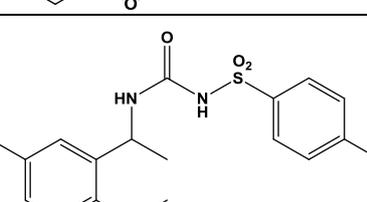
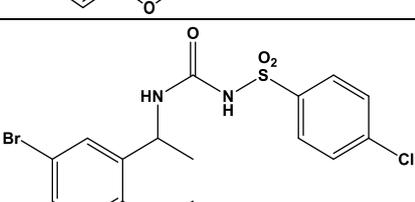
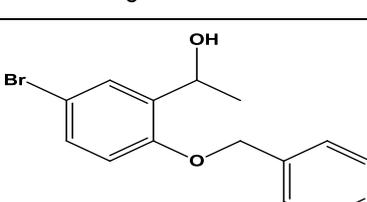
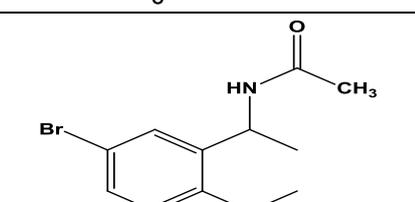
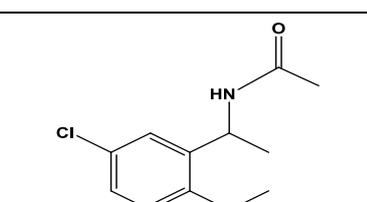
➤ Synthèse des molécules de la série III

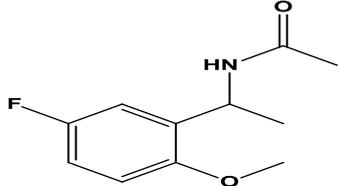
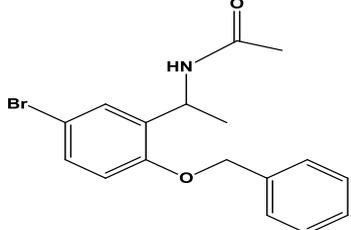
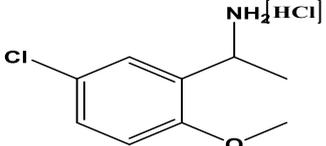
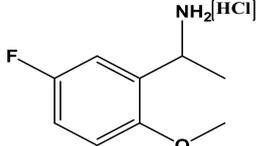
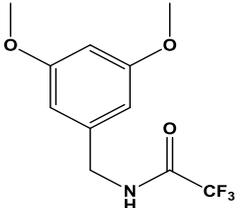
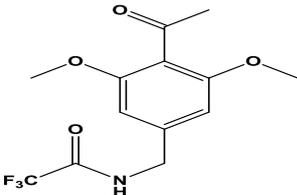
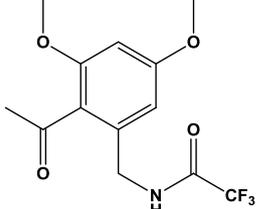
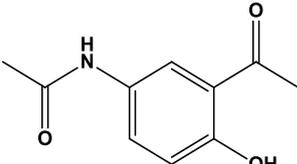
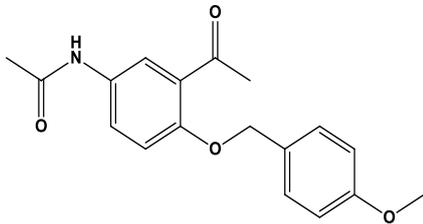
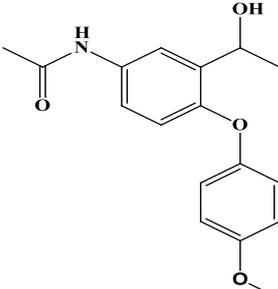
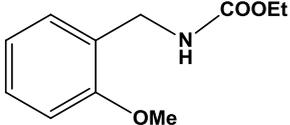
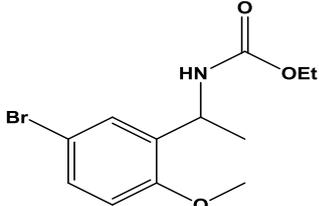
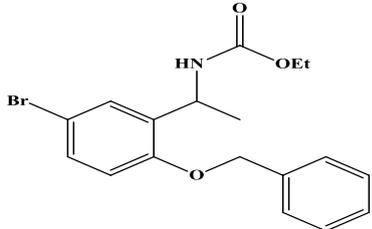
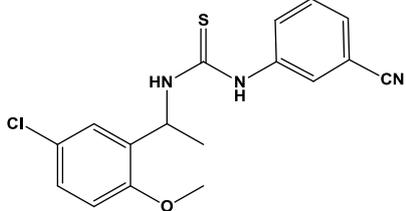


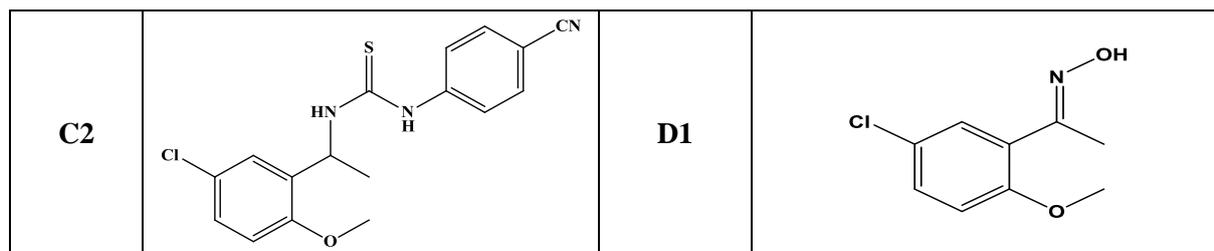
Réactifs: (i)  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; (ii)  $\text{CH}_3\text{COCl}$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; (iii)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , RX, DMF; (iv)  $\text{NaBH}_4$ , MeOH.

Figure 24 : Voie de synthèse des molécules cibles de la série III : 13a, 14a et 15a.

**Tableau 01** : Structure et nomenclature de différents composés à tester comme antioxydant.

Produit	Structure chimique	Produit	Structure chimique
A1		A2	
A3		A4	
A5		A6	
A7		A8	
A9		A10	
A11		4a	
5a		5b	

5c		5d	
6a		6b	
9a		10a	
10b		13a	
14a		15a	
B1		B2	
B3		C1	



### II.2.3. Réactifs et produits utilisés

- Solvants organiques : Méthanol, Ethanol, Diméthylsulfoxyde (DMSO), Eau distillée
- Acides : Trichloroacide acétique (TCA), Acide ascorbique (référence).
- Réactifs chimiques : l'ABTS, le DPPH et le Ferricyanure de Potassium ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ).
- Tampon phosphate : le pH est à 6,4 vérifié en utilisant un pH-mètre.
- Sels : Monopotassium Phosphate ( $KH_2PO_4$ ), Dipotassium Phosphate ( $K_2HPO_4$ ) pour la préparation du tampon et le Chlorure de fer ( $FeCl_3$ ) utilisé au test FRAP.

### II.2.4. Matériels et outils

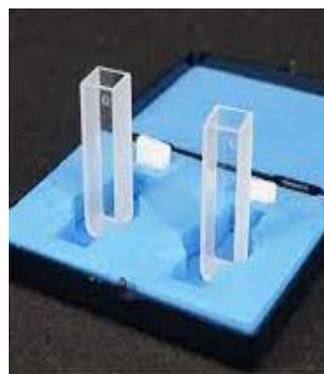
- pH-mètre : ajustement du pH des tampons
- Bain marie : pour l'incubation à des températures fixes.
- Les absorbances ont été effectuées en utilisant deux appareils spectrophotomètre UV-visible.



**Shimadzu-UV-  
Mini1240.**



**SECOMAM**



**cuve en quartz**

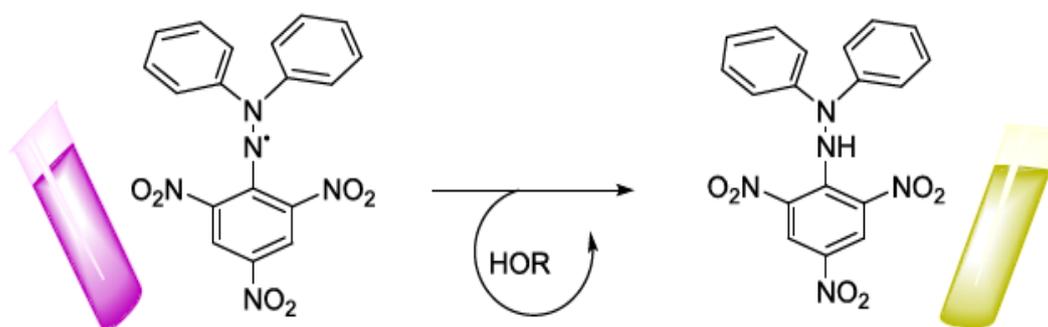
## II.3. Méthode d'évaluation

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger de l'effet antioxydant global d'un composé synthétisé ou d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire.

