

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Mohamed Seddik Benyahia - Jijel
Faculté des Sciences Exactes et Informatique
Département de chimie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Chimie

Option : Chimie Pharmaceutique

Evaluation de l'activité antioxydante de 1,4-dihidropyridines portant une fonction amide

Intitulé

Réalisé et soutenu par

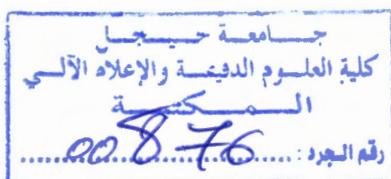
BOUKHALLOUT FATH EDDINE & BOUGUERNE BOUCHRA

Membres de jury

M. K. Harrouche	MCA	Président	U. M. Seddik Benyahia - Jijel
M. S. Khelili	Pr	Encadreur	U. M. Seddik Benyahia - Jijel
M ^{me} N. Mechouche	MAA	Examinatrice	U. M. Seddik Benyahia - Jijel

Année Universitaire 2018/2019

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



chi.PHAR01-19

Université Mohamed Seddik Benyahia - Jijel
Faculté des Sciences Exactes et Informatique
Département de chimie
Mémoire

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

**Evaluation de l'activité antioxydante
de 1,4-dihidropyridines portant une
fonction amide**

Intitulé

Réalisé et soutenu par

BOUKHALLOUT FATH EDDINE & BOUGUERNE BOUCHRA

Membres de jury

M. K. Harrouche	MCA	Président	U. M. Seddik Benyahia - Jijel
M. S. Khelili	Pr	Encadreur	U. M. Seddik Benyahia - Jijel
M ^{me} N. Mechouche	MAA	Examinatrice	U. M. Seddik Benyahia - Jijel

Année Universitaire 2018/2019



Remerciements

Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la pugnacité à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci Allah de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nos vifs remerciements vont à Monsieur **Smail Khelili**, Professeur au département de chimie (l'université Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel), qui a dirigé notre travail, pour sa disponibilité, ses conseils judicieux et sa chaleur humaine.

Nous remercions également Melle **Safia Habila**, Maître de conférence au département d'écologie (l'université Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel), pour ses conseils et ses encouragements.

Nos remerciements s'adressent aussi à Monsieur **Kamal Harouche**, Maître de conférences au département de chimie (l'université Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel), pour avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions aussi Mme Nadia MECHOUCHE, Maître assistant au département de chimie (l'université Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel), pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions chaleureusement tous les enseignants du Département de la chimie qui ont veillé sur notre formation.

Nous remercions le directeur du laboratoire de pharmacologie et de photochimie, Monsieur Belghobsi Mebrouk, Maître de conférences au département de chimie (l'université Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel), qui nous a permis de réaliser entièrement notre travail au sein de son laboratoire, ainsi que Monsieur Riad Aibech, ingénieur de laboratoire, pour son aide logistique et sa disponibilité.

Enfin, nous remercions toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de notre modeste travail.

Dédicaces

C'est avec l'aide d'Allah le tout puissant, qui a tracé le chemin de ma vie, que j'ai pu réaliser ce travail, que je dédie :

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie, ma Mère **FATIMA** qui m'a apportée son appui durant toutes mes années d'étude, pour ses sacrifices et son soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

*Mon cher père **MOULOUD** qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour ses sacrifices, ses conseils et ses encouragements.*

*A ma grand-mère **Aicha***

*A ma grand-père **AMAR***

*A mes très chères sœurs, **DOUNIA, NOURHEN, HADJER, LOULOU***

*A mes très chers frères, **AYOUB, MOUAD, HAROUN** pour leur soutien moral et leurs aides, merci d'être là pour moi*

*A mes tantes **HASSINA et FATIHA***

*A mes oncles **HAMZA, BOUTIBA BECHAR***

*A toute ma famille **BOUGUERNE et BOUYAHIA***

*A mon Binôme **FATH EDDINE** qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et sa famille*

*A mon adorable ami **JAJOU** qui a toujours été à mes côtés*

*A mes Amis **MADJDA, SARA, RADIA, ROUMEYSSA***

*A mes collègues de promotion de Master **CHIMIE PAHRAMCEUTIQUE***

IMEN, ROUFIADA, NESRINE

BOUCHRA

Dédicaces

Du fond du cœur, je dédie ce modeste travail :

A mes deux bijoux de ma vie ;

*Ma très chère mère **DJEMAA**, tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Et Puisse Allah, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A mon cher père **MOSBAH**, rien au monde ne vaut les efforts que tu as fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

*A mes grand-mères **FATIMA ; HADA***

*A mon grand-père **LEKHEL***

*A mes adorables frères **ZAKARIA, MOHAMED LAMINE** pour leurs soutien moral et leurs aides. Merci d'être là pour moi.*

*A mon Binôme **BOUCHRA** qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail et sa famille.*

*A mes chers amis **FAYCEL, YAHYA, LOTFI, AYOUB, IMADE, HUGO***

Sans oublier mes braves Amis de la promotion Master chimie pharmaceutique.

FATHI

Liste des figures

Figure In1. Structure générale des composé à tester.....	1
Figure I.1. Structure chimique de la pyridine.....	4
Figure I.2. Structure générale des 1,4-dihydropyridines.....	4
Figure I.3. Structures chimiques de quelques dihydropyridines importantes, l'amlodipine, le felodipine et l'isradipine.....	5
Figure I.4. Structures chimiques de la nifédipine et de quelques dérivés portant le noyau imidazole en position 4, à la place du 2-nitrophényle.....	5
Figure I.5. Structures de deux dihydropyridines ayant une activité antituberculeuse.....	6
Figure I.6. Structures de quelques DHPs dotées de propriétés inhibitrices puissantes vis-à-vis de HBV.....	6
Figure I.7. Structures de quelques DHPs dotées de propriétés analgésiques et anti-nflammatoire.....	7
Figure II.1. Sites de production intracellulaire des EROs.....	12
Figure II.2. Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.....	13
Figure II.3. Structure chimique de glutathion.....	17
Figure II.4. Structure chimique de l'acide ascorbique (vitamine C).....	17
Figure II.5. Structures chimiques des tocophérols.....	18
Figure II.6. Exemples de carotènes et de xanthophylles.....	18
Figure II.7. Cycle de base des composés phénolique, dont les flavonoïdes.....	19
Figure III.1. Structure générale des composés à tester.....	22
Figure IV.1. Structures des composés testés (3a-h).....	27
Figure IV.2. Modification du DPPH• par transfert d'électron.....	28

Figure IV.3. Modification du DPPH• par transfert d'hydrogène.....	29
Figure IV.4. Formation du cation radical ABTS ^{•+}	29

Liste des schémas

Schéma I.1. Schéma de synthèse des molécules à tester.....	7
--	---

Lite des tableaux

Tableau II.1. Les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERA).	11
Tableau III.1. Activité anti-oxydante des composés 3a-h lors du test ABTS, formulé en tant que EC ₅₀ .	24
Tableau III.2. Activité anti-oxydante des composés 3a-h lors du test FRAP, formulé en tant que EC ₅₀ .	25

Liste des abréviations

ABTS	L'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6 sulfonique)
AAR	Activité anti-radicalaire
DHP	Dihydropyridine
DMSO	Diméthylesulfoxyde
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EROs	Site de production des espèces réactives de l'oxygène
ERA	Espèces réactives de l'azote
EC₅₀	Efficent concentration de 50%
Fe³⁺	Fer ferrique
Fe²⁺	Fer ferreux
FRAP	Pouvoir réducteur du fer (Ferric Reducing-Antioxidant Power)
IC₅₀	Concentration inhibitrice 50 %.
GSP	Glutathion
GPX	Catalase et la glutathion peroxydase
HBV	Virus causant l'hépatite B
ml	Millilitre
Mg	Milligramme
mM	Mili mol
NAD(P)H	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
nm	Nano mètre
Pi %	Le pourcentage de d'inhibition
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxyde dismutase
THF	Tétrahydrofurane
UV	Ultra -violet
μl	Microlitre
μM	Micromolaire
μg	Microgramme
0 C°	Température en Degré Celsius

Table des matières

Introduction générale.....	1
Références	3
Chapitre 1 : Généralités sur les 1,4-dihydropyridines	
I.1. Introduction.....	4
I.2. Intérêt biologique.....	4
I.2.1 Les 1,4-dihydropyridines comme inhibiteurs de canaux calciques.....	4
I.2.2. Les 1,4-dihydropyridines comme antituberculeux et antibactériens.....	5
I.2.3. Les 1,4-dihydropyridines	6
I.2.4. Activités analgésique et anti-inflammatoire.....	7
I.3. Méthode de synthèse des molécules à tester	7
Références	9
Chapitre 2 : Généralités sur le stress oxydatif et les antioxydants	
II.1. Introduction.....	10
II.2. Historique.....	10
II.3. Les radicaux libres	10
II.3.1 Définition.....	10
II.3.2. La production de radicaux libres	12
II.3.2.1. La production intracellulaire.....	12
II.3.2.2. La production extracellulaire.....	13
II.4. Le stress oxydatif	13
II.4.1. Définition.....	13
II.4.2. Les conséquences du stress oxydatif.....	14
II.4.2.1. L'oxydation de l'ADN.....	14
II.4.2.2. L'oxydation des protéines.....	14
II.4.2.3. L'oxydation des lipides.....	14
II.5. Les antioxydants	15
II.5.1. Définition.....	15

II.5.2. Classification et mécanismes d'action des antioxydants.....	15
II.5.2.1. Les antioxydants enzymatiques.....	16
II.5.2.2. les antioxydants non-enzymatiques.....	16
Références	20

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Objectif du travail.....	22
III.2. Résultat du test au DPPH	22
III.2.1. Principe du test.....	22
III.2.2. Résultats et discussion.....	23
III.3. Résultat du test à l'ABTS	23
III.3.1. Principe du test.....	23
III.3.2. Résultats et discussion.....	23
III.4. Test du pouvoir réducteur du fer (FRAP)	24
III.4.1. Principe du test.....	24
III.4.2. Résultats et discussion.....	25
Références.....	26

