

République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mohamed Seddik Benyahia- JIJEL



Faculté des sciences exactes et informatique

Département de chimie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Intitulé

**Évaluation de l'activité antioxydante de quelques
dérivés de 1, 4-dihydropyridines portant des
fragments urée et thiourée**

Présenté par :

🍏 Latli Zineb

🍏 Boutas Houria

Membres de Jury

Mme N. Bouider	MCB	Présidente	Université Mohamed Seddik Benyahia
M. S. Khelili	Pr	Encadreur	Université Mohamed Seddik Benyahia
M. M. Bouhedja	MAA	Examineur	Université Mohamed Seddik Benyahia

🌀 Promotion 2018/2019 🌀

chi Phar. 06/19

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mohamed Seddik Benyahia- JIJEL



Faculté des sciences exactes et informatique
Département de chimie

جامعة جيجل
كلية العلوم الدقيقة والإعلام الآلي
المكتبة
Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Intitulé

**Évaluation de l'activité antioxydante de quelques
dérivés de 1, 4-dihydropyridines portant des
fragments urée et thiourée**

Présenté par :

🍏 Latli Zineb

🍏 Boutas Houria

Membres de Jury

Mme N. Bouider	MCB	Présidente	Université Mohamed Seddik Benyahia
M. S. Khelili	Pr	Encadreur	Université Mohamed Seddik Benyahia
M. M. Bouhedja	MAA	Examineur	Université Mohamed Seddik Benyahia

🌿 Promotion 2018/2019 🌿



Remerciements

Nous remercions tout d'abord Allah le tout puissant qui nous a donné la force, le courage et la patience pour élaborer ce mémoire.

*Nos remerciements les plus chaleureux sont destinés à notre promoteur, le professeur **Smail KHELILI**, qui nous a fait l'honneur de diriger ce projet. Merci pour sa disponibilité, sa grande patience, ses conseils et ses remarques précieuses.*

*Nous remercions également le **Dr. Safia HABILA**, maître de conférence au département d'écologie, **M. Tahar HABILA** et **M. Mohamed Zakaria SETITI**, doctorants et enseignants vacataires au département de chimie (Université de Jijel), pour l'aide qu'ils nous ont apportée au cours de la réalisation des tests biologiques et de leurs conseils précieux.*

*Nos sincères remerciements vont également aux membres du jury, le **Dr. BOUIDER Nafila**, maître de conférence, et **M. BOUHEDJA Mourad**, maître assistant, au département de chimie, pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner ce travail.*

Nous voudrions exprimer nos sincères remerciements aux responsables du laboratoire de phytochimie et de pharmacologie (LPP) de la faculté des sciences exactes et informatique de l'université de Jijel, pour leur aide logistique qui a facilité la réalisation de ce travail.

Nous remercions également toute la communauté du département de chimie de la faculté des sciences exactes et informatique de l'université de Jijel : enseignants, administrateurs, étudiants, comme nous saluons chaleureusement tous nos compagnons de mémoire.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et salutations à nos Parents, pour leur soutien moral et de leurs conseils durant notre parcours d'études.

En fin, nous tenons à remercier toute personne ayant participé de près ou de loin à réaliser ce projet.

Dédicaces

A mes chers parents

Je vous dois tout ce que je suis aujourd'hui, grâce à votre amour, à votre patience et vos immenses sacrifices.

Que ce modeste travail, soit pour vous une petite compensation et reconnaissance envers ce que vous avez fait d'incroyable pour moi.

Qu'Allah, le tout puissant, vous préserve et vous procure santé et longue vie afin que je puisse à mon tour vous combler.

A mes très chers frères, Ahmed , Abd elhak et Hami, et ma chère sœur "Asma

Aucune dédicace ne saurait exprimer assez profondément ce que je ressens envers vous.

Je vous dirais tout simplement, un grand merci, je vous aime.

A mes chères amies

A mes chers collègues de la promotion 'Master chimie pharmaceutique 2019'

En témoignage de l'amitié sincère qui nous a liées et des bons moments qu'on a passés ensemble je vous dédie ce travail en vous souhaitant un avenir radieux et plein de bonheur.

Houria

Dédicaces

C'est avec l'aide et la grâce d'Allah que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie :

A ma très chère mère

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

A mon très cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, et le respect que j'ai pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes frères et sœurs

*Salah Eddine, Hana, Tabet, Amina et mon petit ange Ahmed
Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite*

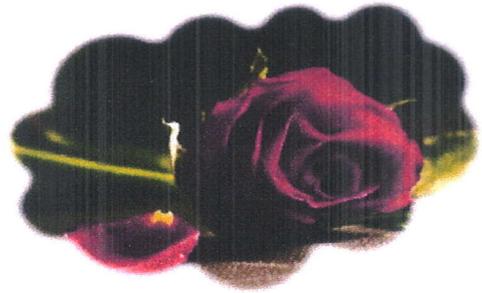
A mon cher fiancé Mohamed et sa famille

A mes chères amies

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères et sœurs sur qui je peux compter.

A tous les membres de ma famille, petits et grands

A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation



Liste des figures

Figure In.1. Structure générale des composés faisant l'objet du présent travail	04
Figure I.1. Structures de quelques 1,4-dihydropyridines d'intérêt biologique	04
Figure I.2. Exemple de 1,4-Dihydropyridines Inhibiteurs des canaux calciques	05
Figure I.3. Structure générale d'agents antituberculeux a base 1,4-dihydropyridine	06
Figure I.4. Structure chimique du AC394	06
Figure I.5. Structure chimique de quelques agents antioxydant à base du noyau dihydropyridine	07
Figure I.6. Structure générale de 1,4-dihydropyridines possédant activité anti-dyslipidémique	08
Figure I.7. Structure générale de 1,4-dihydropyridin-4-yl-phenoxyacetohydrazones dotés d'activités analgésique anti-inflammatoire	08
Figure I.8. Structure générale bases de Mannich de 1, 4-dihydropyridines avec le sulfanilamide	09
Figure II.1. Les différents dommages à l'ADN provoqués par le stress oxydant	20
Figure II.2. Structure tridimensionnelle du superoxyde dismutase	22
Figure II.3. Structure tridimensionnelle de la catalase	22
Figure II.4. Structure tridimensionnelle de la glutathion peroxydase	23
Figure II.5. Structure de la taurine	26
Figure III.1. Conception des molécules à tester par modulation structurale de la nifédipine	30
Figure III.2. Equilibre thione-thiol chez les thiourées	32
Figure IV.1. Structures chimiques des composés à tester	37
Figure IV.2. Cuve utilisée en spectrométrie UV-visible, remplie par l'échantillon à analyser et traversée par un rayon lumineux	38
Figure IV.3. Conversion de DPPH• en DPPHH par transfert d'un hydrogène	39
Figure IV.4. Génération du radical-cation ABTS ^{•+} avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant (AOH)	40

Liste des schémas

- Schéma I.1.** Réaction originelle de Hantzsch pour la synthèse des 1,4-dihydropyridines 09
- Schéma I.2.** Schéma de synthèse de molécules à tester. Réactifs : (i) $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$, EtOH à reflux ; (ii) H_2 (10 bars), Pd/C (5%), Méthanol, 65°C ou (iii) Pd/C (5%), HCOONH_4 , EtOH à reflux ; (iv) RNCO ou RNCS, CH_2Cl_2 , température ambiante 11

Liste des tableaux

Tableau III.1. EC ₅₀ (μg/ml) de nos composés et celle de l'acide ascorbique avec le test DPPH	31
Tableau III.2. EC ₅₀ (μg/ml) de nos composés et celle de l'acide ascorbique avec le test ABTS	32
Tableau III.3. EC ₅₀ (μg/ml) de nos composés et celle de l'acide ascorbique avec le test FRAP	33
Tableau IV.1. Préparation de la solution mère et les solutions filles	38

Liste des abréviations

%	Pourcentage
AA	Activité antioxydante
ABTS	Acide 2,2- Azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
CAT	Catalase
C°	Degré Celsius
DHP	Dihydropyridine
DHPs	Dihydropyridines
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	Radical 2,2-DiPhényl-1-PicrylHydrazyle
DPPHH	2,2-Diphényl-1-PicrylHydrazyle réduit
e⁻	Electron
EAR	Espèces azotées radicalaires
EC₅₀	Dose efficace provoquant l'inhibition de 50%
EOA	Espèces oxygénées activées
Fe²⁺	Fer ferreux
FRAP	Ferric Reducing/Antioxidant Power
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion disulfure
MA	Molécule antioxydante
min	minute
nm	Nanomètre
NOS	Nitric Oxide Synthase (Oxyde nitrique synthase)
NRS	Nitrogen Reactive species (Espèces réactives de l'azote)
pH	Potentiel d'Hydrogène
Rdt	Rendement
RL	Radical libre
ROS	Reactive Oxygen Species (Espèces réactives de l'oxygène)
SOD	Superoxyde Dismutase
TCA	Trichloroacetic acid (Acide trichloracétique)
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
UV	Ultraviolet
λ	Longueur d'onde