### II.3.1. Piégeage du radical libre (DPPH<sup>•</sup>)

La méthode de l'évaluation de l'activité antioxydante par piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) stable à base d'azote est très utilisée pour distinguer les composés les plus actifs. Basée sur le changement de la couleur violette du DPPH<sup>•</sup> en jaune après réduction par le procédé de transfert d'hydrogènes ou d'électron. L'acide ascorbique est un puissant antioxydant, il est utilisé comme témoin.

La réaction de transfert d'hydrogène de l'antioxydant vers le DPPH<sup>•</sup> est suivie par spectroscopie visible en enregistrant la décroissance de la bande d'absorption du DPPH<sup>•</sup> à 515 nm.



**Figure 25** : Réaction d'un donneur d'hydrogène avec le radical DPPH.

Le test au radical DPPH est généralement utilisé pour les composés, qui contiennent les groupements donneurs d'hydrogène, comme R<sub>2</sub>-NH, R-OH et R-SH. Lorsque le DPPH<sup>•</sup> réagit avec un antioxydant, un atome d'hydrogène vient se fixer sur le radical, ce qui entraîne une perte de couleur. C'est ce qui permet le suivi de l'efficacité d'un antioxydant par spectrophotométrie.

## Mode opératoire

### ➤ Préparation de la solution DPPH

Une quantité de DPPH sous forme de poudre a été solubilisée dans le DMSO avec une concentration de 60 $\mu$ M, la solution obtenue est agitée pendant 1h à l'obscurité et à 0°C.

### ➤ Préparation des solutions des produits à tester

Les composés à tester, sous forme de poudre, ont été solubilisés dans le DMSO, une solution mère de concentration de 1mg/mL a été préparée pour chaque produit, ensuite 50 $\mu$ L de chaque solution mère préparé des produits sont ajoutées à 1950  $\mu$ L de la solution fraîche du DPPH (60 $\mu$ M). Toutes les molécules ont été testées à cette concentration (1  $\mu$ g/ $\mu$ L), le test est répété 3 fois.

Parallèlement, un contrôle négatif (blanc) est préparé en mélangeant 50 $\mu$ L de DMSO avec 1950  $\mu$ L de la solution mère de DPPH. La lecture des absorbances se fait, à 515nm après 30min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : l'acide ascorbique, dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons, et pour chaque concentration le test est répété 3 fois [57].

Des solutions diluées ont été préparées par la suite à partir de la solution mère pour les composés montrant une activité à la concentration de 1 $\mu$ g/ $\mu$ L, afin de déterminer les concentrations à 50 % de l'effet maximal (IC<sub>50</sub>).

**Tableau 02** : Préparation des solutions mère et diluées.

Solution à tester	S <sub>m</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>
Concentration ( $\mu$ g/mL)	1000	500	250	100	50	25	10	5
Volume total (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1

Les absorbances mesurées à 515 nm servent alors à déterminer le pourcentage de réduction du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon, et qui représente la concentration nécessaire de l'échantillon pour réduire 50% de radical libre DPPH. Calculé selon l'équation(01) suivante :

$$PI(\%) = [A(\text{blanc}) - A(\text{échantillon}) / A(\text{blanc})] \times 100$$

A : absorbance pour une concentration en antioxydant.

### II.3.2. Test de piégeage du radical-cation ABTS

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical-cation ABTS est basée sur la capacité des composés antioxydants à piéger le radical-cation  $ABTS^{\bullet+}$ , et donc sur le changement de la couleur bleu-vert et le convertir à la forme non radicalaire incolore. L'acide ascorbique est un puissant antioxydant, il est utilisé comme témoin.

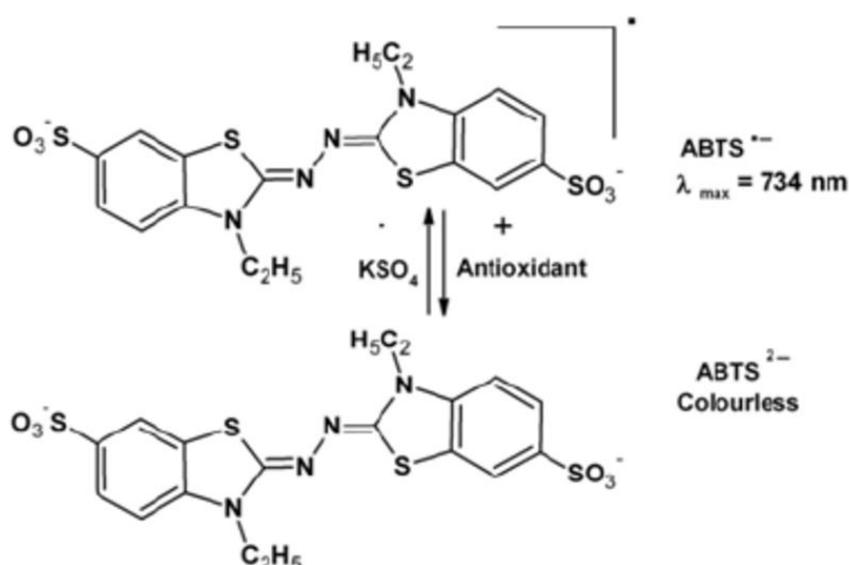


Figure 26 : Modification de l'ABTS<sup>•+</sup> lors du transfert électronique.

#### Mode opératoire

##### ➤ Préparation de la solution ABTS<sup>•+</sup>

Le test est basé sur le protocole de Re et *al.* (1999) en y apportant quelques modifications. Le radical cation  $ABTS^{\bullet+}$  a été produit par la réaction entre ABTS (7mM) dans l'eau et (2,45mM) de persulfate de sodium (1:1), conservée dans l'obscurité à la température ambiante pendant 12h à 16h avant l'utilisation. La solution  $ABTS^{\bullet+}$  a été ensuite diluée avec de l'éthanol pour obtenir une absorbance de 0,700 à 734 nm.

##### ➤ Préparation des solutions des produits à tester

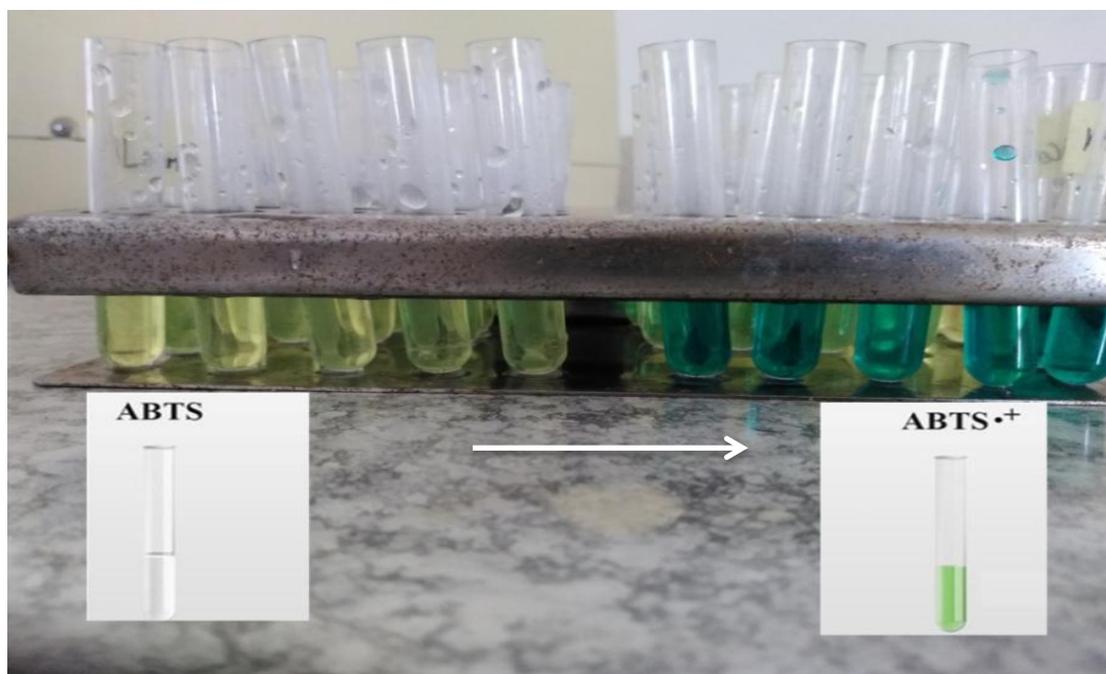
Les mêmes préparations préliminaires que ceux décrit dans le cas du test DPPH sont réalisés ici. Dont, 1mg de chaque composé à tester a été solubilisé dans 1mL de DMSO, 100 $\mu$ l de chaque solution a été ajouté à 900 $\mu$ l de la solution  $ABTS^{\bullet+}$  diluée dans l'éthanol.

Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 100 $\mu$ l de DMSO avec

900 $\mu$ L de la solution éthanolique de l'ABTS, l'absorbance a été mesurée après 10min d'incubation à température ambiante.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique. L'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test est effectué en triple.

Des solutions diluées ont été préparées par la suite à partir de la solution mère pour les composés montrant une activité à la concentration de 1mg/ml. La première préparation constitue la solution mère, puis on a effectué 7 dilutions afin de déterminer l'absorbance de ces produits [58].