Chapitre IV : Partie expérimentale

IV.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante.....	27
IV.1.1. Introduction.....	27
IV.1.2. Présentation des produits testés.....	27
IV.1.3. Méthodes utilisées pour évaluer l'activité anti-oxydante.....	28
IV.1.3.1. Test de DPPH	28
IV.1.3.2.1. Introduction.....	28
IV.1.3.2.2. Mode opératoire.....	29
IV.1.3.2. Test à l'ABTS	29
IV.1.3.2.1. Introduction.....	29
IV.1.3.2.2. Mode opératoire.....	30
IV.1.3.3. Test de réduction du fer ou Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).....	31
IV.1.3.3.1. Introduction.....	31

31	IV.1.3.3.2. Mode opérateur.....
32	Références
33	Conclusion générale.....

Introduction générale

Introduction générale

Les avancées de la médecine ont permis de mieux comprendre la physiologie du corps humain et les réactions chimiques assurant son bon fonctionnement. Ainsi, ces avancées ont permis d'identifier les mécanismes de survenue de nombreuses pathologies. L'oxydation, un phénomène nécessaire à la vie, peut aussi avoir un effet délétère. En effet, le stress oxydatif peut causer de sévères dommages cellulaires et, pour s'en protéger, notre organisme produit ou fait appel à une source exogène d'antioxydants.^[1]

L'équilibre entre pro-oxydants et antioxydants est précaire et pour le maintenir, une alimentation variée est nécessaire. On trouve de nombreux antioxydants dans l'alimentation, que ce soit dans les fruits, les légumes ou les boissons. Une modification des habitudes alimentaires a été observée ces dernières décennies avec notamment le développement des 'fast-food' et la consommation de produits surgelés qui perdent une partie de leurs vitamines. Ainsi l'apport exogène en antioxydants diminue et peut favoriser l'apparition de certaines pathologies induites par ces carences.^[2]

Les antioxydants synthétiques sont très utilisés dans des domaines agro-alimentaires et cosmétiques pour prévenir contre l'oxydation de l'oxygène de l'air, et la recherche en ce domaine est un enjeu particulièrement important.

Ainsi, le but de ce mémoire est l'évaluation de l'activité anti-oxydante de quelques dihydropyridines portant un reste amide sur le groupe phényle en position 4 de l'hétérocycle, en positions méta et para (Figure In1).



Figure In1. Structure générale des composés à cibler.

Ainsi, ce mémoire sera organisé en quatre chapitres, précédés par une introduction générale et finissant par des résumés en arabe, français et anglais. Le premier chapitre comporte une synthèse bibliographique sur le stress oxydatif, les anti-oxydants et les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le second chapitre comporte des généralités sur les dihydropyridines, leurs

propriétés biologiques et la méthode de synthèse des molécules à tester. Le troisième chapitre comporte les résultats obtenus lors de travail et leur discussion. Le dernier chapitre comporte la partie expérimentale incluant les protocoles expérimentaux utilisés pour réaliser ce travail. Soulignons que chaque chapitre finit par une liste de références bibliographiques.



Références

- [1] Hybertson, Brooks M., et al. "Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation." *Molecular aspects of medicine* 32.4-6 (2011).
- [2] Kehrer, James P. "Free radicals as mediators of tissue injury and disease." *Critical reviews in toxicology* 23.1 (1993).

Chapitre 1 : Généralités sur les 1,4-dihydropyridines

I.1. Introduction

Le noyau pyridine est le constituant clé présent dans une gamme de composés bioactifs, naturels ou synthétiques (Figure I.1).^[1]

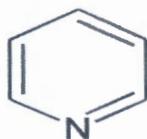


Figure I.1. Structure chimique de la pyridine.

La dihydropyridine (DHP) présente une unité structurale appartenant à la famille des hétérocycles à six chaînons, avec un atome d'azote comme hétéroatome. (Figure I.2). C'est une substance synthétique qui a trouvé des applications dans divers domaines notamment en biologie et en médecine.^[1,2]

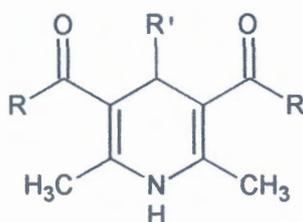


Figure I.2. Structure générale des 1,4-dihydropyridines.

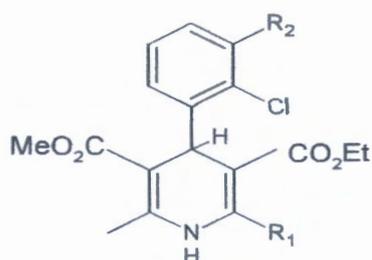
En dehors de l'intérêt biologique et pharmacologique, les 1,4-dihydropyridines se sont également avérées être des intermédiaires synthétiques important : les DHPs ont trouvé de larges application dans la préparation d'un grand nombre d'alcaloïdes azotée.^[3]

I.2. Intérêt biologique

La chimie des dihydropyridines est un domaine très intéressant, non seulement de point de vue de la recherche fondamentale des composés hétérocycliques, mais particulièrement en raison de l'élargissement des applications pratiques des dérivés de la 1,4- dihydropyridine, qui sont les plus intéressants parmi les différents isomères de la dihydropyridine, utilisés comme des agents pharmaceutiques vue leurs divers activités biologiques et pharmacologiques puissantes.^[1]

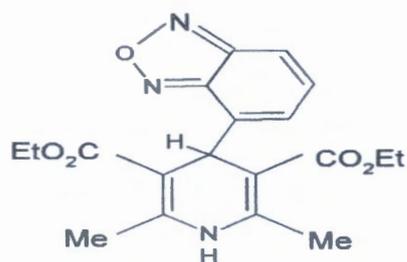
I.2.1 Les 1,4-dihydropyridines comme inhibiteurs de canaux calciques

Certaines dihydropyridines sont devenues une clé principale dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Figure 3). Ceci est dû à leur habilité d'inhiber l'entrée des ions calcium (Ca^{2+}) dans les cellules cardiaques et les muscles vasculaires. Comme exemple, on cite l'amlodipine, la félodipine, l'isradipine. (Figure I.3).^[4]



Amlodipine $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$

Felodipine $\text{R}_1 = \text{Me}$, $\text{R}_2 = \text{Cl}$

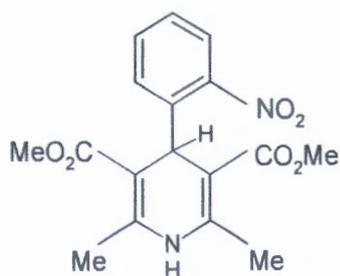


Isradipine

Figure I.3. Structures chimiques de quelques dihydropyridines importantes, l'amlodipine, la félodipine et l'isradipine.

Le succès thérapeutique de ces différentes molécules est lié à leur capacité à diminuer le passage transmembranaire du calcium aux fibres lisses vasculaires avec une longue période de relaxation, et aussi au muscle cardiaque avec réduction de contraction cardiaque.^[5]

En effet, quelques analogues de la nifédipine dans lesquels le groupe *o*-nitrophényle en position 4 est remplacé par un substituant 2-alkylthio-1-benzyl-5-imidazolyle, ont été synthétisés et évalués comme des antagonistes de canaux de calcium sur les muscles lisses (Figure I.4).^[1]



Nifédipine

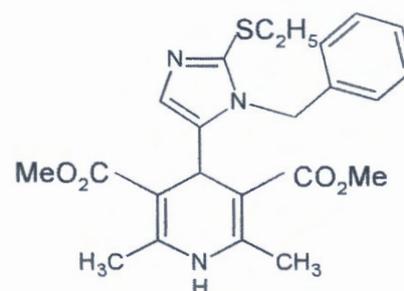
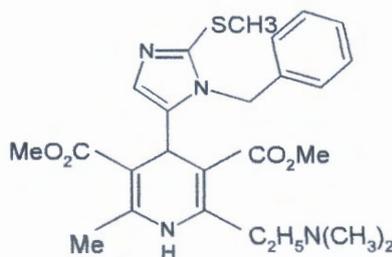


Figure I.4. Structures chimiques de la nifédipine et de quelques dérivés portant le noyau imidazole en position 4, à la place du 2-nitrophényle.

I.2.2. Les 1,4-dihydropyridines comme antituberculeux et antibactériens

La tuberculose est une maladie causée par *mycobacterium tuberculosis* et considérée comme étant l'une des causes principales de la mort d'origine infectieuse.^[6]

Récemment, la synthèse de dihydropyridine DHP à l'égard de la résistance multi-médicamenteuse de renversement dans les cellules tumorales a donné une nouvelle dimension à leurs applications. En outre, les 1,4-dihydropyridines comme classe de composés, présentent des excellents synthons de départ pour le développement des agents antituberculeux.^[4]

A. Fassihi et coll ont préparé de nouveaux dérivés de 1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxamide. L'étude de leurs activités contre *M. tuberculosis H37Rv* montre une puissante activité antituberculeuse (Figure I.5).^[5]

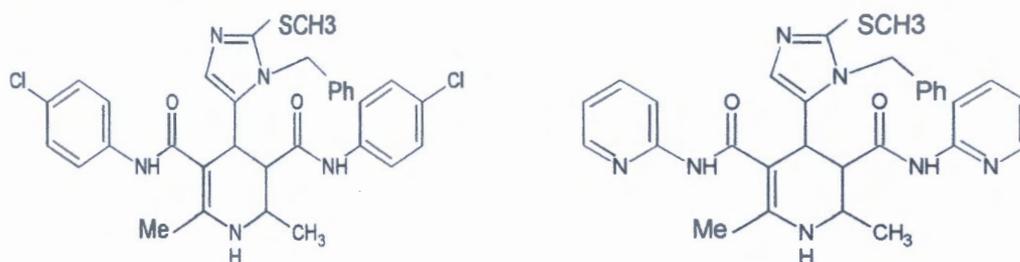


Figure I.5. Structures de deux dihydropyridines ayant une activité antituberculeuse.