Sommaire

Introduction générale	01
Références	03
Chapitre I : Généralités sur les 1,4-dihydropyridines	
I.1. Introduction	04
I.2. Intérêts biologiques des 1,4-dihydropyridines (DHP)	05
I.2.1. Inhibiteurs des canaux calciques (ICa ⁺⁺)	05
I.2.2. Activité antituberculeuse	05
I.2.3. Activité anticancéreuse	06
I.2.4. Activité antioxydante	06
I.2.5. Activité antidyslipidémique	07
I.2.6. Activités analgésique anti-inflammatoire	08
I.2.7. Activité anti-ulcère	09
I.3. La synthèse originelle des 1,4-dihydropyridines	09
I.4. Synthèses des molécules à tester	10
Références	12
Chapitre II : Généralités sur le stress oxydatif	
II. Activité anti-oxydante	15
II.1. Introduction	15
II.2. Les radicaux libres	15
II.2.1. Définition	15
II.2.2. Nature et sources des radicaux libres	15
II.2.3. Les différents types des radicaux libres	16
II.2.3.1. Espèces réactives oxydantes radicalaires	16
II.2.3.1.1. Anion superoxyde O ₂ ⁻	16
II.2.3.1.2. Radical libre hydroxyle (.OH)	16
II.2.3.1.3. Le monoxyde d'azote (NO•)	17
II.2.3.2. Espèces réactives d'oxygènes non radicalaires	17
II.2.3.2.1. Oxygène singulet (¹ O ₂)	17
II.2.3.2.2. Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	17
II.2.3.2.3. Le peroxydinitrite NO ₃ ⁻	18
a) L'acide hypochloreux HOCl	18
II.2.4. Rôles physiologiques des radicaux libres	18
II.2.4.1. Le stress oxydant	18
II.2.4.1.1. Définition	18
II.2.4.2. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif	19
II.2.4.2.1. Lipides (Peroxydation lipidique)	19
II.2.4.2.2. Protéines (oxydation protéique)	19
II.2.4.2.3. Dommages oxydatifs de l'ADN	20
II.2.4.2.4. Cibles glucidiques du stress oxydant	20
II.2.5. Les antioxydants	20
II.2.5.1. Définition des antioxydants	20
II.2.5.2. Classification et mécanismes d'action des antioxydants	21
II.2.5.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques	21
✓ Les Superoxydes Dismutases (SOD)	21
✓ La catalase	22
✓ La glutathion peroxydase (GPX)	22
✓ L'hème oxygénase	23
✓ Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR)	23
II.2.5.2.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques	24
✓ Glutathion	24

✓ Acide Urique	24
✓ Les protéines de stockage des métaux de transition	24
✓ Les vitamines	24
➤ La vitamine E	24
➤ La vitamine C	25
✓ Les caroténoïdes	25
✓ Les polyphénols	25
✓ Taurine	25
✓ Oligo-éléments	26
✓ Minéraux	26
II.2.6. Les maladies liées au stress oxydatif	26
Références	28
Chapitre III : Résultats et discussion	
III.1. Objectif du travail	30
III.2. Résultats et discussion	31
III.2.1. Test de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	31
III.2.2. Test de piégeage du radical-cation ABTS ^{•+}	32
III.2.3. Test de de pouvoir réducteur (FRAP)	33
Références	35
Chapitre IV : Partie expérimentale	
IV.1. Matériels utilisés	36
✓ Solvants et réactifs utilisés	36
✓ Molécules à tester	36
✓ Appareillage	36
a) Spectrométrie UV-visible	36
IV.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	38
IV.2.1. Préparation des solutions des produits à tester	38
IV.2.2. Test DPPH	39
IV.2.2.1. Principe du test	39
IV.2.2.2. Mode opératoire	40
IV.2.3. Test ABTS	40
IV.2.3.1. Principe du test	40
IV.2.3.2. Mode opératoire	41
IV.2.4. Test du pouvoir réducteur (PRAP)	41
IV.2.4.1. Principe du test	41
IV.2.4.2. Mode opératoire	41
Références	43
Conclusion générale	
	44
Résumés	

Introduction

Générale

Introduction

La découverte de nouvelles réactions, capables de former plusieurs liaisons, en une seule étape, avec de bons rendements globaux, tout en respectant l'environnement, est donc devenue un défi important pour le chimiste. Ainsi, les réactions multi composants (MCRs) qui répondent à l'ensemble de ces critères, jouent un rôle innovateur et font l'objet d'une attention toute particulière, ainsi constitue un excellent outil de synthèse pour répondre à cette attente.^[1]

Les réactions multi-composantes sont définies comme étant des processus permettant d'assembler, dans un seul pot, one-pot en anglais (qui veut dire dans le même réacteur), au moins trois réactifs qui vont participer à la structure du produit final. Ces réactions sont des procédés très efficaces qui réunissent la rapidité, la diversité et la complexité structurale. Lorsque de telles réactions permettent de combiner des produits de départ majoritairement commerciaux ou aisément accessibles, elles deviennent de bons outils pour les industries pharmaceutiques, afin de créer des chimiothèques destinées au criblage à haut débit.

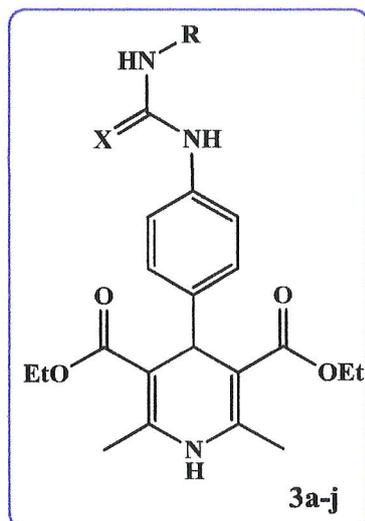
La première MCR est attribuée à Strecker qui, en 1850, a réalisé la synthèse d' α -amino-acides. En 1882, la synthèse effectuée par Hantzsch de 1,4-dihydropyridines lors d'une réaction entre deux molécules de β -céto-ester et un aldéhyde dans l'ammoniaque, est considérée comme la première synthèse multi composant d'hétérocycles, et a fait l'objet de nombreuses études.^[2]

La dihydropyridine est un motif structural appartenant aux hétérocycles à six chaînons dont l'atome d'azote occupe l'un des sommets. C'est une substance synthétique qui a trouvé son application dans divers domaines tels la biologie, la médecine...etc.^[3, 4]

Après la synthèse de Hantzsch, les études pharmacologiques ont montré que la dihydropyridine et ses dérivés possèdent le pouvoir de contrôler l'influx de calcium aux cellules, ce qui a amené à les utiliser dans le traitement de l'hypertension artérielle et les angines de poitrine.^[5,6] Récemment, d'autres activités pharmacologiques, qui n'ont pas un rapport avec les canaux calciques, ont été prouvées : il s'agit de propriété anti-amnésique, anti-convulsant, antidiabétique, anti-inflammatoire, anti-oxydante ...etc.^[7]

En plus de leur importance biologique, ils sont également des partenaires clés largement utilisés en synthèse organique comme intermédiaires dans plusieurs réactions d'oxydation, de réduction, d'alkylation ...etc.^[8]

Le présent travail a comme objet l'évaluation de l'activité anti-oxydante de quelques 1,4-dihydropyridines portant des fragments urée et thiourée sur le groupe phényle en position 4 de l'hétérocycle (Figure In.1).



X= O, S
R= aryle ou alkyle

Figure In.1. Structure générale des composés faisant l'objet du présent travail.

Une des étapes clé de synthèse de ces molécules est la réaction multi composant de Hantzsch, dont nous avons montré l'importance ci-dessus. Ces molécules 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 SmailKhelili. En effet, elles font partie de son travail de thèse et il les a évalués sur d'autres modèles biologiques, lors duquel elles ont montré une activité vasodilatatrice très marquée (Article soumis au 'ChemicalPapers').

Le présent mémoire, qui commence par une introduction générale, est organisé en quatre chapitres. Le chapitre I comporte les données de la littérature concernant les 1,4-dihydropyridines, incluant leurs propriétés pharmacologiques et la méthode de synthèse des composés faisant l'objet de ce travail. Puisque l'objet de ce travail est la détermination de l'activité anti-oxydante de composés cités ci-dessus, le chapitre II a été consacré à rappel bibliographique sur le stress oxydatif, les espèces réactives de l'oxygène et sur les antioxydants naturels et synthétiques. Le chapitre III comporte les résultats obtenus et leur discussion et finit par une conclusion. Le chapitre IV inclue la partie expérimentale qui décrit le matériel et les méthodes utilisées et les protocoles expérimentaux appliqués. Le Manuscrit est clôturé par une conclusion générale et des résumés en arabe, français et anglais.