**Figure 27** : Modification de l'ABTS<sup>•+</sup> lors du transfert électronique.

- La capacité à piéger le radical ABTS<sup>•+</sup> est alors exprimée par l'équation suivante :

$$\text{PI\%} = [1 - (\text{Absorbance de l'échantillon} / \text{Absorbance du contrôle})] \times 100$$

### II.3.3. Test de pouvoir réducteur (FRAP)

Cette méthode est basée sur la réaction de réduction de l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en ion ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ). La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) vers la couleur bleu-vert du fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ). L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm. Les conditions d'essai favorisent la réaction du complexe et donc le développement de la couleur, à condition qu'un réducteur (antioxydant) soit présent.



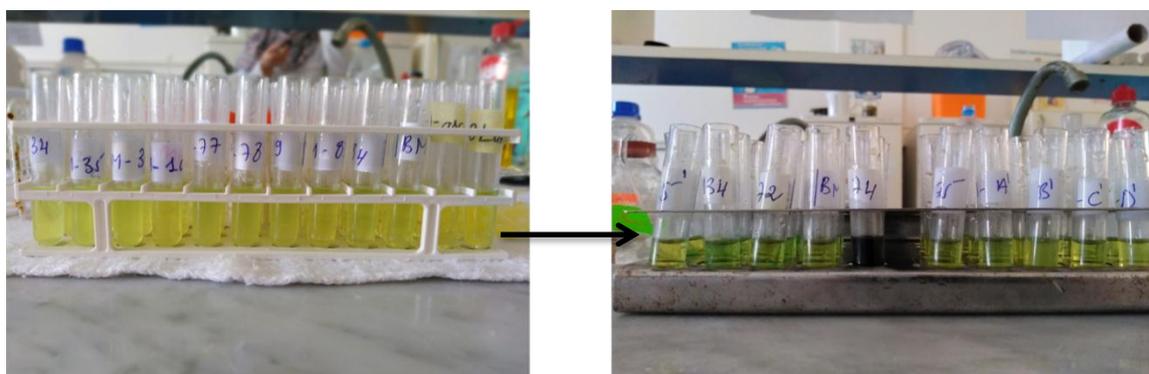
**Figure 28** : Coloration bleu cyanée de la réduction de fer en présence de l'acide ascorbique.

#### Mode opératoire

L'activité réductrice d'un composé est évaluée par la réaction d'oxydoréduction entre la molécule et les ions métalliques de transition, notamment le fer. Le ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  fournit des ions ferriques ( $\text{Fe}^{+3}$ ) qui seront réduits en fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ) par les antioxydants présents. Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986) avec quelques modifications.

Dans des tubes à essai, 100 $\mu\text{L}$  de l'échantillon à différentes concentrations est mélangé avec 250 $\mu\text{L}$  d'une solution tampon phosphate (0,2M ; pH : 6,4) et 250 $\mu\text{L}$  d'une solution de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1% dans l'eau distillée. Le mélange est incubé dans des tubes à 50 °C pendant 20 minutes. Après retour des tubes à température ambiante, 250  $\mu\text{L}$

d'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis on ajoute 850 $\mu$ L d'eau distillée, nous additionnons ensuite au mélange 170 $\mu$ L d'une solution de chlorure de fer III ( $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 0,1% fraîchement préparée. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'échantillon par le DMSO qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS). L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions que les échantillons. Chaque test est répété 3 fois. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation de l'activité antioxydante [59].



**Figure 29 :** Coloration bleu cyanée de la réduction de fer de quelques composés actifs.

### ✚ Détermination des concentrations réelles

Nous avons recalculé les concentrations réelles dans chaque tube pour chaque solution et nous avons obtenu les résultats suivants :

#### ➤ Pour le test DPPH

$$C_1=1000\mu\text{g/ml}$$

D'après la loi de dilution :

$$C_1V_1 = C_2V_2 \longrightarrow C_2 = C_1V_1/V_2 = 1000*50/2000 \longrightarrow C_2=25 \mu\text{g/ml}$$

#### ➤ Pour le test ABTS

$$C_1=1000\mu\text{g/ml}$$

$$C_1V_1=C_2V_2 \longrightarrow C_2= C_1V_1/V_2=1000*100/1000 \longrightarrow C_2 = 100 \mu\text{g/ml}$$

➤ Pour le test de FRAP

$$C_1=1000\mu\text{g/ml}$$

$$C_1V_1=C_2V_2 \longrightarrow C_2=C_1V_1N_2=1000 \cdot 100/1870 \longrightarrow C_2 = 53,4 \mu\text{g/ml}$$

**Tableau 03** : Les concentrations réelles de chaque solution.

Test	[C] <sub>mère</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	1000	500	250	100	50	25	10	5
<b>DPPH</b>	[C] <sub>réelle</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	25	12.5	6.25	2.5	1.25	0.625	0.25	0.125
<b>ABTS</b>	[C] <sub>réelle</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	100	50	25	10	5	2.5	1	0.5
<b>FRAP</b>	[C] <sub>réelle</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	53.4	26.7	13.3	5.34	2.67	1.33	0.53	0.26

# **C**HAPITRE **III**

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Introduction

Dans cette partie, nous allons présenter les principaux résultats obtenus et les discuter, lors de l'évaluation de l'activité antioxydante par trois méthodes complémentaires: les méthodes de piégeage des radicaux libres **ABTS**, **DPPH**, et la méthode de **FRAP**. Les mesures sont effectuées par spectrophotométrie. L'acide ascorbique est choisi comme référence.

#### III.2. Test de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

L'activité antioxydante a été évaluée en mesurant la diminution de l'absorbance à 515 nm. L'expérience est réalisée trois fois et l'absorbance moyenne est notée pour chaque mesure afin de vérifier la reproductibilité. La même procédure est suivie pour le contrôle positif. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (PI%) ou en % de piégeage des radicaux DPPH<sup>•</sup>. La diminution de l'absorbance de la solution DPPH<sup>•</sup> indique une augmentation de l'activité de piégeage des radicaux DPPH<sup>•</sup> (pourcentage d'inhibition I%).

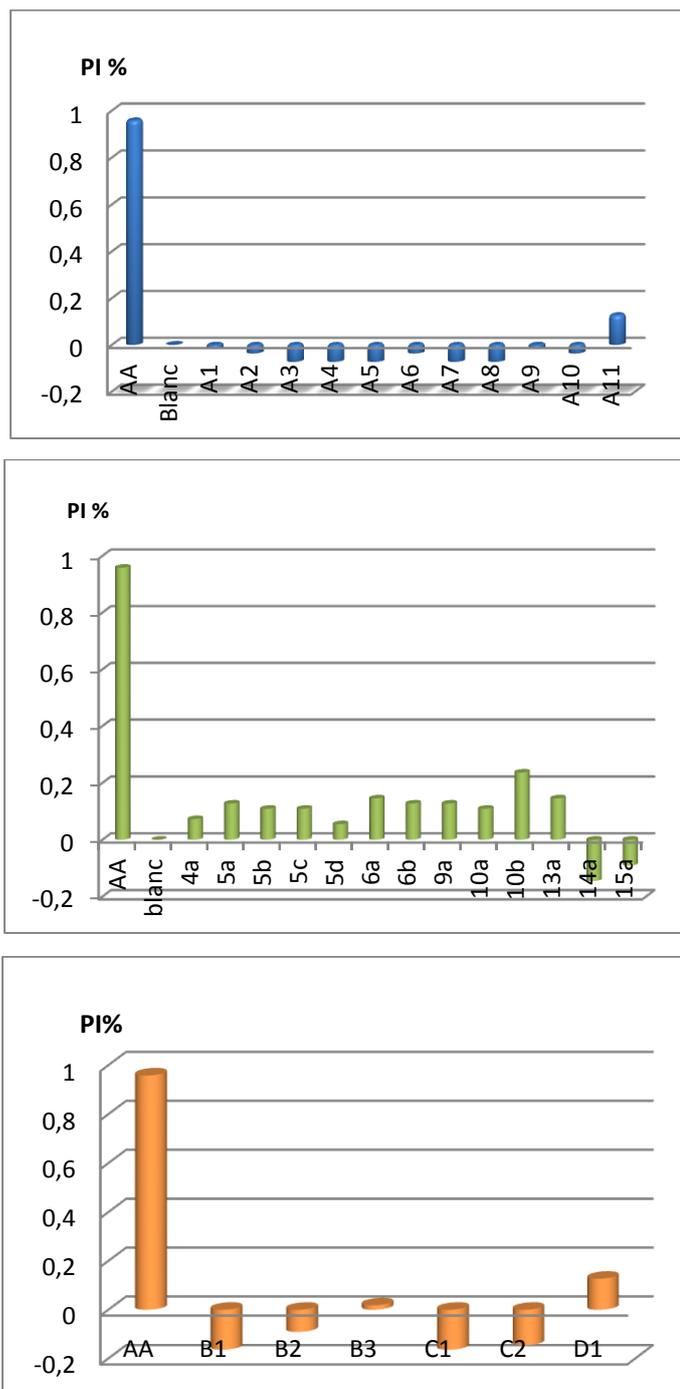
Les absorbances des composés mesurées d'une concentration de 1mg/ml permettent de faire une présélection de ceux qui présentent une activité. Les résultats obtenus sont représentés dans Le tableau suivant :