Récemment, K. Sirisha et al. ont préparé une nouvelle série de 1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxamide. Ces nouveaux DHPs, ont été évalués pour leurs activités antibactérienne et antituberculeuse. L'étude qui a indiqué que le remplacement du groupement ester en position 3 et 5 avec le groupement N-arylcaboxamide a conduit à une augmentation significative de leur activité antibactérienne.^[4]

I.2.3. Les 1,4-DHPs antiviraux

Deres et Coll. ont rapporté une série de DHPs inhibiteurs non-nucléotidiques du virus causant l'hépatite B (HBV) (Figure I.6). L'infection chronique est une cause majeure de la maladie du foie, et jusqu'à ce jour, l'interféron α et les inhibiteurs nucléotidiques de la polymérase virale ont prouvé leur efficacité. Le composé chef de file, le Bay 41-4109 **1.64** a un mécanisme spécifique d'action en inhibant la maturation des capsides et peut être très utile dans d'autres combinaisons thérapeutiques. En plus de l'efficacité contre la HBV, ce composé possède une toxicité et des profils pharmacocinétiques satisfaisants.^[6]

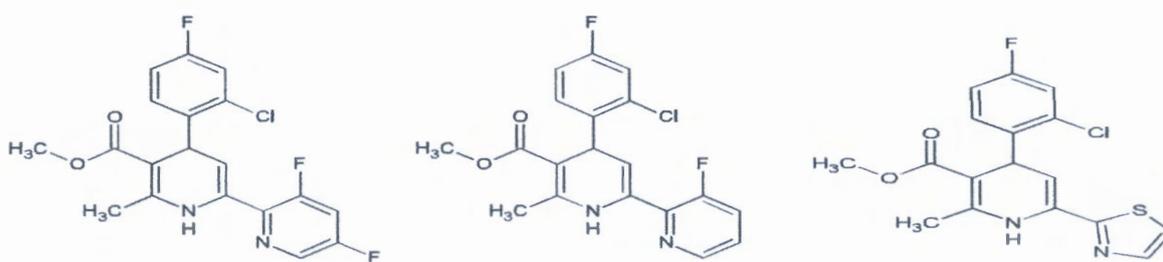


Figure I.6. Structures de quelques DHPs dotées de propriétés inhibitrices puissantes vis-à-vis de HBV.

I.2.4. Activités analgésique et anti-inflammatoire

Certaines 1,4-dihydropyridines ont été étudiées pour leurs activités analgésique et anti-inflammatoire. En effet, certains composés ont montré une activité équipotente en comparaison à celle du piroxicam à une dose de 70 mg/Kg (Figure I.7).^[4]

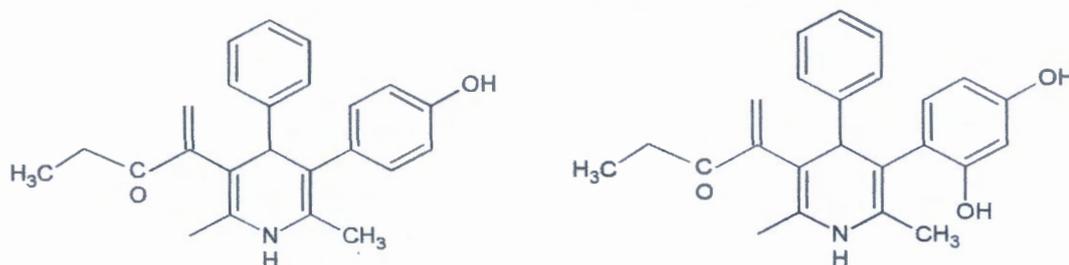


Figure I.7. Structures de quelques DHPs dotées de propriétés analgésique et anti-inflammatoire.

I.3. Méthode de synthèse des molécules à tester

Les molécules faisant l'objet du présent travail ont été fournies par M. Stiti Mohamed Zakaria, un doctorant au laboratoire de pharmacologie et de phytochimie (Université de Jijel), dont le directeur de thèse est le professeur Smail Khelili. Elles font partie du travail de thèse de M. Stiti (Thèse non encore soutenue et article soumis au journal 'chemical papers' pour expertise). La voie de synthèse de ces molécules est présentée dans le schéma I.1 ci-dessous.

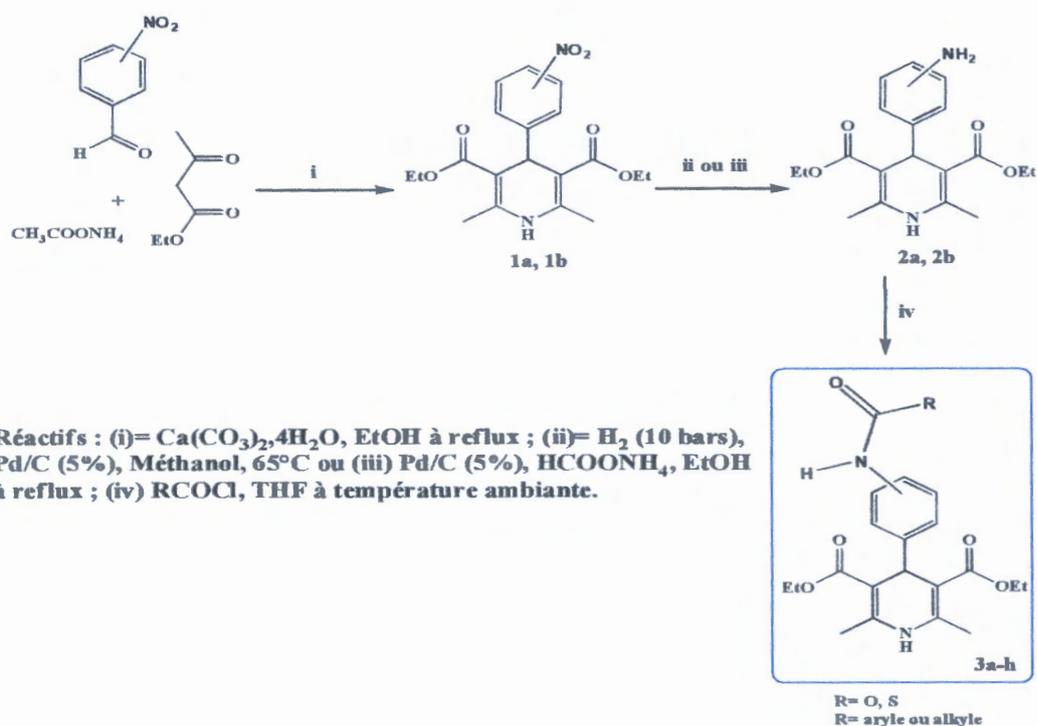


Schéma I.1. Schéma de synthèse des molécules a ciblé .

La première étape représente la réaction de Hantzsch impliquant l'acéto-acétate d'éthyle, le 4-nitrobenzaldéhyde, l'acétate d'ammonium comme source d'ammoniac, l'éthanol comme solvant, le tout chauffé à reflux en présence de nitrate de calcium, ce qui fournit les composés nitrés **1a** et **1b**.^[7]

La deuxième étape est une réduction du groupe nitro en groupe amine, utilisant l'hydrogénation catalytique sous pression d'hydrogène (10 bars), en présence de palladium sur charbon (5%), dans le méthanol, ou le formiate d'ammonium (comme d'hydrogène) à reflux de l'éthanol, en présence de palladium sur charbon (5%) comme catalyseur, ce qui fournit les amines **2a** et **2b**.^[7]

Dans la dernière étape, les amines **2a** et **2b** réagissent avec des chlorures d'acyles aromatique et aliphatiques, dans le THF à reflux, pour donner les composés finaux **3a-h**.

Références

- 1) Chouguiat Louisa, Développement de nouvelles méthodes pour les réactions multicomposants de Hantzsch et de Biginelli: Préparation des 3,4-dihydropyrimidinones et 1,4-dihydropyridines. Mémoire de Magistère, Université Mentouri de Constantine, 2010.
- 2) Tafer, Radia. "Synthèse d'hétérocycles à intérêt biologique: Préparation des 3, 4-dihydropyrimidinones quinoléiques et 4-aryl-1, 4-dihydropyridines.
- 3) Khadidja Dechira, Fonctionnalisation de composés cyclopentaniques par la méthodologie des réactions multicomposants. Mémoire de Magistère, Ecole Doctorale : S.P.R.S.M (Structure, Propriété et Réactivité des Systèmes Moléculaires), Université d'Oran, 2011.
- 4) Louisa Chouguiat, Nouvelles voies de Synthèse des 1,4-dihydropyridines, polyhydroquinoléines et 1,4-benzoxazines. Thèse Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat ès-Sciences. Université Frères Mentouri Constantine, 2015.
- 5) Wassima Ghalem, Synthèse de molécules d'intérêt biologique : Préparation des dérivés de la 3,4-dihydropyrimidinone et de la 1,4-dihydropyridine par des réactions à composants multiples. Thèse, Université Mentouri de Constantine.
- 6) Raouf Boulcina, Développement de nouveaux catalyseurs pour les réactions de Hantzsch et de Biginelli et préparation des époxyesters et époxycétones quinoléiques. Thèse, Université Mentouri-Constantine, 2009.
- 7) T. Habila, M. Belghobsi, M-Z. Stiti, E. Goffin, P.de Tullio, G. Faury, B. Pirotte et S.Khelili ; *Can. J. Chem.* 105.110.235.29, 2018,1-9.

Chapitre 2 : Généralités sur le stress oxydatif et les antioxydants

II.1. Introduction

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance réductrice vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui provoquent des réactions en chaîne aux conséquences très néfastes destructrices pour les cellules de l'organisme. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant par les radicaux libres et ainsi annihilent leur action.^[1]

II.2. Historique

A l'origine, le terme antioxydant était utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. Ce n'est qu'à la fin du XIX^{ème} siècle et au début XX^{ème} que les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisations dans les procédés industriels afin de réduire par exemple, la vulcanisation du caoutchouc et la polymérisation des carbonates dans les moteurs à explosion.^[2]

En biologie, les premières recherches sur les antioxydants ont porté sur la prévention de l'oxydation des acides gras insaturés. Dans ce cas, l'activité anti-oxydante a été facilement mesurée en enferment des corps gras dans des récipients hermétiques avec de l'oxygène, et en vérifiant le taux d'absorption de ce dernier. Cependant, ce n'est qu'avec l'identification des vitamines A, C et E qu'est apparue l'importance des antioxydants dans la biochimie des organismes vivants.^[3]

II.3. Les radicaux libres

II.3.1 Définition

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié sur l'orbitale externe. Ces électrons non appariés rendent ces espèces très instables et donc très réactives et pour se stabiliser, elles vont tenter d'apparier leur électron célibataire.^[4]

La réactivité varie d'un radical libre à un autre et dépend de l'environnement où il est présent. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), ou **Reactive Oxygène Species** en anglais (ROS), sont pour la plus part des radicaux chimiques dérivés de l'oxygène (Tableau II.1).^[5]

Certains EROs comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), n'est pas un radical au sens chimique. En effet, cette molécule, bien que réactive et toxique, n'est pas radical. Les EROs sont des espèces chimiques à très forte réactivité chimique capables d'oxyder les protéines, les acides nucléiques (ADN et ARN) et les membranes des cellules (attaque des lipides constitutifs).^[5]

Tableau II.1. Les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERA).