Références

- [1] Kadam, A., Zhang, Z., & Zhang, W. (2011). Microwave-assisted fluororous multicomponent reactions-A combinatorial chemistry approach for green organic synthesis. *Current Organic Synthesis*, 8(2), 295-309.
- [2] Hantzsch, A. (1882). Ueber die synthese pyridinartiger verbindungen aus acetessigäther und aldehydammoniak. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 215(1), 1-82.
- [3] Hamimed, S. (2009). Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d'Anacyclus pyrethrum L. *Mémoire de Magister en chimie organique, Université Mentouri Constantine, Algérie*, 66-89.
- [4] Angelico P, Guarneri L, Leonardi A, Testa R. (1999). Vascular- selective effect of lercanidipine and other 1, 4- dihydropyridines in isolated rabbit tissues. *J. Pharm. Pharmacol.* 51:709-714.
- [5] Alam, O., Khan, S. A., Siddiqui, N., Ahsan, W., Verma, S. P., & Gilani, S. J. (2010). Antihypertensive activity of newer 1, 4-dihydro-5-pyrimidine carboxamides: Synthesis and pharmacological evaluation. *European journal of medicinal chemistry*, 45(11), 5113-5119.
- [6] Schon, C. A., Wang, G. Z., Viet, A. Q., Goodman, K. B., Dowdell, S. E., Elkins, P. A., ... & Dul, E. (2008). Potent, selective and orally bioavailable dihydropyrimidine inhibitors of Rho kinase (ROCK1) as potential therapeutic agents for cardiovascular diseases. *Journal of medicinal chemistry*, 51(21), 6631-6634.
- [7] Vivekanand B. Jadhav, Harish V. Holla, Sunil U. Tekalea and Rajendra P. (2012). Pawarc, *Der Chemica Sinica*, 3(5):1213-1228.
- [8] Heravi, M. M., Oskooie, H. A., Malakooti, R., Alimadadi, B., Alinejad, H., & Behbahani, F. K. (2009). Oxidative aromatization of Hantzsch 1, 4-dihydropyridines in the presence of a catalytic amount of Mn (pbdo) 2Cl2/MCM-41 or Mn (pbdo) 2Cl2/Al-MCM-41 as reusable and green catalysts. *Catalysis Communications*, 10(6), 819-822.

Chapitre I

Généralités sur les DHPs

I.1. Introduction

Parmi les différents isomères de la dihydropyridine, les dérivés 1,4-dihydropyridines méritent une attention spéciale, non seulement pour leurs propriétés chimiques mais particulièrement pour leur importance pharmacologique croissante. La diludine, le foridone, le cérébrocrast et la glutapyrone sont des substances représentatives de l'utilisation des dérivés du 1,4-dihydro-2,6-diméthylpyridine-3,5-dicarboxylate de diéthyle dans le domaine médical.^[1] Le diludine est un antioxydant.^[2] Vu ses propriétés radio-protectives, il est couramment utilisé pour diminuer les effets secondaires de la radiothérapie dans le traitement des maladies cancéreuses (Figure I.1).^[3-4]

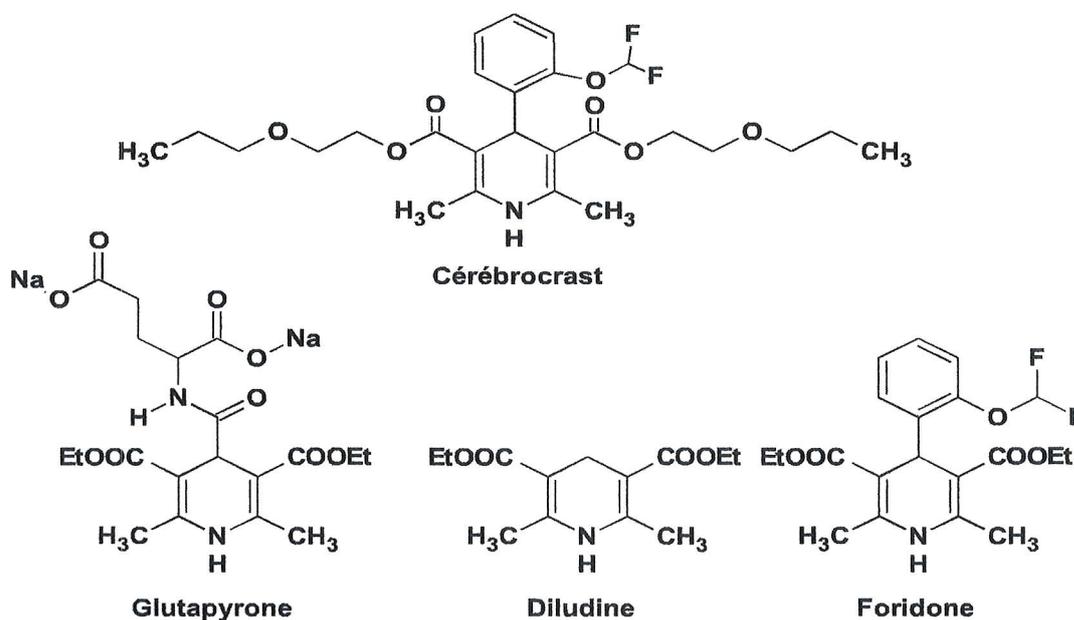


Figure I.1. Structures de quelques 1,4-dihydropyridines d'intérêt biologique.

Le foridone (riodipine) est un anti-hypertensif, anti-angine, utilisé plus particulièrement quand les maladies cardiovasculaires s'accompagnent d'asthme et d'hypertension pulmonaire.^[5]

Le cérébrocrast est un nouveau composé très actif. Il a un effet neurotrophique (anti-amnésique), anti-hypoxique, antidiabétique, et anti-inflammatoire.^[6]

La glutapyrone, sel de sodium de l'acide 2-(2,6-diméthyl-3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine-4-carboxamide glutarique, possède une large variété d'activités biologiques (neuromodulateur, neurorégulateur, anti-convulsant et anti-arythmique).^[7]

Guidé par l'intérêt thérapeutique de cette nouvelle classe de molécules (DHP), les chercheurs ont synthétisé de nouvelles structures qui ont été utilisées comme médicaments

vitaux dans le traitement des maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, l'angine de poitrine et l'arythmie cardiaque.^[8]

I.2. Intérêts biologiques des dihydropyridines (DHP)

I.2.1. Inhibiteurs des canaux calciques (ICa⁺⁺)

Les 1,4-dihydropyridines sont des inhibiteurs calciques ou antagonistes du calcium, des médicaments qui permettent d'inhiber le transfert membranaire du calcium dans les cellules musculaires cardiaques et les cellules musculaires vasculaires. Ils diminuent les résistances périphériques vasculaires et la consommation en oxygène du myocarde (Figure I.2).^[9]

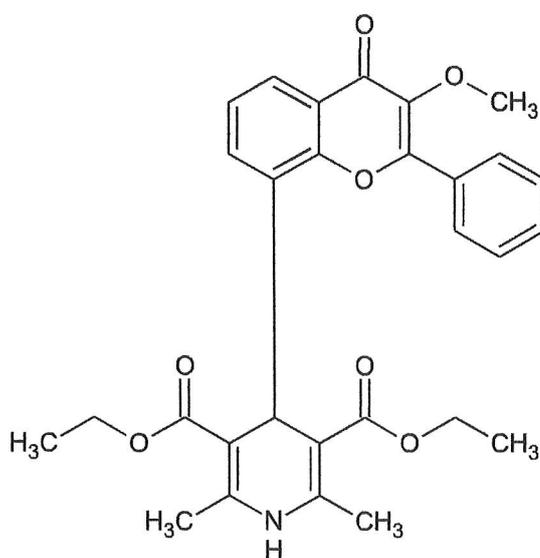


Figure I.2. Exemple de 1,4-Dihydropyridines Inhibiteurs des canaux calciques.

I.2.2. Activité antituberculeuse

Des séries de 1, 4-dihydropyridines non substituées symétriques et asymétriques ont été étudiées pour une activité antituberculeuse ^[10]. Comme exemple, on peut citer ceux de la figure I.3. ^[10]

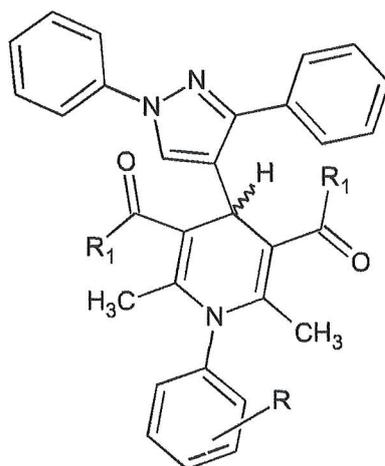


Figure I.3. Structure générale d'agents antituberculeux à base 1,4-dihydropyridine.^[10]

I.2.3. Activité anticancéreuse

On retrouve dans la littérature de nombreuses molécules permettant de contrôler les cellules tumorales. Parmi ces molécules on retrouve les dérivés de 1,4-dihydropyridine. En effet, on peut citer comme exemple les travaux de Kazuo Ohishi et al. qui ont montré l'effet intéressant de AC394 qui potentialise l'effet anti-tumoral et anti-métastatique de l'adriamycine dans le cas du cancer du côlon chez la souris (Figure I.4).^[11]

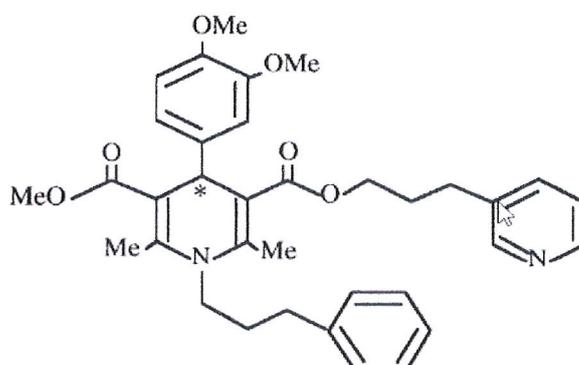


Figure I.4. Structure chimique du AC394.