**Tableau 04** : Absorbance des composés, d'A.A et de contrôle négatif

<b>Produit</b>	<b>A<sub>moyenne</sub></b>	<b>Produit</b>	<b>A<sub>moyenne</sub></b>
<b>A.A</b>	<b>0,023</b>	<b>Blanc</b>	<b>0,55</b>
<b>A1</b>	<b>0,56</b>	<b>5d</b>	<b>0,52</b>
<b>A2</b>	<b>0,57</b>	<b>6a</b>	<b>0,47</b>
<b>A3</b>	<b>0,59</b>	<b>6b</b>	<b>0,48</b>
<b>A4</b>	<b>0,59</b>	<b>9a</b>	<b>0,48</b>
<b>A5</b>	<b>0,59</b>	<b>10a</b>	<b>0,49</b>
<b>A6</b>	<b>0,57</b>	<b>10b</b>	<b>0,42</b>
<b>A7</b>	<b>0,59</b>	<b>13a</b>	<b>0,47</b>
<b>A8</b>	<b>0,59</b>	<b>14a</b>	<b>0,63</b>
<b>A9</b>	<b>0,56</b>	<b>15a</b>	<b>0,60</b>
<b>A10</b>	<b>0,57</b>	<b>B1</b>	<b>0,64</b>
<b>A11</b>	<b>0,48</b>	<b>B2</b>	<b>0,60</b>
<b>4a</b>	<b>0,51</b>	<b>B3</b>	<b>0,54</b>
<b>5a</b>	<b>0,48</b>	<b>C1</b>	<b>0,64</b>
<b>5b</b>	<b>0,49</b>	<b>C2</b>	<b>0,63</b>
<b>5c</b>	<b>0,49</b>	<b>D1</b>	<b>0,48</b>

Pratiquement, on remarque que, parmi les 30 composés testés, il n'y a aucun composé présent une absorbance inférieure à 0,3 qui correspond à un pourcentage d'inhibition de 50 % de la concentration initiale, donc ces molécules n'ont pas la capacité à réduire 50 % du DPPH<sup>\*</sup> initialement introduit.

Les trois histogrammes suivant (Fig.30) permettent de comparer les valeurs PI% de nos composés à celle de l'acide ascorbique et de contrôle négatif.



**Figure 30 :** Histogramme comparatif des échantillons, de blanc et de l'acide ascorbique.

La figure 30 montre que tous les produits qui ont été testé possèdent un pourcentage d'inhibition très faible par rapport à l'acide ascorbique, ce qui résulte que ces produits sont inactifs, revient à certains facteurs lors de l'expérience. Cela peut être dû à la précipitation de certains composés, où ils se dissolvent dans une solution de DMSO, alors que la présence de ces produits dans un milieu aqueux conduit à la formation d'un précipité entraîne une turbidité de la solution et donc une augmentation d'absorption.

Ainsi que certains composés ont également des couleurs foncées donnent des solutions colorées, ce qui augmente l'absorption dans cette longueur d'onde, ces couleurs sont parfois trop concentrées pour être utilisées dans les mesures de l'activité antioxydante par cette méthode, à moins de diluer les solutions.

### III.3. Test de piégeage du radical-cation ABTS

L'activité antioxydante des analogues ouverts de Dihydrobenzopyrane sont ainsi mesurés en comparant un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique (vitamine C). Au cours de ce test, l'acide ABTS de couleur bleu-vert perd un électron pour former le radical cation  $ABTS^{\bullet+}$  de couleur bleue, qui se décolore en présence d'une substance antioxydante.

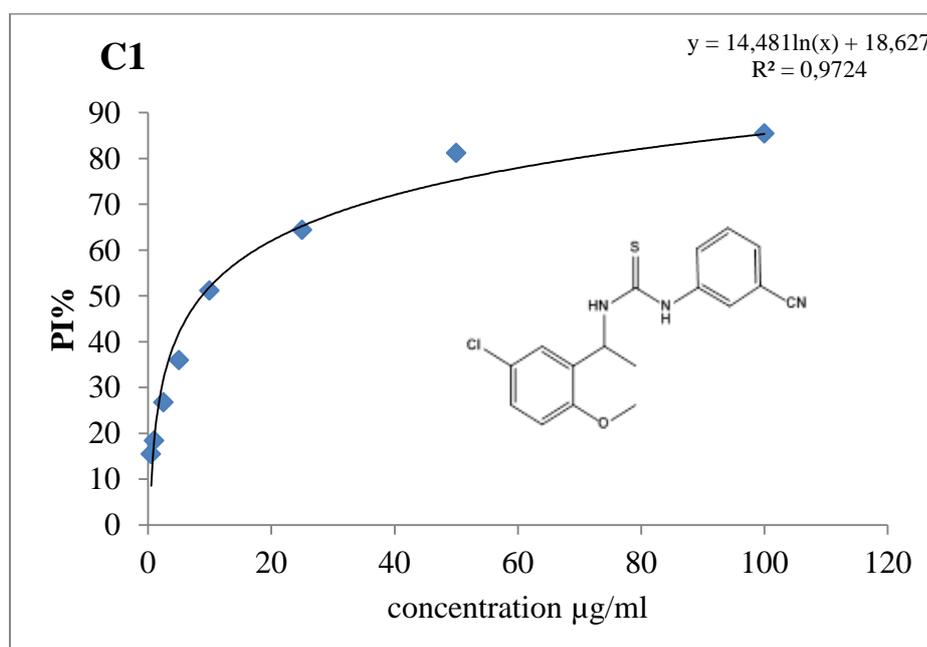
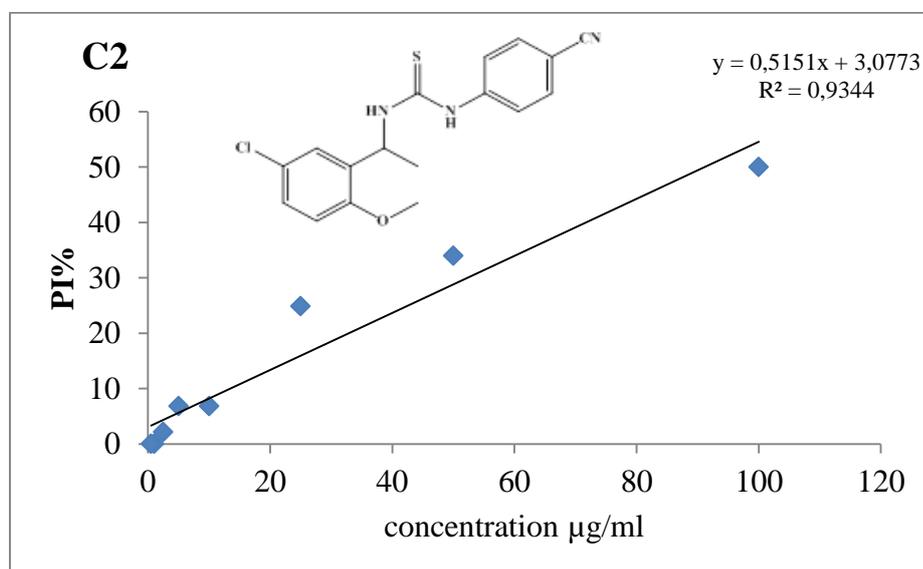
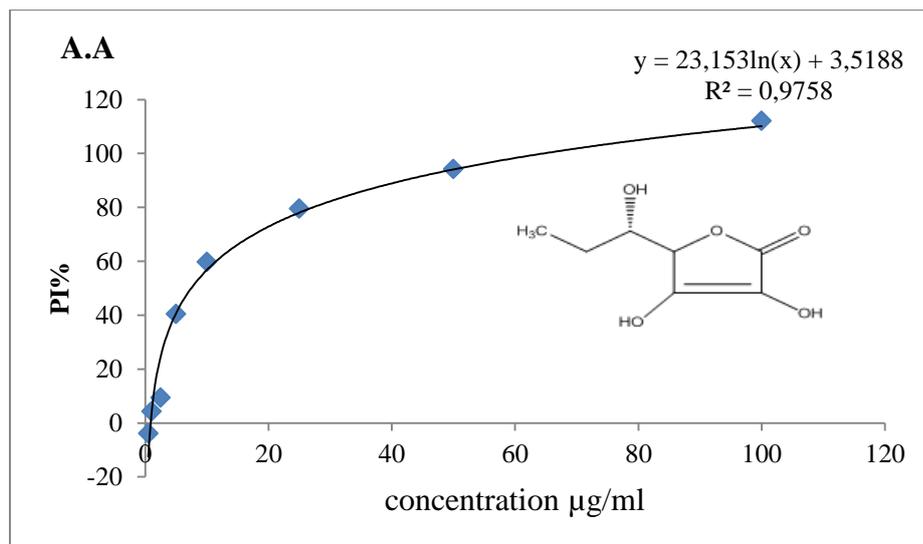
A une concentration de 1mg/ml, il y a seulement trois composés présentent une absorbance inférieure de 0,4 (environ 50% d'effet de cette concentration). Cependant, les valeurs d'absorption d'acide ascorbique sont très élevées par rapport à ces composés.