ERO ou ERA	Propriétés
Anion super oxyde ($O_2^{\cdot -}$)	Produit par la chaîne de transport d'électrons et d'autres sites. Ne peut pas diffuser du site d'origine. Génère les EROs .
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	N'est pas un radical libre, mais peut en générer en réagissant avec des métaux de transitions, peut diffuser à travers les membranes .
Radical hydroxyle ($\cdot OH$)	L'espèce la plus réactive dans l'attaque des molécules biologique, produit à partir de H_2O_2 via la réaction de Fenton en présence de Fe^{2+} ou Cu^{2+} .
Radicaux organiques (RO^{\cdot} , R^{\cdot} , RS^{\cdot})	Radical organique libre (R correspond au substituant) généré à partir de ROH, RH (ce radical peut s'ajouter au carbone d'une double liaison dans un acide gras insaturé) ou de RSH, par une attaque de $\cdot OH$.
Radical peroxyde (ROO^{\cdot})	Un radical organique peroxyde est produit durant la dégradation lipidique (nommé aussi LOO^{\cdot} , où L désigne une chaîne lipidique) .
Acide hypochloreux (HOCl)	Produit dans les neutrophiles durant le sursaut respiratoire pour détruire les organismes invasifs. La toxicité s'effectue à travers des réactions d'halogénations et d'oxydations. L'espèce réactive est $\cdot OCl$.
Oxygène singulet (1O_2)	Oxygène avec deux électrons de spins antiparallèles. Produit à des pressions importantes en oxygène sous l'effet de l'absorption des rayons UV. Il disparaît trop vite pour être toxique <i>in vivo</i> .
Nitrique oxyde (NO)	RNOS. Un radical libre endogène produit par l'oxyde nitrique synthétase. Il se lie aux ions métalliques, se combine avec O_2 ou aux autres radicaux contenant l'oxygène pour produire RNOS.
Peroxynitrite (ONOO)	Un agent oxydant puissant qui n'est pas un radical libre. Il peut générer NO_2 , qui est un radical.



II.3.2. La production de radicaux libres

II.3.2.1. La production intracellulaire

La production des EORs dans les cellules des mammifères découle de plusieurs sources possibles, mais c'est essentiellement d'origine enzymatique. Il s'agit principalement de la NAD(P)H oxydase membranaire et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire (Figure II.1).^[6]

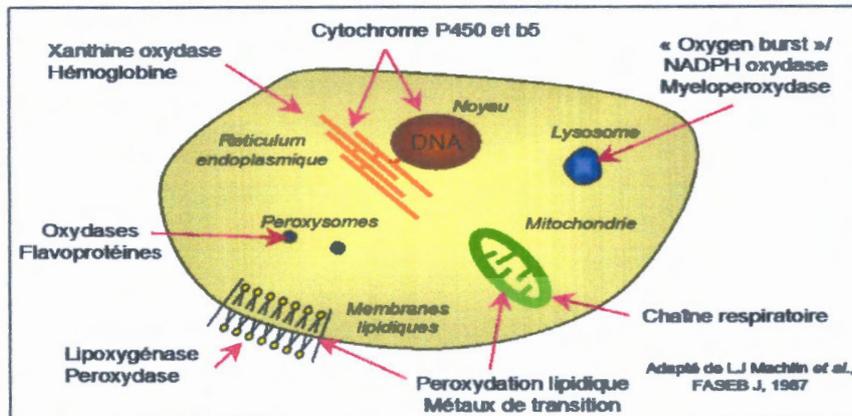
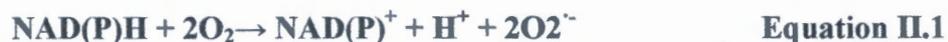


Figure II.1. Sites de production intracellulaire des EROs.

La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction de l'oxygène selon l'équation II.1.^[6]



Les cytochromes P450, accepteurs terminaux d'électrons du complexe (IV) de la chaîne de transport des électrons, situés dans la membrane mitochondriale, catalysent la réaction représentée par l'équation II.2.^[6]



Cette chaîne de transport laisse fuir une certaine proportion d'électrons, environ 2 %, qui vont réduire partiellement l'oxygène pour aboutir à la formation du radical superoxyde selon l'équation II.3.^[6]



Compte tenu de l'intense activité de la chaîne respiratoire dans les organismes aérobies, cette fuite d'électrons semble devancer les activités de la NAD(P)H. De plus, dans les mitochondries, l'oxydation de coenzymes, telles que les flavoprotéines réduites, s'accompagne d'une perte de protons et d'électrons qui, par l'intermédiaire de la chaîne de

transport, sont ensuite transférés à l' O_2 . La chaîne de transport des électrons est composée de nombreuses espèces moléculaires et ioniques (les flavoprotéines, plusieurs cytochromes etc...).^[6]

II.3.2.2. La production extracellulaire

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme.^[6]

Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérigènes non-génotoxiques peuvent directement, ou indirectement, être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes... etc.). Les rayonnements UV induisent la synthèse de $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , O_2 et de H_2O_2 , l'intermédiaire d'agents photo-sensibilisants.^[7]

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels...), ainsi qu'une alimentation 'chimique' raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres.^[8]

II.4. Le stress oxydatif

II.4.1. Définition

Le stress oxydatif est défini comme étant un état de déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs. ^[9]

La balance oxydative définit donc l'équilibre entre les espèces réactives de l'oxygène et les espèces anti-oxydantes. En médecine, la balance oxydative est un concept pour maintenir l'organisme en bonne santé dont le déséquilibre est sujet de nombreux problèmes comme les maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives.^[10] Cette balance est dynamique et est maintenue dans son bon équilibre par des mécanismes enzymatiques ou par des apports extérieurs de molécules très actives qui aident à neutraliser les EROs (Figure II.2).^[10]

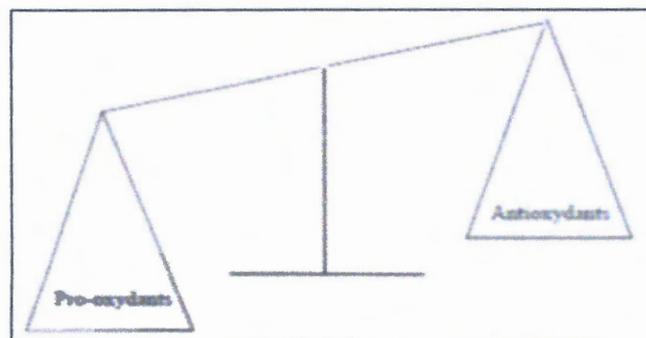


Figure II.2. Déséquilibre de la balance entre antioxydants et ERO.

Dans les conditions normales, les antioxydants prédominent les pro-oxydants, mais en conditions de stress oxydatif, les pro-oxydants l'emportent sur les antioxydants, qui peuvent conduire à de nombreuses maladies inflammatoires et cardiovasculaires.^[10]

II.4.2. Les conséquences du stress oxydatif

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN, les lipides (peroxydation), les protéines ...etc. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète...) et la dégradation des cellules et des tissus.^[11]

II.4.2.1. L'oxydation de l'ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les EROs. Cinq classe dommages oxydative médiées par le radical hydroxyle peuvent être générés : les bases nucléiques oxydées, les sites basiques des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines. L'attaque radicalaire de l'ADN peut être directe et entraîne l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées et indirect résultant de l'attaque des lipides, dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits avec les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthèno-dérivés.^[12]

II.4.2.2. L'oxydation des protéines

L'action des radicaux libres a lieu sur les chaînes latérales de certains acides aminés comme le thiol des cystéines. A proximité des sites de liaison d'ions métalliques peuvent se dérouler des réactions d'oxydation qui produisent des acides aminés anormaux. Les radicaux libres sont également responsables de la formation de ponts disulfures qui modifient la conformation des protéines et nuisent voir suppriment leur activité biologique (activité enzymatique, transduction d'un signal ou système de transport).^[13]

II.4.2.3. L'oxydation des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle, capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons (hydrogènes allyliques), pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction, appelée peroxydation lipidique, se déroule en plusieurs étapes.^[14]

A. Etape d'initiation

Dans cette étape un acide gras polyinsaturé est attaqué au niveau d'un carbone situé entre deux doubles liaisons par un radical hydroxyle avec arrachement d'un atome d'hydrogène qui laisse un électron non apparié. L'acide gras subira alors une suite de réarrangements des doubles liaisons.^[13]

B. Etape de stabilisation

Dans l'étape de stabilisation, il se produit une formation d'un diène conjugué RO_2^+ par coordination avec une molécule d'oxygène.^{13]}

C. Etape de propagation

Les alkoxy et peroxy-radicaux propagent l'oxydation par l'intermédiaire de RO_2^+ .^[13]

D. Etape de terminaison

Les hydro-péroxydes subissent plusieurs transformations ; ils sont soit réduits par la glutathion peroxydase, soit l'oxydation continue et dans ce cas ils se fragmentent en aldéhydes toxiques. Cette réaction en chaîne se termine soit par l'intervention d'un composé antioxydant, soit par l'interaction de deux radicaux pour former une molécule stable.^[13-15]

II.5. Les antioxydants

II.5.1. Définition

Le terme d'antioxydant désigne toutes substances qui présentent à faibles concentration la capacité de retarder ou d'inhiber significativement l'oxydation d'un substrat.^[16]

Les antioxydants permettent, également de faire en sorte que les produits alimentaires conservent leur goût et leur couleur et demeurent longtemps comestibles. Leur utilisation est particulièrement importante si l'on veut éviter l'oxydation des lipides et des produits contenant des lipides, et aussi permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de EROs.^[17]