I.2.4. Activité anti-oxydante

Dans ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés anti-oxydantes. Le fragment 1,4-dihydropyridine et très souvent été étudié pour leur capacité anti-oxydante. Rathinam Ramesh et al. ont synthétisé une série de 2,6-diamino-4-aryl-1-propyle/cyclohexyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarbonitrile en utilisant la condensation de Hantzsch à trois composés, le malononitrile et diverses aldéhydes et amines (Figure I.5).^[12]

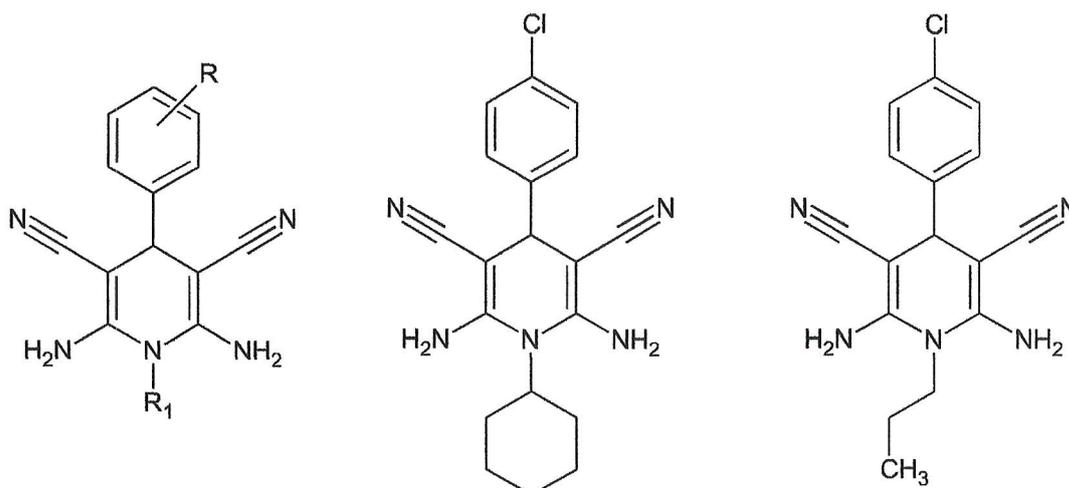


Figure I.5. Structure chimique de quelques agents antioxydant à base du noyau dihydropyridine.

Les composés ont été évalués comme des anti-oxydants *in vitro* en utilisant la technique de piégeage des radicaux DPPH. Certains des composés testés sont montrés une propriété antioxydant remarquable en particulier les composés contenant un halogène. Parmi les composés testés, les deux molécules A et B présentent une bonne activité antioxydant plus proche du médicament standard (Acide ascorbique), qui peut être attribuée à la présence d'un fragment de chlore sur le noyau aryle.^[12]

I.2.5. Activité antidyslipidémique

AtulKumar et al. ont synthétisé des N-aryl-1,4-dihydropyridines et les ont criblés pour leur éventuelle activité antidyslipidémique. Certains d'entre eux ont présenté une antidyslipidémique activité prometteuse [abaissement des lipides et des et des triglycerides (TG)] *in vivo* et *in vitro* (Figure I.6).^[13]

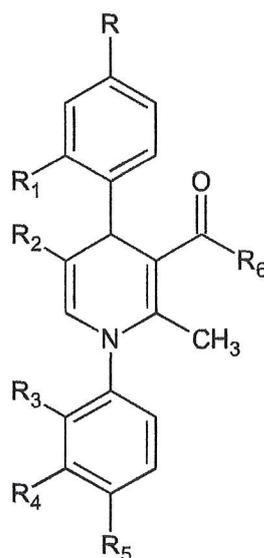


Figure I.6. Structure générale de 1,4-dihydropyridines possédant activité anti-dyslipidémique.

I.2.6. Activités analgésique anti-inflammatoire

Shrikanth Ulloora et al. ont synthétisé une série de 1,4-dihydropyridin-4-yl-phenoxyacetohydrazones et ont évalué leur propriétés pharmacologiques (Figure I.7).^[14] La plus part des composés décrits dans cette étude ont présenté des activités analgésique anti-inflammatoire très significatives.

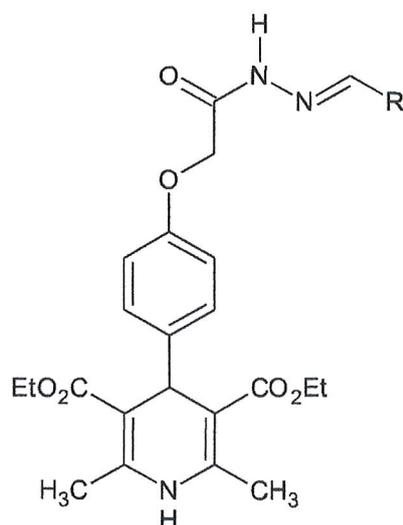


Figure I.7. Structure générale de 1,4-dihydropyridin-4-yl-phenoxyacetohydrazones dotés d'activités analgésique anti-inflammatoire.



I.2.7. Activité anti-ulcère

Subudhi et al. ont décrits des 1,4-dihydropyridines et leur de bases de Mannich avec le sulfanilamide dotées d'une bonne activité anti-ulcère (Figure I.8).^[15]

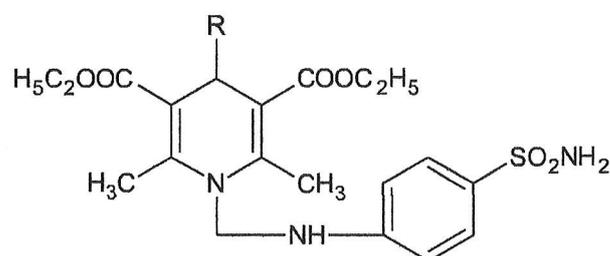


Figure I.8. Structure générale bases de Mannich de 1, 4-dihydropyridines avec le sulfanilamide.

I.3. La synthèse originale des 1,4-dihydropyridines (Réaction de Hantzsch, 1882)

La première dihydropyridine (ou esters de Hantzsch) a été synthétisée pour la première fois par Arthur Hantzsch en 1882, où il a préparé le 1,4-dihydro-2,6-diméthylpyridine-3,5-dicarboxylate de diéthyle.^[16] Cette réaction implique une condensation d'un aldéhyde (1 molécule), un dérivé 1,3 dicarbonylé (acéto-acétate d'éthyle, 2 molécules) et l'ammoniac (1 molécule) dans l'acide acétique ou dans l'éthanol à reflux pendant quelques heures. Cependant, les rendements des 1,4-DHPs obtenues par cette méthode étaient généralement bas (Schéma III.1).

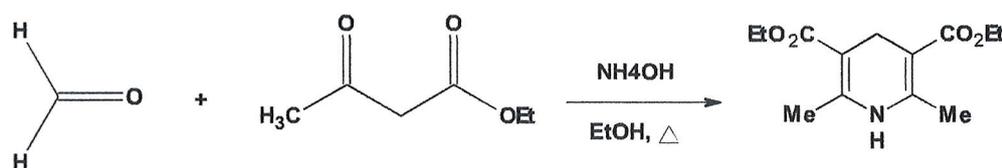


Schéma I.1. Réaction originale de Hantzsch pour la synthèse des 1,4-dihydropyridines.

À nos jours, la synthèse de Hantzsch est considérée comme la méthode la plus simple et la plus utilisée pour l'accès à de larges bibliothèques de 1,4-dihydropyridines (1,4-DHPs) en faisant intervenir différents aldéhydes et différents composés dicarbonylés à méthylène activé, et en utilisant différents catalyseurs qui sont de plus en plus performants.

Ces catalyseurs sont de natures variables comme les acides de Lewis, Les bases de Lewis, Les supports solides, les heteropolyacides, les liquides ioniques, les micro-ondes et l'ultra-son.^{[17-}

28]

I.4. Synthèses 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 III.2 ci-dessous. 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 fournit le composé **1**. La deuxième 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 l'amine **2**. La dernière étape qui fournit les composés à tester **3a-j**, l'amine **2** réagit avec divers isocyanate ou isothiocyanate aryle ou d'alkyle dans le dichlorométhane (CH_2Cl_2) comme solvant à température ambiante.