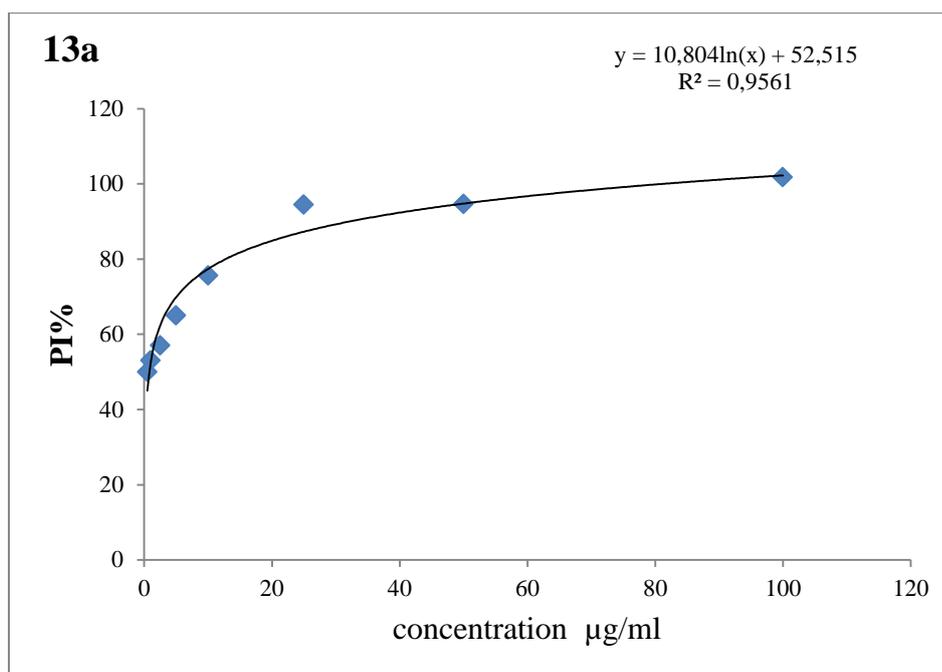
A cet effet, nous avons préparé des dilutions pour les composés qui montrent une capacité antioxydante, puis on a déterminé le pourcentage d'inhibition PI% de l'acide ascorbique et de chaque composé, le tableau suivant représente les résultats obtenus :

**Tableau 05** : pourcentage d'inhibition des composés actifs et d'A.A.

C ( $\mu\text{g/ml}$ )		100	50	25	10	5	2.5	1	0.5
C1	PI%	85,47	81,18	64,38	51,13	35,98	26,76	18,43	15,52
13a		101,76	94,68	94,44	75,62	65,02	57,06	53,02	49,99
C2		49,99	33,96	24,87	6,8	6,8	2,13	0	0
A.A		112,11	94,15	79,51	59,71	40,39	9,34	4,29	0

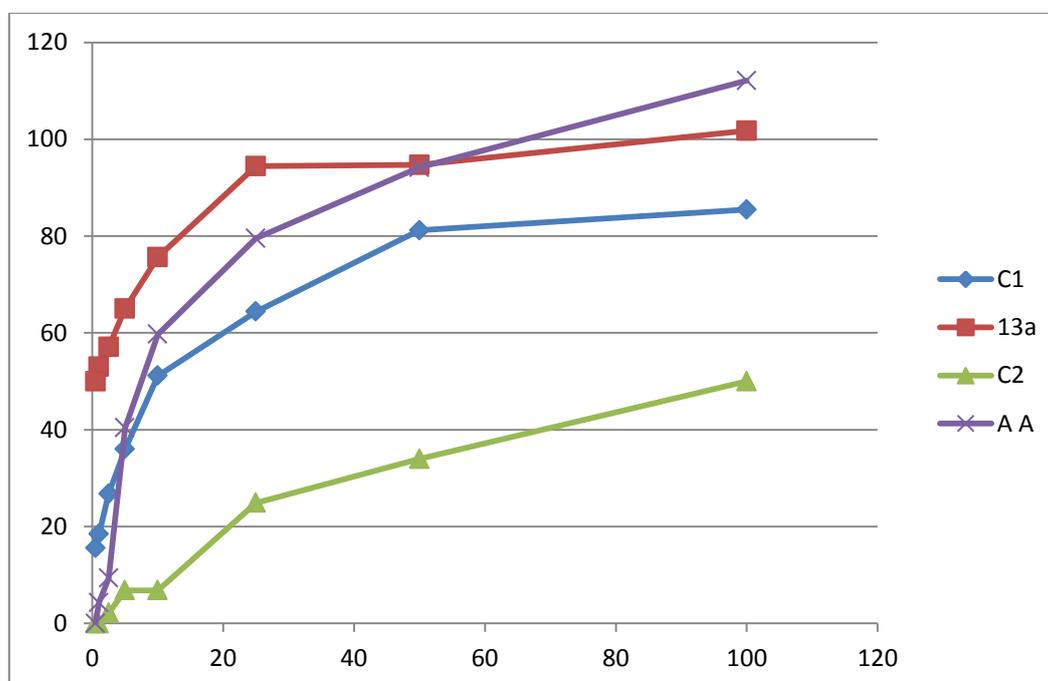
La Figure suivante montre que le radical cation  $ABTS^{\bullet+}$  a été inhibé de façon significative à toutes les concentrations testées, et de manière dose dépendante de produit. Parmi les 30 molécules, nous avons remarqué que la totalité des composés portant une fonction thiourée (C1, C2) possèdent un effet antioxydants.





**Figure 31** : variation du pouvoir d’inhibition en fonction de la concentration des composés: A.A, C1, C2 et 13a.

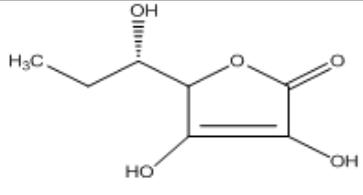
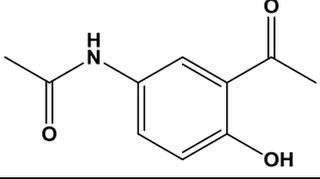
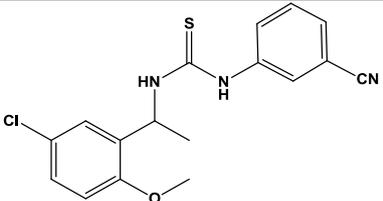
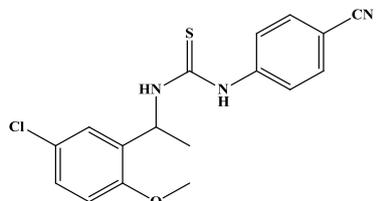
La figure 32, qui représente la variation de la valeur de PI% en fonction de concentration du composé testé permet de mieux comparer la capacité inhibitrice de nos composés.



**Figure 32** : variation de PI% du ABTS de : A.A, C1, C2 et 13a en fonction de concentration

Les deux composés **C1** et **13a** donnent des valeurs proches à celle de l'acide ascorbique, alors que le composé **C2** a une capacité mais avec un pourcentage très faible. Ces trois composés ont montrés donc une capacité à piéger le radical-cation  $ABTS^{\bullet+}$ . Cela permet de déterminer l' $IC_{50}$  des différents composés. Les résultats seront indiqués sur le tableau 06 sous forme d' $IC_{50} \pm s.e.m.$