II.5.2. Classification et mécanismes d'action des antioxydants

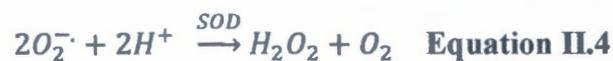
Selon le mécanisme d'action on distingue les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.^[18]

II.5.2.1. Les antioxydants enzymatiques

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes : le superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPX). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.^[19]

A. La superoxyde dismutase

Le superoxyde dismutase (SOD), est une enzyme qui élimine l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, qui produit de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène (Equation II.4).^[14] Cette enzyme existe sous deux formes : une forme cytoplasmique nécessitant comme cofacteur les ions cuivre et zinc (CuZnSOD) et l'autre forme mitochondriale utilisant les ions manganèse comme cofacteur (MnSOD).^[13]



B. La catalase

La catalase, essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Equation II.5).^[13]



C. La glutathion peroxydase

L'activité du glutathion peroxydase, ou GPX, est de neutraliser le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur.^[6]

II.5.2.2. les antioxydants non-enzymatiques

✓ Les antioxydants endogènes

a. Le glutathion (GSP)

Le glutathion est un tri-peptide formé par la condensation de l'acide glutamique, de la cystéine et de la glycine, dont la présence de fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant (Figure II.3).^[20]

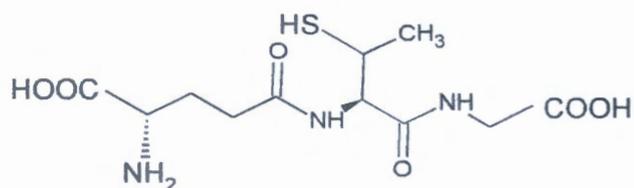


Figure II.3. Structure chimique de glutathion.

Largement présent sous forme réduite, il est capable de réagir, *in vitro*, avec les radicaux HO•, RO₂•, RO•, O₂ singulet, ONOO•, des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux HOCl.^[6]

b) L'acide urique

L'acide urique (sous forme d'urate à pH physiologique), possède des propriétés anti-oxydantes *in vitro* contre les radicaux HO• et RO₂•, tout comme la bilirubine, les mélanines et la mélatonine.^[6]

✓ Les antioxydants exogènes

A. Acide ascorbique (vitamine C)

La vitamine C ou acide ascorbique représentée par la est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène (Figure II.4). Après ingestion, elle passe rapidement dans le sang puis diffuse de façon variable dans tous les tissus. Un apport quotidien minimal d'origine alimentaire est donc nécessaire, provenant essentiellement des fruits et des légumes frais.^[11]

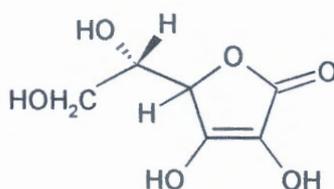


Figure II.4. Structure chimique de l'acide ascorbique (vitamine C).

La vitamine C est nécessaire pour de nombreuses fonctions physiologiques chez l'être humaine. La plupart des plantes et des animaux peuvent synthétiser l'acide ascorbique sauf les singes et les humains en raison du manque de l'enzyme gulonolactone oxydase.^[11]

B. Tocophérols (dont la vitamine E)

Les tocophérols sont des composés liposoluble regroupant quatre substances dont l'alpha-tocophérol, appelé aussi vitamine E, l'antioxydant majeur, la plus active biologiquement (Figure II.5).^[21]

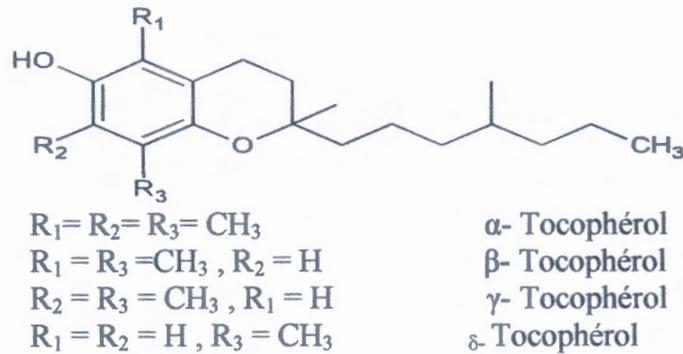


Figure II.5. Structures chimiques des tocophérols.

L' α -tocophérol a été largement étudiée comme complément alimentaire potentiellement préventive dans les maladies cardiovasculaires. Il joue un rôle dans l'atténuation du stress oxydatif, dans les symptômes des maladies neurodégénératives, et en particulier dans la maladie d'Alzheimer qui a récemment reçu un grand intérêt.^[11] Il est présent dans les membranes et les organites cellulaires, où il joue un rôle important dans la suppression de la peroxydation des lipides et il s'accumule sur ces sites au sein des cellules dans lesquelles la production des radicaux d'oxygène est plus grande.^[11]

C. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments issus des plantes et microorganismes, regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles (Figure 6). On en dénombre environ 600 présents dans la nature. L'activité anti-oxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO^\bullet , HO^\bullet , O_2^\bullet , R^\bullet par simple addition électrophile et transfert d'électron (Figure II.6). Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet.^[22]

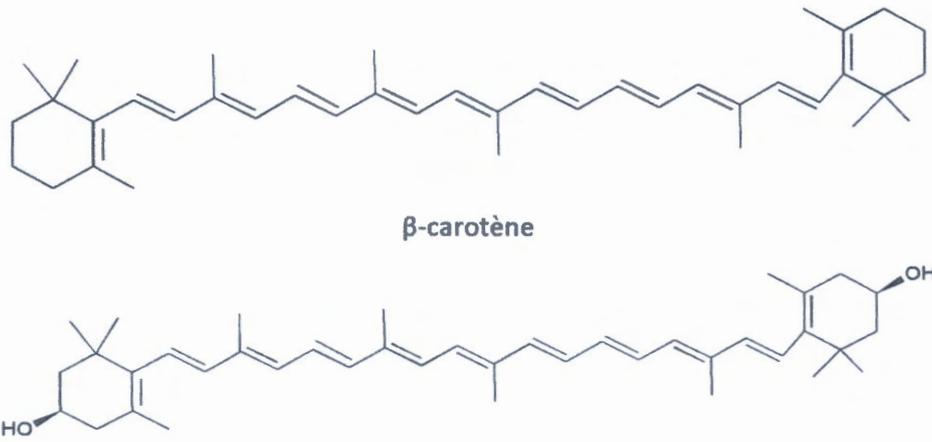


Figure II.6. Exemples de carotènes et de xanthophylles.

D. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, et en particulier les flavonoïdes, sont des métabolites secondaires des plantes qui sont caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane (Figure I.7). Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à terminer les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à bloquer, par chélation, les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Figure II.7).^[23-24]

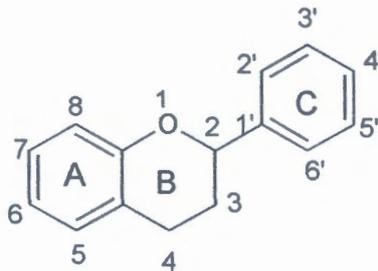


Figure II.7. Cycle de base des composés phénolique, dont les flavonoïdes.

Références

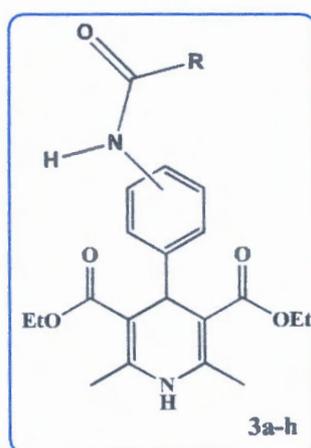
- 1) K. Bouhadjra, Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, mémoire de magister, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 2011.
- 2) H.A. Matill, antioxydants. *Annu. Rev. Biochimie*, 1947, 16:177-192.
- 3) R. A. Jacob, Introduction: three eras of vitamin C discovery. *Ascorbic acid: biochemistry and biomedical cell biology*, Edition 1996.
- 4) H. Louanas, Prédiction Théorique De L'Activité Antioxydante de composés d'espèces naturelles, Mémoire de magister ; Faculté des Sciences, Département de Chimie, Université EL Hadj Lakhdar Batna, 2011.
- 5) H. Amal, Étude de L'Activité Anti-oxydante des Saponines Du Tourteau de L'Arganier, Thèse de doctorat, université Mohammed V Agdal. Rabat, 2010.
- 6) A. Rezaire, Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa) (Doctoral dissertation, Antilles-Guyane), 2012.
- 7) M. Sumaya Martinez, Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité anti-radicalaire et anti-oxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation (Doctoral dissertation, Brest), 2004.
- 8) Mena, S., Ortega, A., & Estrela, J. M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2009.
- 9) Boyd, B., et al. "Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé." *GlycoScience et Nutrition* 4.6 (2003).
- 10) Bayala, Bagora. Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes. Diss. 2014.
- 11) Chérifa Boubekri ; Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques Doctorat en sciences ; Université Mohamed Khider – Biskra ; 2014.
- 12) Favier, Alain. "Le stress oxydant." *L'actualité chimique* 108 (2003).
- 13) Jacques, B., and R. André. "Biochimie métabolique Ed ellipses." *Paris. pp* (2004).
- 14) Boudjouref, Mourad. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Diss. 2018.

- 15) Hennebelle, T., S. Sahpaz, and F. Bailleul. "Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif." *Phytothérapie* 2.1 (2004).
- 16) Jeeva, J. Sathiya, et al. "Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases." *Journal of pharmacy & bioallied sciences* 7.Suppl 2 (2015).
- 17) Bechami, Sofiane, and F. Encadreur Benabdesselam. "Les polyphénols de *Teucrium fruticans* et leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes." (2015).
- 18) Park, Pyo-Jam, et al. "Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78.6 (2001).
- 19) Marfak, Abdelghafour. Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Diss. Thèse de Doctorat. Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, 2003.
- 20) Gardès-Albert, Monique, et al. "Espèces réactives de l'oxygène." *L'actualité chimique* (2003).
- 21) Wang, Xiaoyuan, and Peter J. Quinn. "The structure and phase behaviour of α -tocopherol-rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine." *Biochimie* 88.12 (2006).
- 22) Valko, Marian, et al. "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chemico-biological interactions* 160.1 (2006).
- 23) Schroeter, Hagen, et al. "MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide." *Neurobiology of aging* 23.5 (2002).
- 24) Leopoldini, Monica, Nino Russo, and Marirosa Toscano. "The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants." *Food Chemistry* 125.2 (2011).