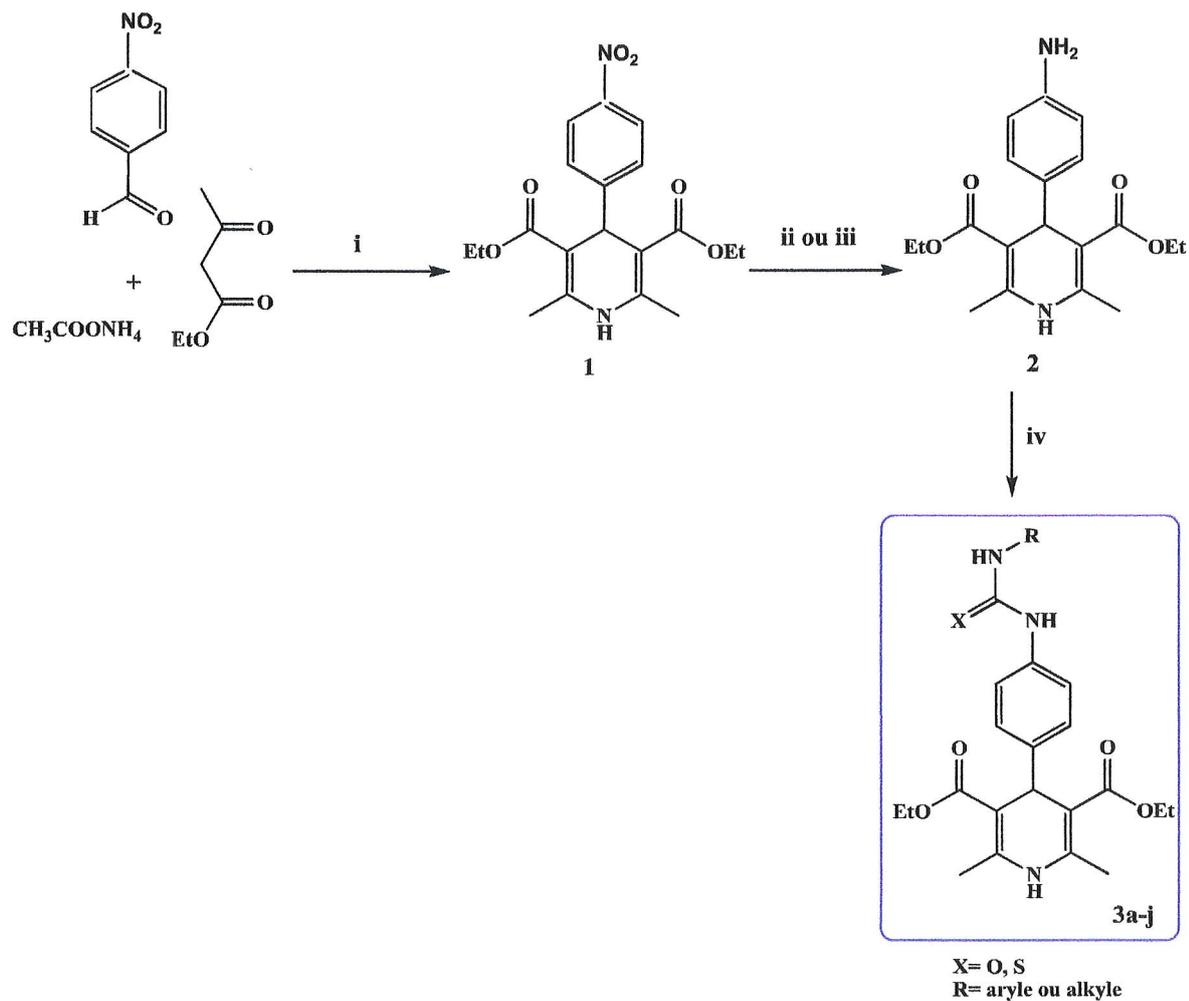


Schéma I.2. Schéma de synthèse de molécules à tester. Réactifs : (i)= $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$, EtOH à reflux ; (ii)= H_2 (10 bars), Pd/C (5%), Méthanol, 65°C ou (iii) Pd/C (5%), HCOONH_4 , EtOH à reflux ; (iv) RNCO ou RNCS, CH_2Cl_2 , température ambiante.

Références

- [1] Sobolev, A., & Duburs, G. (2003). Enantioselective synthesis of 1, 4-dihydropyridine derivatives using lipases. *Chemicke Listy*, 97, 376-376.
- [2] Sapkal, S. B., Shelke, K. F., Shingate, B. B., & Shingare, M. S. (2009). Nickel nanoparticle-catalyzed facile and efficient one-pot synthesis of polyhydroquinoline derivatives via Hantzsch condensation under solvent-free conditions. *Tetrahedron Letters*, 50(15), 1754-1756.
- [3] Yeh, J.L., Liang, J.C., Liou, S.F., Lin, Y.T., Sheu, S.H., Lai, W.T., Shin, S.J. (2003). Chen, I.J. *Drug Dev. Res.* 59, 309.
- [4] Ouellet, S. G., Tuttle, J. B., & MacMillan, D. W. (2005). Enantioselective organocatalytic hydride reduction. *Journal of the American Chemical Society*, 127(1), 32-33.
- [5] Hilgeroth, A., Billich, A., & Lilie, H. (2001). Synthesis and biological evaluation of first N-alkyl syn dimeric 4-aryl-1, 4-dihydropyridines as competitive HIV-1 protease inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 36(4), 367-374.
- [6] Sridharan, V., Perumal, P. T., Avendano, C., & Menendez, J. C. (2007). A new three-component domino synthesis of 1, 4-dihydropyridines. *Tetrahedron*, 63(21), 4407-4413.
- [7] Bhavik, B., Dinesh, D., Yogesh, Y., Anamik, A., Anil A. K. (2001). *Bioorg .Med .Chem*, 9(8), 1993.
- [8] Sabitha, G., Reddy, G. K. K., Reddy, C. S., & Yadav, J. S. (2003). A novel TMSI-mediated synthesis of Hantzsch 1, 4-dihydropyridines at ambient temperature. *Tetrahedron Letters*, 44(21), 4129-4131.
- [9] Budriesi, R., Bisi, A., Ioan, P., Rampa, A., Gobbi, S., Belluti, F., ... & Chiarini, A. (2005). 1, 4-Dihydropyridine derivatives as calcium channel modulators: the role of 3-methoxy-flavone moiety. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(10), 3423-3430.
- [10] Trivedi, A. R., Dodiya, D. K., Dholariya, B. H., Kataria, V. B., Bhuva, V. R., & Shah, V. H. (2011). Synthesis and biological evaluation of some novel N-aryl-1, 4-dihydropyridines as potential antitubercular agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(18), 5181-5183.
- [11] Ohishi, K., Morinaga, Y., Ohsumi, K., Nakagawa, R., Suga, Y., Tsuji, T., & Tsuruo, T. (1996). Potentiation of antitumor and antimetastatic activities of adriamycin by a novel N-alkylated dihydropyridine, AC394, and its enantiomers in colon cancer-bearing mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 38(5), 446-452.