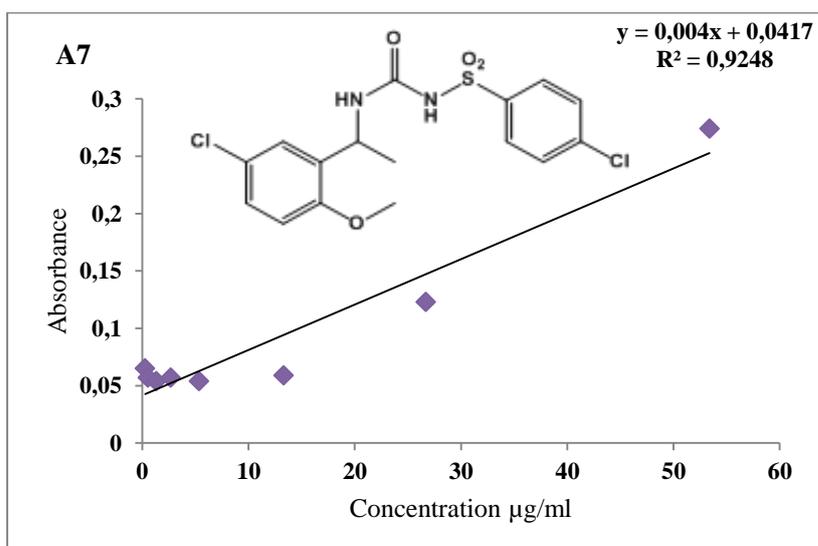
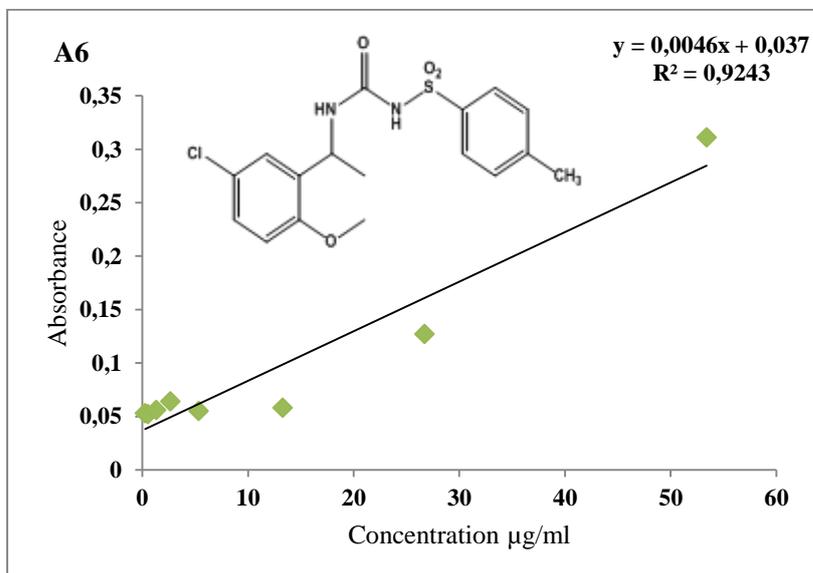
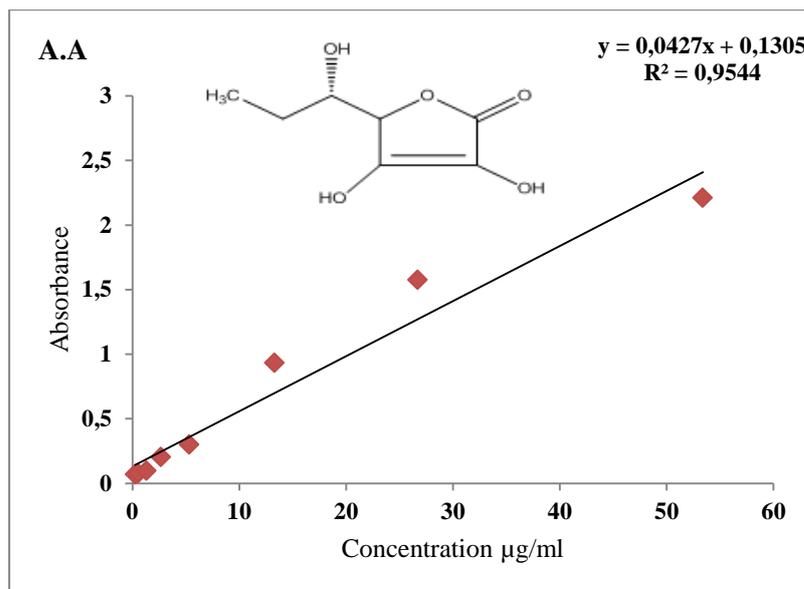
**Tableau 06** :  $IC_{50}$  des composés actifs et d'acide ascorbique avec le test ABTS.

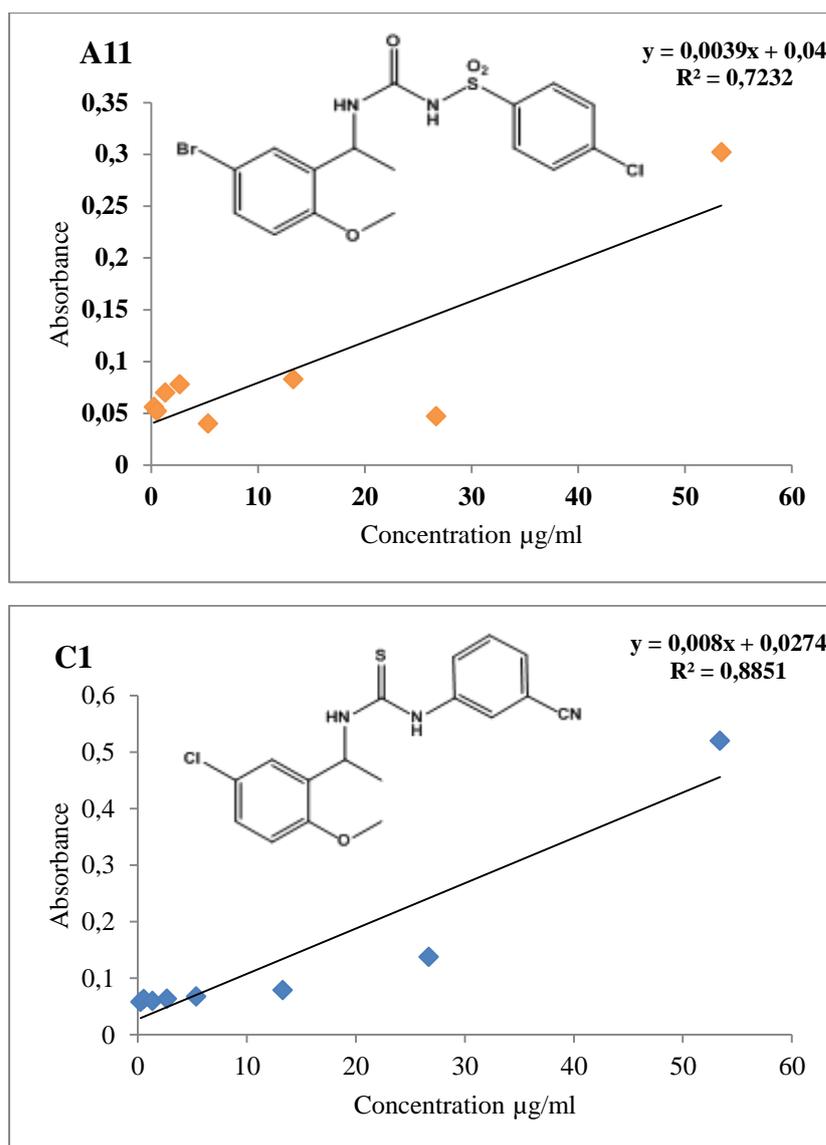
	Composé	$IC_{50} \pm s.e.m. (\mu g/ml)$	$IC_{50} \pm s.e.m. (mM)$
<b>A.A</b>		<b>7,42±0,37</b>	<b>0,042±0,0021</b>
<b>13a</b>		<b>0,86±0,1</b>	<b>0,0044±0,0005</b>
<b>C1</b>		<b>9,023±0.96</b>	<b>0,026±0,0027</b>
<b>C2</b>		<b>89,85±4,9</b>	<b>0,26±0,0142</b>

D'après le tableau 06 et la figure 32, les deux composés **C1** et **13a** présentent les meilleures activités en comparant avec les substances de référence, le plus actif entre eux est le composé **13a** qui montre avec le test ABTS une excellente capacité antioxydante (**0,0044±0,0005**), avec une activité mieux que l'acide ascorbique (**0,042±0,0021**). Le composé **C1** présente aussi une capacité importante (**0,026±0,0027**), environ deux fois plus actif que l'acide ascorbique. Le composé **C2** est très faible (**0,26±0,0142**), dû à l'annulation de l'effet mésomère attracteur d'électrons, qui à son tour le rend incapable à piéger le radical-cation  $ABTS^{\bullet+}$ .

Ces résultats montrent aussi que le composé thiourée *m*-CN substitué est plus actif que les thiourée *p*-CN substitué.



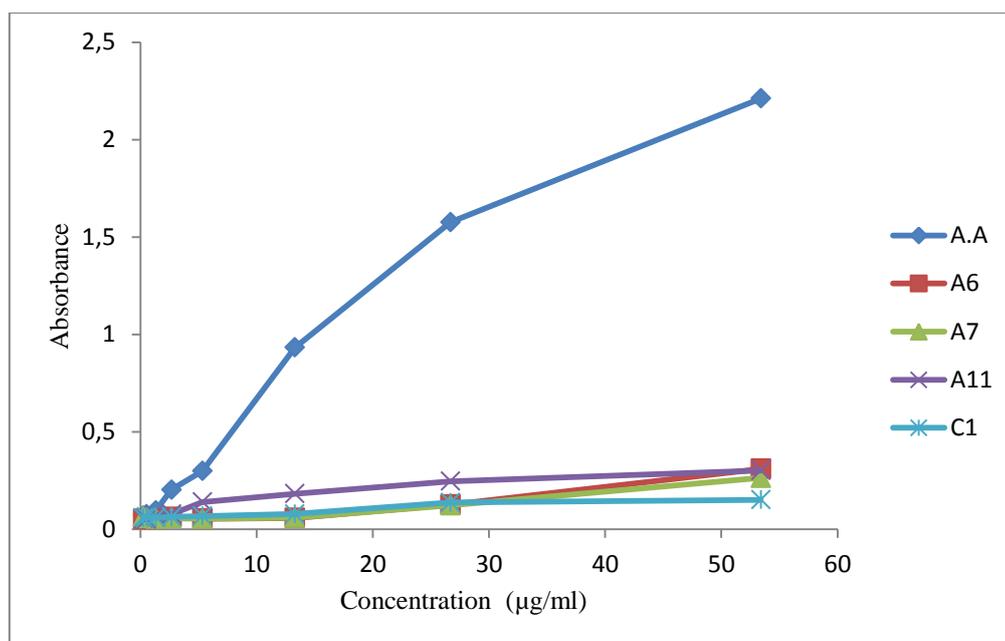




**Figure 34:** Variation de l'absorbance en fonction de la concentration des composés actifs (A6, A7, A11 et C1)

Cela confirme que l'activité antioxydante de tous les échantillons testés augmente proportionnellement avec la concentration. Pour mieux comparer l'activité des différents composés avec l'acide ascorbique.