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Objectif du travail

L'objectif de ce travail est l'évaluation de l'activité anti-oxydante de quelques dérivés de 1,4-dihydropyridine portant un fragment amide. Ce dernier est porté par le groupe phényle (en méta et para) situé à la position 4 du noyau 1,4-dihydropyridine. Ces composés sont des analogues de dihydropyridines décrites qui portent des fragments urée, thiourée et sulfonylurée à la place du fragment amide (Travaux de thèse de M. Stiti Mohamed Zakaria non encore soutenue, université de Jijel). L'idée de cibler l'activité anti-oxydante vient du fait que le noyau 1,4-dihydropyridine peut être oxydé en pyridine aidée par l'obtention d'un composé aromatique, qu'est la pyridine, un composé plus stable. La structure générale des composés, faisant l'objet de ce travail, est présentée dans la figure III.1 ci-dessous.



X= O, S
R= aryle ou alkyle

Figure III.1. Structure générale des composés à ciblé .

Ces molécules ont subi trois tests dans lesquels ils réagissent avec trois réactifs qui sont :

- ✓ DPPH
- ✓ ABTS
- ✓ FRAP

III.2. Résultat du test au DPPH

III.2.1. Principe du test

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) est un radical libre stabilisé par mésomérie qui possède un électron libre sur l'atome d'azote. C'est un réactif largement utilisé pour déterminer les propriétés antioxydantes de phénols, catéchols et anilines et tout autre antioxydant.^[1] De coloration pourpre sous forme de radical ($\lambda_{\max} = 515$ nm), le DPPH se décolore progressivement en présence d'un antioxydant en captant un atome d'hydrogène, ou

selon les cas un électron. Ainsi, on peut suivre cette décoloration progressive par spectrométrie UV-visible et déterminer le pourcentage d'inhibition du DPPH.

III.2.2. Résultats et discussion

D'après les résultats obtenus avec le test au DPPH, aucun composé testé n'a manifesté une activité anti-oxydante. En effet, il à noter qu'il n'y a pas de changement de couleur violette caractéristique du test de DPPH même à forte concentration 1000µg/ml de produit, alors on n'a pas cherché à aller en de ça de cette concentration.

On revanche que la molécule de référence présente une très forte activité.

III.3. Résultat du test à l'ABTS

III.3.1. Principe du test

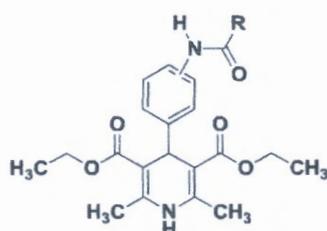
Dans cet essai, l'ABTS est oxydé par un oxydant approprié en son cation radical, $ABTS^{\cdot+}$, qui est intensément coloré. L'activité anti-oxydante représente alors la capacité des composés à tester à diminuer la couleur réagissant directement avec le radical $ABTS^{\cdot+}$.^[1] Cette décoloration peut être suivie facilement par spectrométrie UV-visible et en déduire le pourcentage d'inhibition et l' EC_{50} de chaque produit ainsi que celle de la référence utilisée (acide ascorbique).

III.3.2. Résultats et discussion

Les résultats sont présentés sous forme d' $EC_{50} \pm$ l'écart-type (tableau III.1). D'après le tableau III.1, les composés **3a**, **3e** et **3h** n'ont pas d'activité antioxydante, c'est-à-dire qu'ils ne provoquent pas de décoloration de la solution de l'ion radical $ABTS^{\cdot+}$. Par contre, les autres composés, **3b**, **3c-d**, **3f**, et **3g** présentent une activité antioxydante, dont les deux les plus actifs sont **3d** et **3g**. Néanmoins, ces deux derniers restent comme même environ deux fois et demie, et deux fois moins actifs que l'acide ascorbique respectivement. Notons que les deux composés les plus actifs, **3d** et **3g**, possèdent tous les deux un groupe phényle (groupe amide en méta et para respectivement) portant un atome de fluor chacun.



Tableau III.1. Activité anti-oxydante des composés **3a-h** lors du test ABTS, formulé en tant que EC₅₀.



Composé	R	EC ₅₀ (µg/ml)	A _{AR} %
3a	C ₆ H ₅ (méta)	Inactive	Inactive
3b	iPr (méta)	67.46 ± 0.3750	0.015
3c	Fur-2-yl (méta)	27.52 ± 1.390	0.036
3d	3-F-C ₆ H ₄ (méta)	10.79 ± 2.546	0.092
3e	Fur-2-y (para)	Inactive	Inactive
3f	Thién-2-yl (para)	70.25 ± 5.235	0.014
3g	3-F-C ₆ H ₄ (para)	8.015 ± 0.2650	0.125
3h	C ₆ H ₅ (para)	Inactive	Inactive
A. Ascorbique	-----	4.403 ± 0.04300	0.227

III.4. Test du pouvoir réducteur du fer (FRAP)

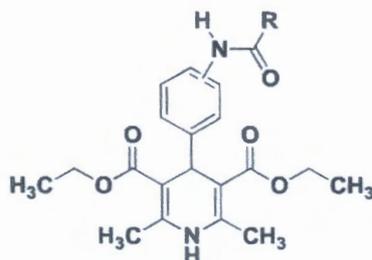
III.4.1. Principe du test

Le pouvoir réducteur d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son activité antioxydant potentielle. L'aptitude d'un échantillon à donner un électron reflète son pouvoir antioxydant. Ainsi, la réduction du fer ferrique (Fe³⁺) par un composé donnée est un indicateur de sa capacité à donner un électron. Dans ce test le pouvoir antioxydant des produits testés se manifeste via le changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au vert, suite à la réduction de l'ion ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺). Cette dernière est quantifiée par la mesure de l'absorbance de la couleur verte formée aux différentes concentrations utilisées. Le pouvoir réducteur de ces échantillons est exprimé par la concentration effective à 50% (EC₅₀) qui est une concentration qui permet d'obtenir une absorbance de 0,5.^[3]

III.4.2. Résultats et discussion

Les résultats sont présentés sous forme d'EC₅₀ ± l'écart-type (tableau III.1).

Tableau III.2. Activité anti-oxydante des composés **3a-h** lors du test FRAP, formulé en tant que EC₅₀.



Produits	R	EC ₅₀ µg/ml
3a	C ₆ H ₅ (méta)	2.092 ± 0.102
3b	iPr (méta)	13.63± 0.011
3c	Fur-2-yl (méta)	37.27 ± 0.546
3d	3-F-C ₆ H ₄ (méta)	61.51 ± 0.320
3e	Fur-2-y (para)	50.92 ± 0.465
3f	Thién-2-yl (para)	65.75 ± 0.192
3g	3-F-C ₆ H ₄ (para)	62.91 ± 0.333
3h	C ₆ H ₅ (para)	51.43 ± 0.357
A. Ascorbique	-----	15.20 ± 0.918

D'après les résultats du tableau III.2, tous les composés présentent un pouvoir réducteur du fer. Les plus actifs sont les deux composés **3a** et **3b**, où le premier est environ 7 fois plus actif que l'acide ascorbique, et le second est aussi actif que lui. Les autres composés, **3c-h**, sont de environ 2,5 fois à 4 fois moins actifs que l'acide ascorbique. Remarquons que **3a** et **3b** étaient, l'un inactif et l'autre environ 15 fois moins actif que l'acide ascorbique avec le test au DPPH. Ceci souligne la différence de comportement des antioxydants, y compris nos molécules, vis-à-vis d'un système ou un milieu oxydant. Néanmoins, les résultats de ce travail révèlent un potentiel antioxydant de détient nos composés, et qu'il faut l'étudier, et l'approfondir, avec d'autres systèmes oxydants, qu'ils soient chimiques ou biologiques.

Références

- [1] Brand-Williams, Wendy, Marie-Elisabeth Cuvelier, and C. L. W. T. Berset. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *LWT-Food science and Technology* 28.1 (1995).
- [2] Re, Roberta, et al. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free radical biology and medicine* 26.9-10 (1999).
- [3] Chung, Yun-Chin, et al. "Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther." *Food Chemistry* 91.3 (2005).

Chapitre IV : Chapitre IV
Partie expérimentale

IV.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante

IV.1.1. Introduction

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité anti-oxydante sont relativement peu nombreuses et font intervenir, en générale, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agent antioxydant. Il n'y a pas de méthode universelle par laquelle l'activité anti-oxydante peut être quantitativement mesurée d'une façon bien précise. Le plus souvent, il faut combiner des tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité anti-oxydante de l'échantillon à tester.

IV.1.2. Présentation des produits testés

Les composés testés sont des dihydropyridines comportant un groupe phényle en position 4, substitué, en méta ou en para, par un fragment amide (R= alkyle, phényle, phényle substitué, hétérocycle) (Figure IV.1).