- [12] Ramesh, R.; Maheswari, S.; Murugesan, S.; Sandhiya, R.; Lalitha, A. (2015). Catalyst-free one-pot synthesis and antioxidant evaluation of highly functionalized novel 1, 4-dihydropyridine derivatives. *Research on Chemical Intermediates*, 41, 8233-8243.
- [13] Kumar, A., Maurya, R. A., Sharma, S., Kumar, M., & Bhatia, G. (2010). Synthesis and biological evaluation of N-aryl-1, 4-dihydropyridines as novel antidyslipidemic and antioxidant agents. *European journal of medicinal chemistry*, 45(2), 501-509.
- [14] Ulloora, S., Shabaraya, R., Ranganathan, R., & Adhikari, A. V. (2013). Synthesis, anticonvulsant and anti-inflammatory studies of new 1, 4-dihydropyridin-4-yl-phenoxyacetohydrazones. *European journal of medicinal chemistry*, 70, 341-349.
- [15] Subudhi, B. B., Panda, P. K., & Bhatta, D. (2009). Synthesis and antiulcer activity study of 1, 4-dihydropyridines and their Mannich bases with sulfanilamide, *Indian journal of Chemistry*, 48B.725-728.
- [16] Lee, J. H. (2005). Synthesis of Hantzsch 1, 4-dihydropyridines by fermenting bakers' yeast. *Tetrahedron letters*, 46(43), 7329-7330.
- [17] Debache, A., Boulcina, R., Belfaitah, A., Rhouati, S., & Carboni, B. (2008). One-pot synthesis of 1, 4-dihydropyridines via a phenylboronic acid catalyzed Hantzsch three-component reaction. *Synlett*, 2008(04), 509-512.
- [18] Ramesh, C., Mahender, G., Ravindranath, N., & Das, B. (2003). A simple, mild and efficient procedure for selective cleavage of prenyl esters using silica-supported sodium hydrogen sulphate as a heterogenous catalyst. *Tetrahedron letters*, 44(7), 1465-1467.
- [19] Breton, G. W. (1997). Selective monoacetylation of unsymmetrical diols catalyzed by silica gel-supported sodium hydrogen sulfate. *The Journal of Organic Chemistry*, 62(25), 8952-8954.
- [20] Chari, M. A., & Syamasundar, K. (2005). Silica gel/NaHSO₄ catalyzed one-pot synthesis of Hantzsch 1, 4-dihydropyridines at ambient temperature. *Catalysis Communications*, 6(9), 624-626.
- [21] Maheswara, M., Siddaiah, V., Rao, Y. K., Tzeng, Y. M., & Sridhar, C. (2006). A simple and efficient one-pot synthesis of 1, 4-dihydropyridines using heterogeneous catalyst under solvent-free conditions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 260(1-2), 179-180.
- [22] Antonyraj, C.A., Kannan, S. (2008). *Applied Catalysis A: General*, 338,121.
- [23] Okuhara, T., Mizuno, N., & Misono, M. (1998). *Adv. Catal.* 1996, 41, 113. e) R. Neumann. *Prog. Inorg. Chem*, 47, 317.
- [24] Heravi, M. M., Bakhtiari, K., Javadi, N. M., Bamoharram, F. F., Saeedi, M., & Oskooie, H. A. (2007). K₇ [PW₁₁CoO₄₀]-catalyzed one-pot synthesis of polyhydroquinoline

derivatives via the Hantzsch three component condensation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 264(1-2), 50-52.

[25] Ming, L., Guo, W. S., Wen, L. R., Li, Y. F., & Yang, H. Z. (2006). One-pot synthesis of Biginelli and Hantzsch products catalyzed by non-toxic ionic liquid (BMImSac) and structural determination of two products. *Journal of Molecular Catalysis A-Chemical*, 258(1-2), 133-138.

[26] Legeay, J. C., Eynde, J. J. V., & Bazureau, J. P. (2005). Ionic liquid phase technology supported the three component synthesis of Hantzsch 1, 4-dihydropyridines and Biginelli 3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-ones under microwave dielectric heating. *Tetrahedron*, 61(52), 12386-12397.

[27] Nagarapu, L., Kumari, M. D., Kumari, N. V., & Kantevari, S. (2007). MCM-41 catalyzed rapid and efficient one-pot synthesis of polyhydroquinolines via the Hantzsch reaction under solvent-free conditions. *Catalysis Communications*, 8(12), 1871-1875.

[28] Ko, S., Sastry, M. N. V., Lin, C., & Yao, C. F. (2005). Molecular iodine-catalyzed one-pot synthesis of 4-substituted-1, 4-dihydropyridine derivatives via Hantzsch reaction. *Tetrahedron Letters*, 46(34), 5771-5774.

II. Activité anti-oxydante

II.1. Introduction

Les radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (EROs), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers aux professionnels de la santé et même pour le grand public. De nombreux travaux ont démontré que notre organisme produit EROs dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants. Par ailleurs, plusieurs méthodes ont été adaptées pour évaluer et mesurer les dommages oxydatifs causés aux lipides, à l'ADN et aux protéines, afin d'identifier les sources génératrices de stress oxydant, et de déterminer les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.^[1]

II.2. Les radicaux libres

II.2.1. Définition

Un radical libre (RL) est une entité chimique (atome, ion, molécule, fragment de molécule) capable d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron libre sur sa couche externe, augmentant considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation. Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelque nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (Exemple : $\cdot\text{OH}$).^[2]

Les radicaux libres peuvent être formés par trois procédés :

- ✓ Addition d'un électron libre à un non radical.
- ✓ Perte d'un électron par un non radical.
- ✓ Scission homolytique d'une liaison covalente.

II.2.2. Nature et sources des radicaux libres

Le radical libre le plus simple est l'atome d'hydrogène avec un proton et un électron unique. Les radicaux libres peuvent également être des radicaux centrés d'oxygène, d'azote ou de carbone. Les radicaux qui endommagent les systèmes biologiques sont, en particulier, des radicaux libres d'oxygène, plus connus sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène ou (EROs) (en anglais : Reactive Oxygen Species ou ROS). Ils sont les principaux sous-produits formés dans les cellules aérobies, et peuvent initier des réactions auto-catalytiques de sorte que les molécules auxquelles elles réagissent, elles-mêmes soient converties en radicaux libres pour propager la chaîne des dommages.^[2]

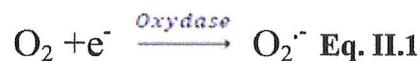
La principale source des radicaux $O_2^{\cdot -}$ et H_2O_2 , pendant le métabolisme énergétique cellulaire, est la chaîne respiratoire. Les mitochondries ont été identifiées comme responsables de l'initiation de la plupart des réactions des radicaux libres se produisant dans les cellules. Il y a également d'autres sources cellulaires des radicaux libres telles que l'enzyme xanthine oxydase (qui catalyse la réaction de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique), le cytochrome P450, les peroxysomes, les microsomes et les macrophages au cours de l'inflammation. Les ROS peuvent aussi être produits par une multitude de sources exogènes telles que les xénobiotiques, les composés chlorés, les agents environnementaux, les métaux (redox et non redox), les ions et les rayonnements.^[3]

II.2.3. Les différents types des radicaux libres

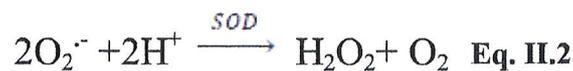
II.2.3.1. Espèces réactives oxydantes radicalaires

II.2.3.1.1. Anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$

C'est l'une des premières espèces oxydantes radicalaires (EOR) à être formées, par réduction d'une molécule d' O_2 (Eq. II.1).^[3,4]



Sa demi-vie longue comparée aux autres EOR est contrebalancée par le fait que les membranes biologiques lui sont relativement imperméables ; il reste ainsi moyennement dangereux. Il peut conduire à la formation de H_2O_2 (Eq. II.2).

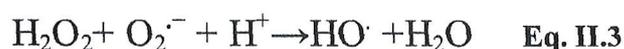


Cette réaction peut être bénéfique comme délétère pour l'organisme :

- ✓ bénéfique car on passe d'une espèce très oxydante –(le radical superoxyde) à une espèce moins oxydante (H_2O_2) ; c'est d'ailleurs l'étape catalysée par une enzyme antioxydante la Superoxyde Dismutase (SOD).
- ✓ délétère car le H_2O_2 peut être à l'origine d'autres EOR, par la réaction de Fenton catalysée par les ions de fer ou de cuivre.

II.2.3.1.2. Radical libre hydroxyle ($\cdot OH$)

C'est le radical le plus dangereux dans l'organisme car il est toxique. Il est formé lors de la réaction de l'anion superoxyde avec le peroxyde d'hydrogène (Eq. II.3), ou par réaction de ce dernier avec les ions ferreux (Eq. II.4). Il joue un rôle dans l'auto oxydation lipidiques.^[3, 4]

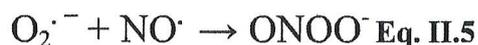




II.2.3.1.3. Le monoxyde d'azote (NO•)

Le monoxyde d'azote (NO•), une espèce réactive d'azote (an anglais reactive nitrogen species ou RNS), est produit de manière endogène à partir de la L-arginine, de l'oxygène et du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) par plusieurs enzymes d'oxyde nitrique synthèse (NOS) en réponse à un certain nombre de stimulus physiologiques. Le NO• est une espèce très réactives, il représente le messenger moléculaire idéal, il est impliqué dans le règlement d'un certain nombre de fonctions y compris la tension artérielle, phagocytes et l'activité antimicrobienne, homéostasie endothéliale et neuronale, adhérence de plaquette et de leucocyte, et l'induction de l'apoptose. ^[3, 4]

La génération spontanée de l'O₂•⁻ et de radical NO• favorise la formation de peroxynitrite (Eq. II.5) qui est un produit très toxique, un RNS lui-même capable d'induire la peroxydation lipidique et la nitration de protéine. ^[3, 4]



II.2.3.1.4. Les radicaux alkyles R•, alkoxyes RO• et peroxyes ROO•

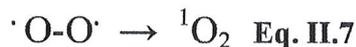
L'oxydation de la membrane cellulaire par le radical hydroxyle conduit à la formation de radicaux peroxyes ROO•. La dégradation de ces derniers suivant la réaction de Fenton conduit à la formation de radicaux alkoxyes hautement réactifs (Eq. II.6). ^[3, 4]



II.2.3.2. Espèces réactives d'oxygènes non radicalaires

II.2.3.2.1. Oxygène singulet (¹O₂)

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente sa forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde (Eq. II.7). ^[5]



II.2.3.2.2. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

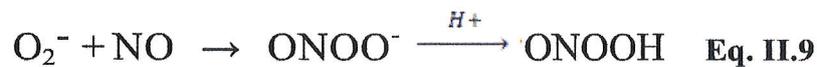
Il est relativement stable, possède une demi-vie longue, et les membranes biologiques lui sont perméables. Il est peu dangereux en soi pour la cellule, mais il constitue la source du radical hydroxyl HO•, qui est plus toxique, à travers la réaction de Fenton (Eq.