Le graphe comparatif ci-dessous (Fig.35) regroupe l'évaluation de l'absorbance en fonction de la concentration pour les composés A6, A7, A11, C1 et A.A.



**Figure 35** : Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP pour les composés A6, A7, A11, C1 et A.A

La méthode de FRAP vient confirmer partiellement les premières tendances du test ABTS, puisque là encore, le composé C1 qui portant une fonction thiourée présente aussi un effet antioxydant. Ainsi que les composés (A6, A7 et A11) qui portant une fonction sulfonylurée montrent avec ce test une capacité réductrice plus importante à celui de thiourée, dont l'absorbance atteint 0.311 ce qui implique l'augmentation du pouvoir réducteur. Mais, selon la figure 35, cette capacité est largement inférieure à celle de l'acide ascorbique.

En générale, le potentiel réducteur d'un composé est dû à la présence de groupements capables de donner des électrons qui peuvent réagir avec les radicaux libres, et les convertir en produits stables, c'est ce qu'on appelle pouvoir réducteur. Dans le cas de nos composés nous remarquons que c'est le groupement sulfonylurée qui est responsable de cette activité.

✚ Les molécules testées étaient actives avec les tests ABTS et FRAP (de faiblement actives à très actives), toutes les molécules étaient inactives avec le test DPPH. cette différence de comportement est liée au mécanisme d'oxydo-réduction impliqué dans chaque système. Le DPPH et l'ABTS peuvent agir par les deux mécanismes possibles qui sont le transfert d'électron et le transfert de protons, alors que dans le cas du système FRAP il n'y a que le transfert d'électron.

## **IV. CONCLUSION**

## IV. Conclusion

Ce travail avait comme objet l'évaluation de l'activité antioxydante de quelques analogues ouverts de dihydrobenzopyrane portant différentes fonctions, cétone, alcool, amide, amine, oxime, carbamate, sulfonyle et thiourée. Il n'existe pas une seule méthode de référence, mais de nombreuses méthodes qu'il faut sélectionner et standardiser selon le problème posé. L'estimation simultanée du pouvoir anti-radicalaire  $IC_{50}$  permet d'évaluer d'une meilleure façon l'activité antioxydante par l'indice de l'efficacité anti-radicalaire. Les facteurs à considérer dans le choix des méthodes sont :

- Les mécanismes impliqués dans la réaction de la mesure de l'activité antioxydante, en relation avec ceux de l'activité antioxydante de l'échantillon lui-même.
- La solubilité des réactifs et des produits synthétisés dans le solvant d'analyse.
- L'existence de données consultables et suffisamment exhaustives, afin de vérifier les valeurs à celles décrites dans la littérature.

Le manuscrit a commencé par une introduction générale, puis s'en suivit des généralités sur la synthèse des molécules faisant l'objet de ce travail. Nous avons mis l'accent sur les propriétés pharmacologiques plutôt que les méthodes de synthèse. Nous avons ensuite présenté un bref aperçu sur les radicaux libres, le stress oxydatif et ses méfaits, et aussi les différents types d'antioxydants, naturels ou synthétiques.

Les travaux réalisés, comprenant trois tests différents (DPPH ABTS, FRAP) afin de localiser le produit qui présente l'activité la plus élevée.

Dans un premier temps, nous avons réalisé l'effet anti-radicalaire de nos produits avec le radical DPPH. Les résultats des pourcentages d'inhibition de radical libre DPPH ont montrés que les 30 produits qu'on a utilisés ont une capacité très faible par rapport à l'acide ascorbique, ce qui résulte que ces produits sont inactifs.

Ensuite nous avons effectué le test de piégeage du radical ABTS, ce dernier a montré que tous les produits étudiés portant une fonction thiourée (**C1** , **C2**) possèdent un effet antioxydant important et même meilleur que celui de l'acide ascorbique, en présentant une faible valeur d' $IC_{50}$ .

L'évaluation du pouvoir réducteur des produits par la méthode de réduction de fer (FRAP) a mis en évidence que les produits portant une fonction sulfonylurée ont une capacité à réduire le fer, plus fort que celles des thiourée, mais cette capacité reste inférieure à celui de l'acide ascorbique.

Les résultats ont montré aussi que le comportement de nos molécules n'était pas le même selon le test, mais en revanche, ont révélé un vraie potentiel antioxydant qui méritent d'être approfondis. En effet, les systèmes oxydants qu'ont affrontés nos molécules sont des systèmes chimiques et non biologiques. Il serait important et nécessaire de les tester sur des systèmes biologiques qui les rapprochent plus de la réalité de l'organisme, c'est-d-dire, les tester *in vivo*.

Notre étude reste toutefois incomplète, pour cela il serait intéressant de tester d'autres méthodes pour mieux évaluer l'activité antioxydante, citant à titre d'exemple: Test TRAP (Total Radical-trapping Antioxydant Parameter), ORAC (Oxygene Radical Absorbance Assay), et Piégeage du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Scavenging activity).

# **R**ÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Meziti, A., Kormas, K. A., Pancucci-Papadopoulou, M. A., Thessalou-Legaki, M.** Bacterial phylotypes associated with the digestive tract of the sea urchin *Paracentrotus lividus* and the ascidian *Microcosmus* sp. *Russian Journal of Marine Biology*, 2007, 33(2), 84-91.
- [2]. **Favier, A.** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm. Fr*, 2006, 64,390-396.
- [3]. **Prasad, N. R., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., & Reddy, B. V.** Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and cellular biochemistry*, 2011, 349(1), 11-19.
- [4]. **Bouguerne, B.** Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et études de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2012.
- [5]. **Harrouche, K., Lahouel, A., Belghobsi, M., Pirotte, B., & Khelili, S.** Synthesis, characterization, and investigation of the antioxidant activity of some 1, 2, 4-benzothiadiazine-1, 1-dioxides bearing sulfonylthioureas moieties. *Canadian Journal of Chemistry*, (2019), 97(12), 824-832.
- [6]. **BOUTADJINE, N., ROUANA, S.** Evaluation de l'activité antioxydante de quelques composés organiques de synthèse portant des fonctions sulfony (thio) urée. Mémoire de Master, University of Jijel, 2019.
- [7]. **Khalifeh, P., Fenninger, L., Thibaut, A., Kindo, M., Schaeffer, M., Collange, O. & Pottecher, J.** Association entre gradients transpulmonaires de radicaux libres de l'oxygène, résistances vasculaires pulmonaires et oxygénation artérielle après chirurgie cardiaque sous circulation extracorporelle. *Anesthésie & Réanimation*, 2015, 1, A31.
- [8]. **Merikhi, M., Amoura, I., & Abbes, A. E.** Evaluation de l'état du stress oxydatif et des altérations histopathologiques et biologiques au cours de cancérogénèse colorectale. Mémoire de master. Université de Jijel, 2018.

- [9]. **Labioud, R.** Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta*: activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse de doctorat, Université BADJI Mokhtar Annaba, 2016.
- [10]. **Bouhadjra, K.** Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. Thèse de doctorat, (2011).
- [11]. **Kehrer, J. P.** Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in toxicology*, 1993, 23(1), 21-48.
- [12]. **Yu, B. P.** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 1994, 74(1), 139-162.
- [13]. **Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A.** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 2007, 74(7), 636-643.
- [14]. **Jaeschke, H.** Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chemico-biological interactions*, 1991, 79(2), 115-136.
- [15]. **Rabl, H., Khoschorur, G., Colombo, T., Petritsch, P., Rauchenwald, M., Költringer, P. & Esterbauer, H.** A multivitamin infusion prevents lipid peroxidation and improves transplantation performance. *Kidney international*, 1993, 43(4), 912-917.
- [16]. **Veena, C. K., Josephine, A., Preetha, S. P., Varalakshmi, P., & Sundarapandiyam, R.** Renal peroxidative changes mediated by oxalate: the protective role of fucoidan. *Life sciences*, 2006, 79(19), 1789-1795.
- [17]. **Carson, C. F., & Riley, T. V.** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of applied bacteriology*, 1995, 78(3), 264-269.
- [18]. **Carange, J.** Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection. Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières, 2010.
- [19]. **Cillard, J., & Cillard, P.** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 2006, 13(1), 24-29.