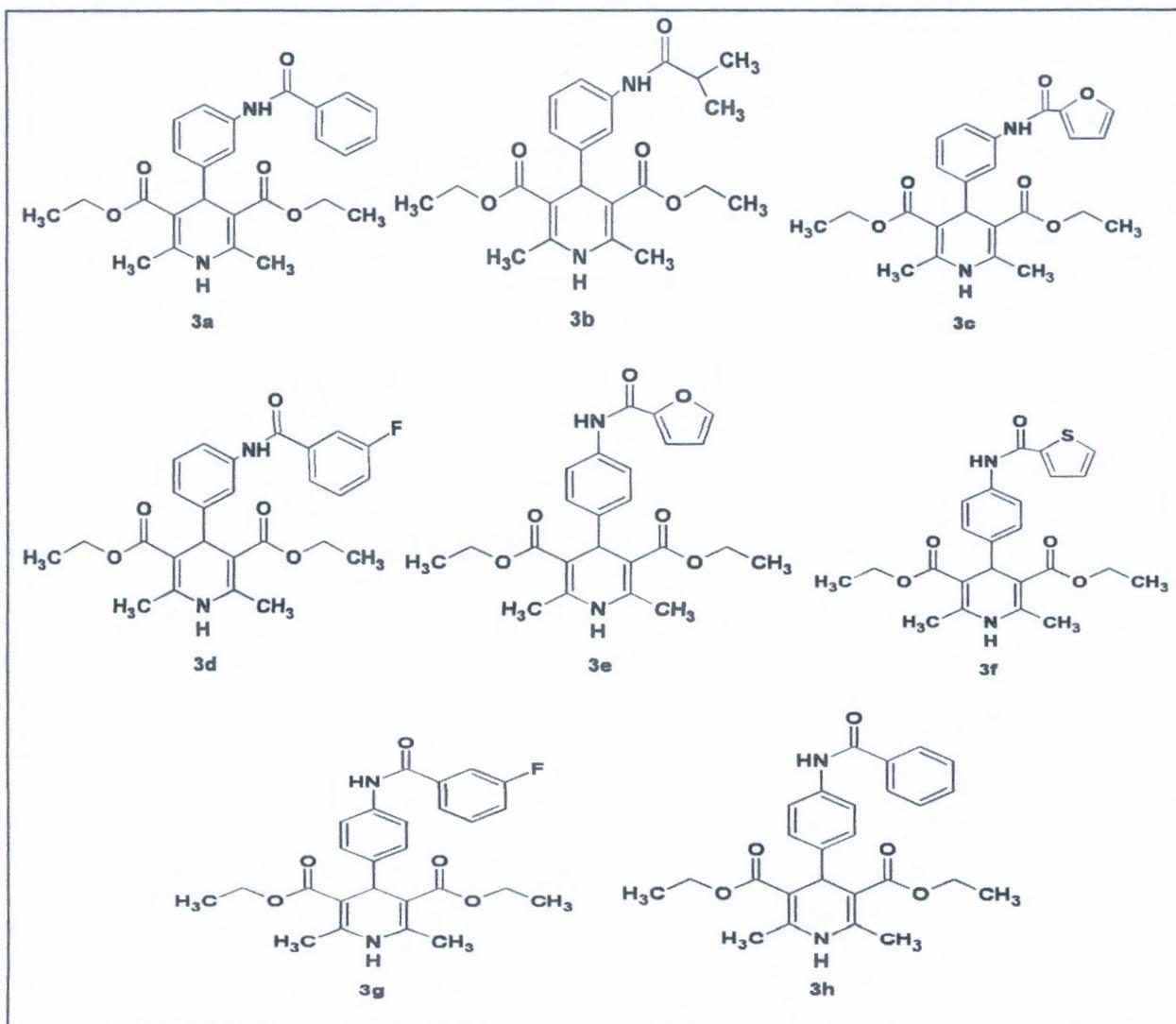


Figure IV.1. Structures des composés ciblés (3a-h).

Ces composés ont été synthétisés par M. Stiti Mohamed Zakaria, dans le cadre de sa thèse de doctorat, dirigée par le professeur Khelili Smail, à l'université Mohamed Seddik benyahia (Jijel) (travaux non publiés). Le schéma de synthèse est présenté dans le chapitre III de ce mémoire.

IV.1.3. Méthodes utilisées pour évaluer l'activité anti-oxydante

L'effet antioxydant a été évalué *in vitro* par la mesure du pouvoir piègeur des radicaux libres de nos produits, qui est estimé par comparaison à un antioxydant de référence, l'acide ascorbique. Cette étude a été réalisée au de l'laboratoire de pharmacologie et de photochimie (faculté des sciences exactes et informatique) de l'université Mohamed Seddik benyahia (Jijel).

IV.1.3.1. Test de DPPH

IV.1.3.2.1. Introduction

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) est un radical libre de couleur violacée qui absorbe dans l'UV-visible à 515nm. Il fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure/activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome d'azote (Figure IV.2). Du fait de la délocalisation de cet électron célibataire, les molécules du radical ne forment pas de dimères. Le radical DPPH reste donc dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. L'efficacité d'un antioxydant peut être mesurée par sa capacité à réduire ce radical. Ceci s'observe par le changement de couleur allant du bleu-violet (forme oxydée) au jaune (forme réduite) (Figure IV.2). Ainsi, ce changement de couleur peut être suivi par spectrométrie UV-visible et permet de quantifier le pouvoir piègeur de ce radical. ^[1]

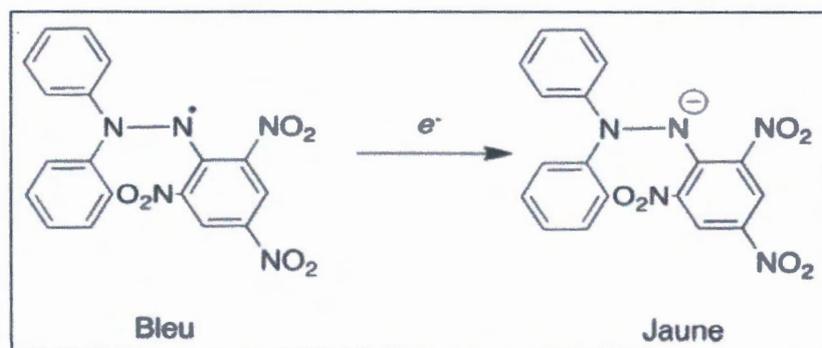


Figure IV.2. Modification du DPPH• par transfert d'électron.



La réduction se fait également par transfert d'un atome d'hydrogène (Figure IV.3.).

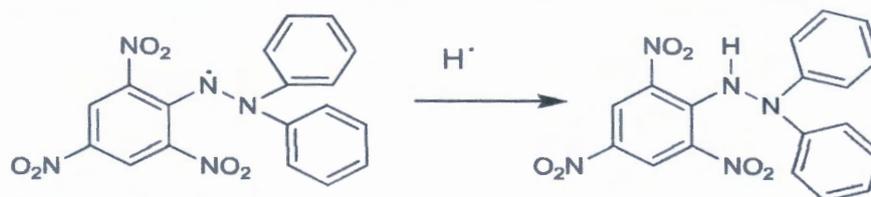


Figure IV.3. Modification du DPPH• par transfert d'hydrogène.

IV.1.3.2.2. Mode opératoire ^[1]

Une solution de DPPH de concentration 60µM a été préparée par dissolution de 2,4 mg de DPPH sous forme de poudre, dans 100 ml de méthanol. La solution obtenue est agitée pendant 1 heure à l'obscurité 0 C°. Par ailleurs, 1mg de chaque produit a été solubilisé dans 1000µl de DMSO.

Un volume de 50µl de la solution de chaque produit est ajouté à 950µl de la solution méthanolique de DPPH fraîchement préparée. Parallèlement, un control négative est préparé en mélangeant 50µl de DMSO avec 950µl de la solution méthanolique de DPPH.

La lecture de l'absorbance est faite à 515 nm après 30min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique, dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour une gamme des concentrations. Le test est à répéter 2 fois.

IV.1.3.2. Test à l'ABTS

IV.1.3.2.1. Introduction

Le radical cation de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) est stable sous sa forme libre. Ce radical est facilement formé à partir de l'acide correspondant par oxydation en présence de persulfate de potassium (Figure IV.4). D'autres oxydants peuvent être utilisés, tels que le dioxyde de manganèse (MnO₂).

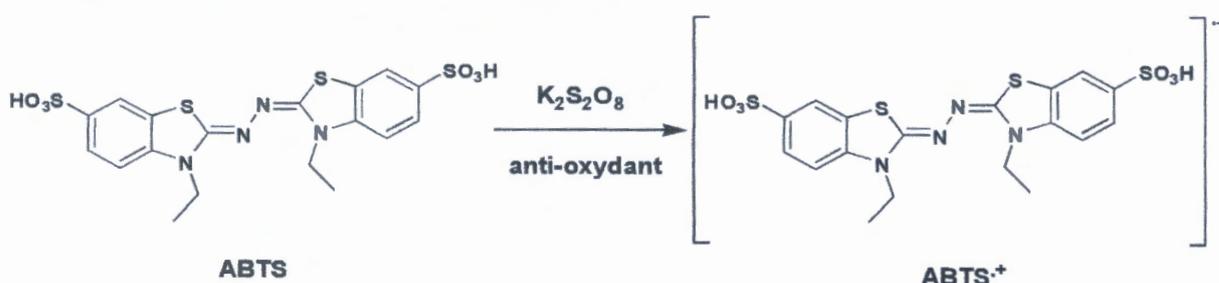


Figure IV.4. Formation du cation radical ABTS^{•+}

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. Ce radical est caractérisé par un spectre UV avec des maximums d'absorbance à 734 nm. La concentration de ce radical peut être déterminée en mesurant l'absorbance à ces longueurs d'onde. L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical cation entraîne sa réduction et une diminution de l'absorbance à 734 nm. Cette diminution dépend de l'activité antioxydant du composé testé mais souvent aussi du temps et de la concentration. [2]

IV.1.3.2.2. Mode opératoire [2]

3 ml de la solution stock d'ABTS (7 mM) a été diluée avec 150 ml de l'éthanol pour obtenir une absorbance maximale de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm.

Une gamme de concentrations (10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 250 ; 500 ; 1000 µg/ml) a été préparée à partir d'une solution mère préparée par dissolution de 1mg de chaque produit dans 1 ml de DMSO.

Un volume de 100 µl de différentes concentrations de chaque produit testé est ajouté à 900µl de la solution méthanolique de l'ABTS. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 100µl de DMSO avec 900µl de la solution méthanolique de l'ABTS.

Après incubation à l'obscurité pendant 10 min à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$Pi\% = \frac{A(\text{blanc}) - A(\text{échantillon})}{A(\text{blanc})} \times 100$$

- Pi : le pourcentage de d'inhibition
- $A(\text{blanc})$: Absorbance de blanc
- $A(\text{échantillon})$: Absorbance du composé d'essai

L'IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient concentration de 50%), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical ABTS.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires ou logarithmiques des pourcentages d'inhibitions en fonction de différentes concentrations de chacun des produits testés.