- [20]. **Gutteridge, J. M., & Halliwell, B.** Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free radical research communications*, 1993, 19(3), 141-158.
- [21]. **Sarma, A. D., Mallick, A. R., & Ghosh, A. K.** Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 2010, 1(3), 185-192.
- [22]. **Migdal, C., Serres, M.** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant médecine /sciences, 2011, 27(4), 405-412.
- [23]. **Carrière, A., Galinier, A., Fernandez, Y., Carmona, M. C., Pénicaud, L., & Casteilla, L.** Les espèces actives de l'oxygène: le yin et le yang de la mitochondrie. *médecine/sciences*, 2006, 22(1), 47-53.
- [24]. **Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., ... & Abdelly, C.** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical toxicology*, 2009, 47(8), 2083-2091.
- [25]. **Dangles, O.** Le potentiel antioxydant des aliments: mythes et réalités. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 2020, 55(4), 176-183.
- [26]. **Rezaire, A.** Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de doctorat, Antilles-Guyane, (2012).
- [27]. **Halliwell, B.** Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *The lancet*, 1994, 344(8924), 721-724.
- [28]. **Boubekri, C.** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat, Université Mohamed Khider Biskra, 2014.
- [29]. **Shoji, H., Shimizu, T., Shinohara, K., Oguchi, S., Shiga, S., & Yamashiro, Y.** Suppressive effects of breast milk on oxidative DNA damage in very low birthweight infants. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 2004, 89(2), F136-F138.

- [30]. **Kim, N. S., & Lee, D. S.** Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography a*, 2002, 982(1), 31-47.
- [31]. **Merckx, J., Ferroni, A., Guiffant, G., Gaudin, F., Durussel, J. J., & Flaud, P.** P239: Rinçage pulsé: prévention de la colonisation des artères vasculaires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 2014, 28, S194.
- [32]. **Yu, R., Mandlekar, S., & Kong, A. N. T.** Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole-induced toxicity: Induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. *Molecular pharmacology*, 2000, 58(2), 431-437.
- [33]. **Koehler-Ramonatxo, C.** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2006, 20(4), 165-177.
- [34]. **Maurent, K.** Synthèse de composés phénoliques de type diarylheptanoïde. Evaluation de leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2017.
- [35]. **Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch, P.** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences*, 2004, 20(4), 458-463.
- [36]. **Chung, J. E., Kurisawa, M., Tachibana, Y., Uyama, H., & Kobayashi, S.** Enzymatic synthesis and antioxidant property of poly (allylamine)–catechin conjugate. *Chemistry letters*, 2003, 32(7), 620-621.
- [37]. **DADDOUH, F.** L'effet combiné de la vitamine C (acide ascorbique) et de la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) contre la toxicité du nickel chez les souris (*Mus musculus*). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, (2016).
- [38]. **MANALLAH, A.** Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive. Thèse de doctorat, Université de Sétif 1-Ferhat Abbas, 2012.
- [39]. **Raizman, J. E., Cohen, A. H., Teodoro-Morrison, T., Wan, B., Khun-Chen, M., Wilkenson, C., ... & Adeli, K.** Pediatric reference value distributions for vitamins A and E in

the CALIPER cohort and establishment of age-stratified reference intervals. *Clinical biochemistry*, 2014, 47(9), 812-815.

[40]. **Hellal, Z.** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Thèse de doctorat, Université Mouloud Mammeri, 2011.

[41]. **Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R.** Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research*, 2002, 36(2), 177-187.

[42]. **Wechsler, J., Belaiche, J., Vesin, P., Cattan, D., & Pinaudeau, Y.** Anatomico-clinical study of a case of regenerative nodular hyperplasia of the liver with Felty's syndrome and portal hypertension. In *Annales d'anatomie pathologique*, January, 1979, 24, No. 4-5, pp. 325-336.

[43]. **Sebti, F.** Synthèse caractérisation et activités biologiques d'un ligand chélateur des ions métalliques. Thèse de doctorat, 2018.

[44]. **Lagunez Rivera, L.** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat, 2006.

[45]. **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P.** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 2007, 62(10), 628-38.

[46]. **Greenlee, H., Gammon, M. D., Abrahamson, P. E., Gaudet, M. M., Terry, M. B., Hershman, D. L., ... & Jacobson, J. S.** Prevalence and predictors of antioxidant supplement use during breast cancer treatment. *Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 2009, 115(14), 3271-3282.

[47]. **Boubekri, C.** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat, Université Mohamed Khider Biskra, 2014.

[48]. **Desmier, T.** Les Antioxydants de nos jours: Définition et applications. Thèse de doctorat 2016.

[49]. **Blois, M. S.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958, 181(4617), 1199-1200.

- [50]. **Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A.** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science*, 1993, 84(4), 407-412.
- [51]. **Garcia, E. J., Oldoni, T. L. C., Alencar, S. M. D., Reis, A., Loguercio, A. D., & Grande, R. H. M.** Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *Brazilian dental journal*, 2012, 23, 22-27.
- [52]. **Milardović, S., Iveković, D., & Grabarić, B. S.** A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 2006, 68(2), 175-180.
- [53]. **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 1999, 26(9-10), 1231-1237.
- [54]. **Benzie, I. F., & Strain, J. J.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 1996, 239(1), 70-76.
- [55]. **Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K.** Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 2002, 127(1), 183-198.
- [56]. **Bouhedja, M., Peres, B., Fhayli, W., Ghandour, Z., Boumendjel, A., Faury, G., & Khelili, S.** Design, synthesis and biological evaluation of novel ring-opened cromakalim analogues with relaxant effects on vascular and respiratory smooth muscles and as stimulators of elastin synthesis. *European journal of medicinal chemistry*, 2018, 144, 774-796.
- [57]. **Molyneux, P.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. sci. Technol*, 2004, 26(2), 211-219.
- [58]. **Sarr, S. O., Fall, A. D., Gueye, R., Diop, A., Diatta, K., Diop, N., ... & Diop, Y. M.** Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2015, 9(3), 1263-1269.
- [59]. **Bougandoura, N., Bendimerad, N.** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*, 2013, (9), 14.

## RÉSUMÉ

Ce travail a pour but d'évaluer l'effet antioxydant de quelques analogues ouverts de dihydrobenzopyrane de synthèse portant des fragments cétone, alcool, amide, amine, oxime, carbamate, sulfonurée et thiourée. Le choix de ces molécules a été guidé par le fait que la fonction thiourée possède des propriétés antioxydantes. Les travaux réalisés, comprenant trois tests différents (DPPH, ABTS, FRAP), ont montré que globalement, les molécules testées présentent un réel pouvoir antioxydant et même meilleur que celui de l'antioxydant de référence (A.A). Ainsi pour le composé C1 qui montre un pouvoir très important. Il serait nécessaire de tester, *in vivo*, ces produits sur des systèmes biologiques qui les rapprochent plus de la réalité de l'organisme.

**Mots-clés** : Dihydrobenzopyrane, thiourée, activité antioxydante, ABTS, DPPH, FRAP

## ABSTRACT

The aim of this work is to evaluate the antioxidant effect of some open analogues of synthetic dihydrobenzopyran bearing ketone, alcohol, amide, amine, oxime, carbamate, sulfonurea and thiourea moieties. The choice of these molecules was guided by the fact that the thiourea function has antioxidant properties. The work carried out, including three different tests (DPPH, ABTS, FRAP), showed that globally, the tested molecules present a real antioxidant power and even better than that of the reference antioxidant (A.A). Also for the product C1 which shows a very important power. It would be necessary to test, *in vivo*, these products on biological systems which bring them closer to the reality of the body.

**Keywords**: Dihydrobenzopyran, thiourea, antioxidant activity, ABTS, DPPH, FRAP

## المخلص

يهدف هذا العمل الى تقييم النشاط المضاد للأكسدة لبعض النظائر الجذرية لـ ديهيدروبنزوبيران المفتوحة ، الحاملة لوظائف الكيتون ، الكحول ، الأמיד ، الأمين ، الأكسيم ، الكاربامات ، السوفونيل يوريا ، والثيوريا، و التي تم اثبات بعض خصائصها المضادة للأكسدة. العمل المنجز، الذي يشمل بشكل عام على ثلاثة اختبارات مختلفة: اختبار ارجاع الحديد FRAP واختبار محاصرة الجذور الحرة DPPH , ABTS.

أظهرت مشتقات الثيوريا نشاط مضاد للأكسدة كبير، كما سجل المركب C1 مع الجذر ABTS نشاط أقوى من تأثير حمض الأسكوربيك المرجعي ، كما أظهرت المركبات الحاملة لوظائف الثيوريا والسلفونيل يوريا نشاط معتبر مع اختبار ارجاع الحديد و لكن بنسبة ضعيفة مقارنة مع حمض الاسكوربيك (A.A). و لتحديد التأثير الحقيقي لهذه المركبات، سيكون من الضروري القيام باختبارها على الأنظمة البيولوجية (*test in vivo*) كونها أقرب الى تركيب الجسم.

**الكلمات المفتاحية** : ديهيدروبنزوبيران، نشاط مضاد للأكسدة، ABTS , DPPH , FRAP