Ainsi, l'activité anti-radicalaire (A_{AR}) est déterminée en calculant l'inverse des valeurs des IC₅₀ selon la formule suivante :

$$A_{AR} = 1/IC_{50}$$

IV.1.3.3. Test de réduction du fer ou Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

IV.1.3.3.1. Introduction

Cette technique mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux Fe²⁺ dans une réaction basée sur le mécanisme de transfert d'électron. Il s'agit d'une technique spectrophotométrique simple, peu coûteuse qui a été initialement appliquée au plasma mais a été étendue aux autres liquides biologiques, les aliments, les extraits des plantes et les jus. La concentration de Fe²⁺ peut être suivie en mesurant l'absorbance à 700 nm.^[3]

IV.1.3.3.2. Mode opératoire ^[3]

Une gamme des concentrations (10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 250 ; 500 ; 1000 µg/ml) a été préparée à partir d'une solution mère préparée par dissolution de 1mg de chaque produit dans 1 ml de DMSO.

Un volume de 100 µl de différentes dilutions a été mélangé avec 250 µl de tampon phosphate (0.2M, pH = 6.6), 250 µl du ferricyanure de potassium de concentration 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Par la suite, 250 µl d'acide trichloro-acétique, 850 µl de H₂O distillée et 170 µl de FeCl₃ de concentration 0,1% ; sont ajoutées successivement dans les mélanges préexistants.

Les tubes à essais ont été incubés à l'obscurité et à une température ambiante pendant 10 minutes. La lecture a été réalisée à 700 nm.

Références

- [1] Brand-Williams, Wendy, Marie-Elisabeth Cuvelier, and C. L. W. T. Berset. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *LWT-Food science and Technology* 28.1 (1995).
- [2] Re, Roberta, et al. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free radical biology and medicine* 26.9-10 (1999).
- [3] Chung, Yun-Chin, et al. "Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther." *Food Chemistry* 91.3 (2005).

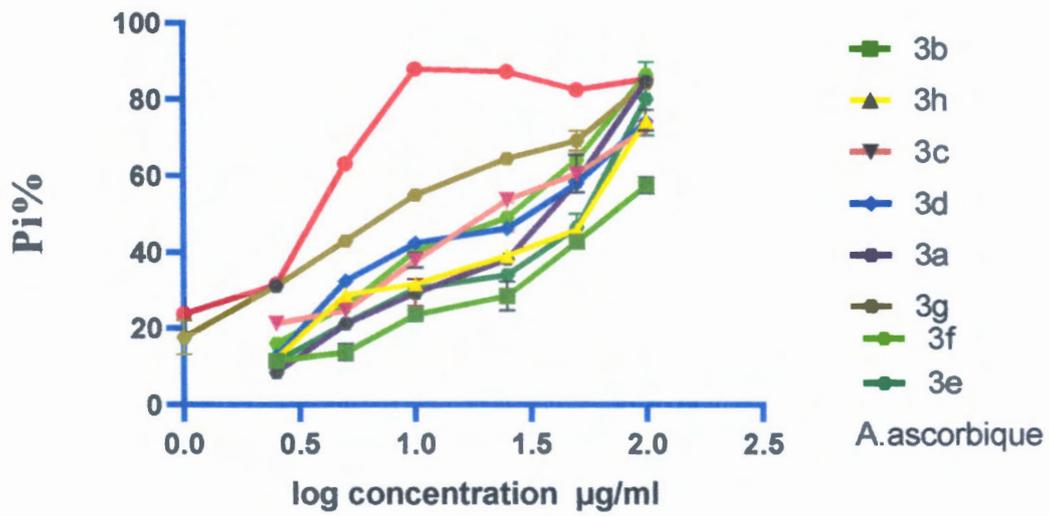
Conclusion générale

Conclusion générale

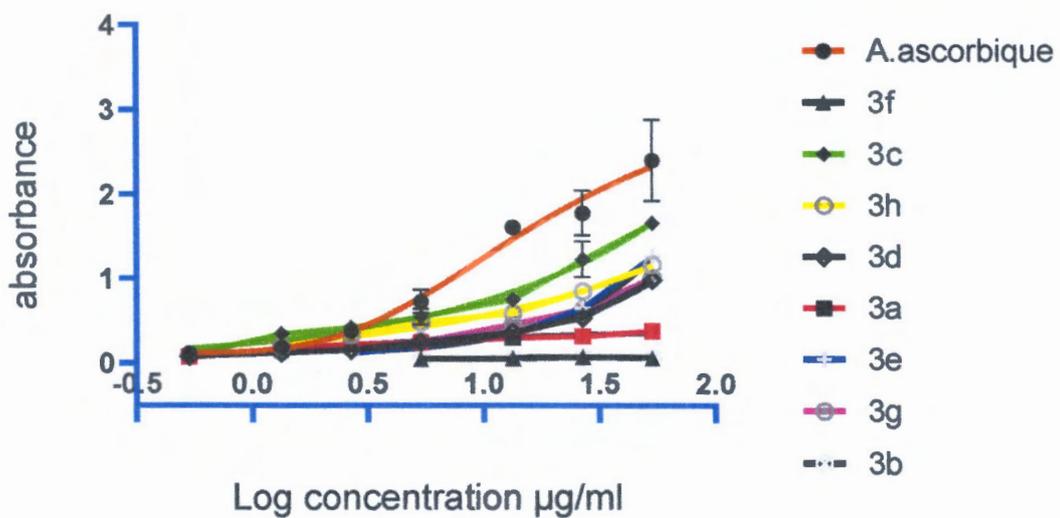
Ce travail avait comme objet l'évaluation de l'activité antioxydante de quelques 1,4-dihydropyridines portant des fragments amides sur le groupe phényle de l'hétérocycle. Le choix de ces molécules a été guidé par le fait que le cycle 1,4-dihydroxyridine lui-même, posséderait des propriétés antioxydantes. Le manuscrit a commencé par une introduction générale, puis s'est suivi des généralités sur les 1,4-dihydropyridines, incluant leurs propriétés pharmacologiques, ainsi que 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 parce que les travaux réalisés ici sont uniquement une évaluation d'une activité pharmacologique. Nous avons ensuite présenté un bref aperçu sur 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), ont montré que globalement, les molécules testées possèdent un réel pouvoir antioxydant et certains d'entre eux se sont montrés aussi actifs, voire nettement plus actifs que l'antioxydant de référence, l'acide ascorbique. L'utilisation de trois tests différents était nécessaire parce que le comportement antioxydant d'un composé chimique dépend du système oxydant en face et du mécanisme d'oxydation. En effet, les résultats ont montré que le comportement de nos molécules n'était pas le même selon le test, mais en revanche, ont révélé un véritable potentiel antioxydant qui mérite d'être approfondi. 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-à-dire, les tester *in vivo*.



Annexe



Annexe 1 : Les pourcentages d'inhibition de l'acide ascorbique et chaque produit pour le teste d'ABTS



Annexe 2 : Pouvoir réductrice de l'acide ascorbique et chaque produit pour le teste de FRAP

ملخص

كان الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة لبعض 1,4-ديهيدروبيريدين يحمل شقوق أميد على مجموعة فينيل للحلقة غير المتجانسة. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام ثلاثة اختبارات مختلفة: DPPH, FRAP, ABTS.

وقد استرشد اختيار هذه الجزيئات بحقيقة أن حلقة 1,4-ديهيدروبيريدين بحد ذاتها لها خصائص مضادة للأكسدة. كان استخدام ثلاثة اختبارات مختلفة ضروريًا لأن سلوك مضادات الأكسدة لمركب كيميائي يعتمد على نظام الأكسدة على وآلية الأكسدة. أظهرت النتائج أن جزيئاتنا كانت غير نشطة مع اختبار DPPH من ناحية أخرى كانت بعض المشتقات نشطة للغاية، خاصة 3 أو 3 ب، في اختبار FRAP، حيث كان الأول أكثر نشاطًا بنحو 7 مرات من حمض الأسكوربيك، والثاني كان بقدر نشاط هذا الأخير. في اختبار ABTS كانت كل المركبات أقل نشاطًا من حمض الأسكوربيك، أظهرت هذه النتائج أن سلوك جزيئاتنا لم يكن هو نفسه وفقًا للاختبار، ولكن من ناحية أخرى، كشفت القدرات المضاد للأكسدة الحقيقية لها والتي تستحق أن يتم تعميمها وتقييمها باستخدام أنظمة مؤكسدة أخرى، سواء كانت كيميائية وبيولوجية.

Résumé

Ce travail avait comme objet l'évaluation de l'activité antioxydante de quelques 1,4-dihydropyridines portant des fragments amides sur le groupe phényle de l'hétérocycle. L'activité anti-oxydante a été évaluée à l'aide de trois différents tests : DPPH, ABTS, FRAP.

Le choix de ces molécules a été guidé par le fait que le cycle 1,4-dihydroxyridine lui-même, possède des propriétés antioxydantes. L'utilisation de trois tests différents était nécessaire parce que le comportement antioxydant d'un composé chimique dépend du système oxydant en face et du mécanisme d'oxydation. Les résultats ont montré que nos molécules étaient inactives avec le test DPPH. Par contre, avec le test FRAP, certains dérivés se sont montrés très actifs, en particulier 3a et 3b, où le premier était environ 7 fois plus actif que l'acide ascorbique, et le second était aussi actif que lui. Avec le test ABTS l'activité des molécules étaient inférieure à celle de l'acide ascorbique. Ces résultats ont montré 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, et évalué avec d'autres systèmes oxydants, chimiques et biologiques.

Abstract

The aim of this work was the evaluation of the antioxidant activity of some 1,4-dihydropyridines carrying amide moieties on the phenyl group of the heterocycle. The antioxidant activity was evaluated using three different tests: DPPH, ABTS, FRAP. The choice of these molecules has been guided by the fact that the 1,4-dihydroxyridine ring itself has antioxidant properties. The use of three different tests was necessary because the antioxidant behavior of a chemical compound depends on the oxidizing system and the oxidation mechanism. The results showed that our molecules were inactive with the DPPH test. On the other hand, with the FRAP test, some derivatives were very active, in particular 3a and 3b, where the first was about 7 times more active than ascorbic acid, and the second was as active as it was. With the ABTS test the activity of the molecules was lower than that of ascorbic acid. These results showed that the behavior of our molecules was not the same according to the test, but on the other hand, revealed a real antioxidant potential which deserves to be deepened, and evaluated with other oxidizing systems, chemical and biological systems.