II.4). Certains auteurs préfèrent alors considérer la réaction de l'anion superoxyde avec le H_2O_2 , catalysée par un ion métallique tel que le fer ; cette réaction est appelée réaction d'Haber-Weiss (Eq. II.8).^[5]



II.2.3.2.3. Le peroxydinitrite NO_3^-

Son apparition est extrêmement rapide, et se produit par une réaction entre deux EOR produites très vite au cours du processus de stress oxydant (Eq. II.9).^[5]



A l'instar du radical hydroxyle, NO_3^- est une EOR qui cause beaucoup de dommages aux composants cellulaires.^[5]

a) L'acide hypochloreux HOCl

Essentiellement produit par les myeloperoxydases (MPO) leucocytaires à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ion chlorure (Eq. II.10).^[5]



II.2.4. Rôles physiologiques des radicaux libres

Les radicaux libres constituent des espèces chimiques dangereuses, capables d'engendrer un nombre important de maladies. Cependant ces espèces sont indispensables à la vie, ils remplissent de très nombreuses fonctions cellulaires.

Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, la transduction de signaux cellulaires, la défense immunitaire contre les agents pathogènes, la destruction par apoptose des cellules tumorales, la régulation de la dilatation capillaire, le fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, la fécondation de l'ovule et la régulation des gènes.^[6]

II.2.4.1. Le stress oxydant

II.2.4.1.1. Définition

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des EROs et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination.^[7] Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par

l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants.^[8] L'équilibre ou homéostasie redox est perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les ERO.

II.2.4.2. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes des molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides.^[9] Les principales cibles radicalaires sont :

II.2.4.2.1. Lipides (Peroxydation lipidique)

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, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonalaldéhyde (MDA) ou l'hydroxynonéal. Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutit à la formation de lipoprotéines de densité légère (LDL) oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, alors que l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux.^[9]

II.2.4.2.2. Protéines (oxydation protéique)

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 à leur activité biologique (activité enzymatique, transduction d'un signal ou système de transport).^[10]

II.2.4.2.3. Dommages oxydatifs de l'ADN

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des ROS. Les radicaux $O_2^{\cdot -}$ et $\cdot OH$ provoquent des lésions de l'ADN. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont pas réparées entraînent à long terme des altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations, délétions, et amplifications, à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (Figure II.1).^[11]

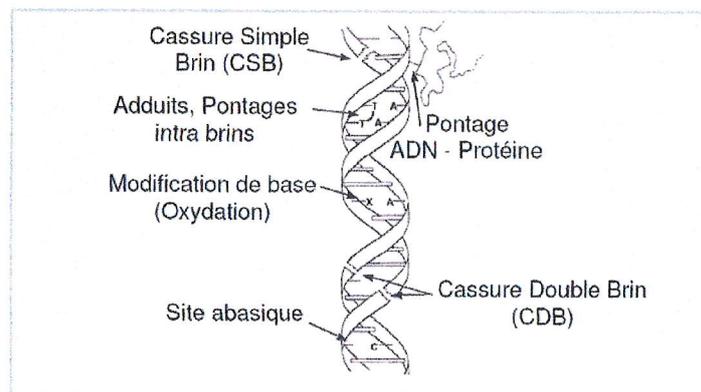


Figure II.1. Les différents dommages à l'ADN provoqués par le stress oxydant.

II.2.4.2.4. Cibles glucidiques du stress oxydant

Les EROs agissent essentiellement sur le glucose et sur les protéoglycanes (présents en grande quantité dans les cartilages). L'oxydation du glucose (ou glyuco-oxydation) s'effectue par deux mécanismes qui aboutissent tous deux à la formation de produits finaux de glycosylation (PFG).^[12]

- ✓ Oxydation *stricto sensu* (au sens strict) du glucose en dérivés carbonylés qui donnent des PFG en réagissant avec une protéine;
- ✓ Glycosylation non enzymatique des protéines (réaction de Maillard), résultant de la formation d'une liaison covalente entre un ose et des groupements aminés libres d'une protéine aboutissant à la formation de PFG, après attaque de cette protéine glyquée par des EOR ($\cdot OH$ et $NO_3^{\cdot -}$ surtout).

II.2.5. Les antioxydants

II.2.5.1. Définition des antioxydants

La production des RLs est régulée par notre organisme qui a développé des moyens de défense antioxydants qui protègent contre les effets potentiellement destructeurs des RLs. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement

faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats.^[13]

Un antioxydant idéal devrait être aisément absorbé et éteindre des RLs, et chélate les métaux aux niveaux physiologique appropriés. Quelques antioxydants peuvent agir l'un sur l'autre avec d'autres antioxydants régénérant leurs propriétés originales. Ce mécanisme désigné souvent sous le nom du 'réseau antioxydant'.^[14]

II.2.5.2. Classification et mécanismes d'action des antioxydants

II.2.5.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Pour contrôler la production permanente des ROS, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages des ROS. Ces défenses permettent de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux basal (homéostasie physiologique). En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ROS, avec lesquelles elles réagissent très pour les neutraliser rapidement.^[15]

✓ Les Superoxydes Dismutases (SOD)

Ce sont des métallo-enzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde. Cette réaction chimique catalysée par la SOD nécessite un milieu acide et va permettre d'agir simultanément avec 2 anions superoxydes aboutissant à la formation de dioxygène et de peroxyde d'hydrogène.

(Eq. II.11):



Elles sont présentes dans la majorité des organismes vivants et chez les eucaryotes, ce sont des enzymes ubiquitaires. Il existe plusieurs superoxydes dismutases (SOD) qui diffèrent par leur cofacteur (Manganèse, Cuivre ou Zinc), leur structure et leur localisation cellulaire.^[15]

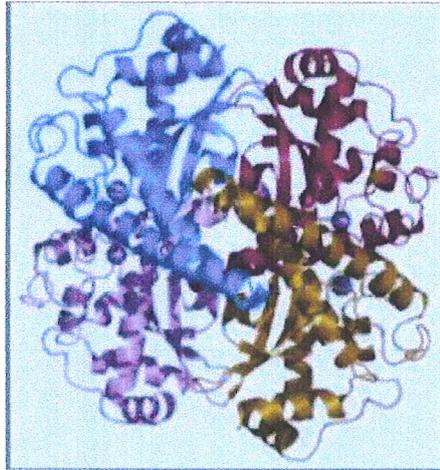


Figure II.2. Structure tridimensionnelle du superoxyde dismutase.

✓ **La catalase**

C'est une enzyme que l'on retrouve principalement au sein des peroxysomes, dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales (Figure II.3).^[15]

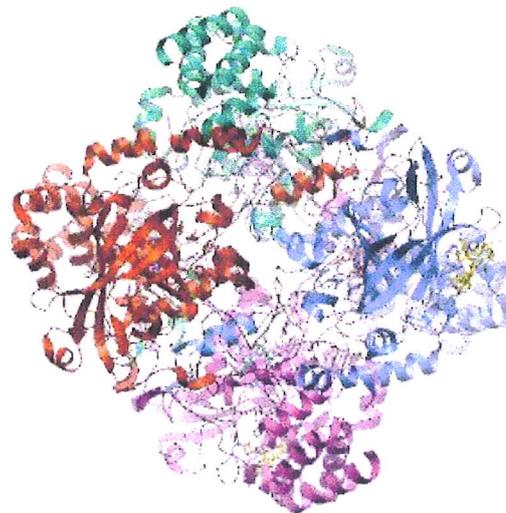


Figure II.3. Structure tridimensionnelle de la catalase

Elle catalyse la dismutation de peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau (Eq. II.12).



✓ **La glutathion peroxydase (GPX)**

Les enzymes de cette famille sont Selenium-dépendante. La glutathion peroxydase (GPX) est présente dans le cytoplasme où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires (Figure II.4).^[15]

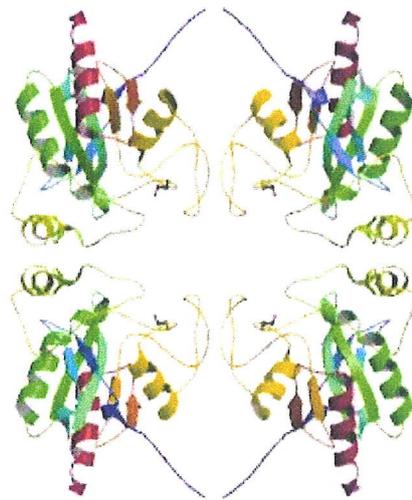


Figure II.4. Structure tridimensionnelle de la glutathion peroxydase.

Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (H_2O_2), et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (Eq. II.13).^[15]



✓ **L'hème oxygénase**

L'hème oxygénase dégrade l'hème (pro-oxydant) en biliverdine, puis en bilirubine qui est un antioxydant, en CO et en fer, et peut prévenir l'oxydation des LDLs. On distingue l'hème oxygénase constitutive et inducible. Cette dernière est induite par le stress oxydant et les LDLs oxydés (ox LDLs), et possède un effet antiathérogène chez la souris.^[15]

✓ **Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR)**

Les thiorédoxines sont des enzymes à activité anti-oxydante intrinsèque comme toutes les protéines à groupement thiol (SH). Elles jouent aussi un rôle important dans la régulation du système immunitaire. Une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase (TRxR) qui est une enzyme possédant un groupement sélénocystéine dans son site actif. La TRxR intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique.^[15]

II.2.5.2.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants sont des agents redox qui réagissent (effet *scavenger*) avec les oxydants et soit stoppent, soit ralentissent les processus d'oxydation.^[15]

✓ Glutathion

Le glutathion est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants. C'est un tripeptide constitué d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine). Il est antioxydant par son caractère nucléophile et radicalaire. Le mécanisme par lequel il neutralise les radicaux libres est présenté par l'équation II.14 (Eq. II.14).^[15]



✓ Acide Urique

L'acide urique est un piègeur de 1°O_2 , des radicaux peroxydes et hydroxydes ($\text{RO}_2\cdot$ et $\text{HO}\cdot$ respectivement), de l'ozone et de HClO . La réaction de l'acide urique avec ces ROS génère des radicaux moins réactifs que $\text{HO}\cdot$.^[15]

✓ Les protéines de stockage des métaux de transition

Des protéines liant les métaux (transferrine, céruloplasmine, etc.), l'albumine ou l'haptoglobine diminuent le taux des ions métalliques libres en les complexant avec en conséquence, une diminution de leur pouvoir oxydant. A titre d'exemple, la réaction de Fenton entre le fer (ou cuivre) et l'eau oxygénée ne se fait pas en absence du métal.

✓ Les vitamines

➤ La vitamine E

La vitamine E ou α -tocophérol, est un antioxydant liposoluble, elle se localise entre les chaînes d'acides gras des phospholipides qui constituent les membranes et les lipoprotéines. Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques $\text{RO}_2\cdot$ qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice. Celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α -tocophéryle, tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde (Eq. II.15).



De plus, l' α -tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée $\text{HO}_2\cdot$), les radicaux hydroxydes $\cdot\text{OH}$, ainsi que l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$. Bien que la concentration d' α -

tocophérol soit relativement faible in vivo, le recyclage de ce dernier par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate, lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises.^[16]

➤ La vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble. L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$, mais aussi avec les radicaux superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$. En outre, l'ascorbate capte les radicaux peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. En réagissant avec ces divers oxy-radicaux, l'ascorbate est oxydé en radical ascorbyle ($\text{Asc}^{\cdot-}$) qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques. L'ascorbate possède une propriété importante qui est la réparation possible de deux autres antioxydants, le glutathion et l' α -tocophérol à partir de leurs formes radicalaires. Il est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle (Eq. II.16).^[16]



✓ Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles jaunes, orangés à rouges, synthétisés par les plantes et les microorganismes. Les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ et les RLs en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables.^[17]

✓ Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires ayant des propriétés anti-oxydantes, et en particulier la classe des flavonoïdes. Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant, par capture directe des RLs, par chélation de métaux de transition comme le fer ou par inhibition de l'activité de la xanthine oxydase (XO).^[18]

✓ Taurine

La taurine (acide 2-aminoethanesulfonique) est un acide aminé sulfoné (Figure II.5). La majeure partie de cette molécule se trouve dissoute dans le cytosol soit liée aux membranes

cellulaires. Son action dans l'organisme est mal connue. Elle serait capable d'inactiver des radicaux libres. A côté de son rôle dans les défenses anti-oxydantes, elle participerait aussi à la régulation de la pression osmotique cellulaire en modifiant les concentrations intracellulaires de calcium.^[19]

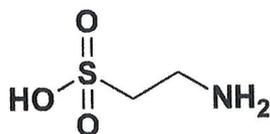


Figure II.5. Structure de la taurine.

✓ Oligo-éléments

Le zinc, le sélénium et le manganèse sont des oligo-éléments qui interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres.^[20]

Les possibles actions anti-oxydantes du zinc sont les suivantes :

- Protection contre la diminution de concentration de la vitamine E.
- Stabilisation de la structure membranaire.
- Limitation de la production endogène de radicaux libres.
- Participation à la structure et à la fonction de l'enzyme extracellulaire à activité antioxydante : la SOD.
- Participation au maintien de la concentration tissulaire en métallothionine, molécule potentiellement capable de piéger les radicaux libres.

Le sélénium est connu pour ses propriétés antioxydantes. Il entre dans la constitution de la GPx. Cette enzyme sélénio-dépendante participe au recyclage du glutathion et réduit la peroxydation lipidique en catalysant la réduction des peroxydes dont le H₂O₂. D'autres rôles sont attribués à cette enzyme : elle interviendrait dans la transduction des signaux cellulaires, la régulation de l'expression de gènes (par son action au niveau des facteurs de transcription), l'induction de Bêta carotène et jouerait donc un rôle clé lors du cycle cellulaire.

✓ Minéraux

Nous citerons tout particulièrement, le magnésium. Il se trouve dans le chocolat, les produits céréaliers, les légumes et les fruits secs. Son déficit favorise la peroxydation lipidique.^[20]

II.2.6. Les maladies liées au stress oxydatif

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant serait la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer,

cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète.^[21,22]

Références

- [1] Kehrer, J. P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in toxicology*, 23(1), 21-48.
- [2] Beneš, L., Ďuračková, Z., & Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life sciences*, 65(18-19), 1865-1874.
- [3] Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1993). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free radical research communications*, 19(3), 141-158.
- [4] Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- [5] Delattre, J., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant (aspects biologiques et pathologiques).
- [6] Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.
- [7] Sayre, L. M., Moreira, P. I., Smith, M. A., & Perry, G. (2005). Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 41(2), 143-164 .
- [8] Kirschvink, N., de Moffarts, B., & Lekeux, P. (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*, 177(2), 178-191.
- [9] Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- [10] Jacques B., & André R. (2004). *Biochimie métabolique*, Ed ellipses, pages : 217, 219-220, 223-225.
- [11] Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- [12] Lenzi, F. (2011). *Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traineau en course de sprint* (Doctoral dissertation, Thèse Méd. Vét., Lyon).
- [13] Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014.

- [14] Qusti, S. Y., Abo-khatwa, A. N., & Lahwa, M. B. (2010). Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the Holly Quran. *EJBS*, 2(1), 40-51
- [15] Desmier, T. (2016). *Les antioxydants de nos jours: définition et applications* (Doctoral dissertation, éditeur inconnu).
- [16] Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91.
- [17] Pixley, K., Rojas, N. P., Babu, R., Mutale, R., Surles, R., & Simpungwe, E. (2013). Biofortification of maize with provitamin A carotenoids. In *Carotenoids and human health* (pp. 271-292). Humana Press, Totowa, NJ.
- [18] Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020-6047.
- [19] Patrick, L. (2006). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative medicine review*, 11(2).
- [20] DiSilvestro, R. A. (2000). Zinc in relation to diabetes and oxidative disease. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1509S-1511S.
- [21] Atawodi, S. E. (2005). Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(2), 128-133.
- [22] Georgetti, S. R., Casagrande, R., Di Mambro, V. M., Azzolini, A. E., & Fonseca, M. J. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS PharmSci*, 5(2), 111

Chapitre III

Résultats et discussion



III.1. Objectif du travail

Comme nous l'avons déjà signalé brièvement dans l'introduction générale l'objectif principal du présent travail est l'évaluation de l'activité antioxydante de nouvelles molécules synthétisées par M. Stiti Mohamed Zakaria dans le cadre de sa thèse de doctorat, préparée sous la direction du professeur Khelili Smail. Les molécules à tester sont issues d'une pharmacomodulation de la nifédipine, une 1,4-dihydropyridine, utilisée dans le traitement de diverses maladies cardiovasculaires (Figure III.1). Dans cette pharmacomodulation, le groupe nitro de la nifédipine a été remplacé par des fragments urée ou thiourée, et déplacés vers la position para du groupe phényle en position 4 de l'hétérocycle (Figure III.1). Les propriétés oxydantes de ces composés pourraient être exprimées par :

- ✓ Le cycle 1,4-dihydropyridine qui se transformerait en pyridine après oxydation.
- ✓ La fonction thiourée qui se transformerait en dioxyde ou en disulfure selon les conditions d'oxydation.

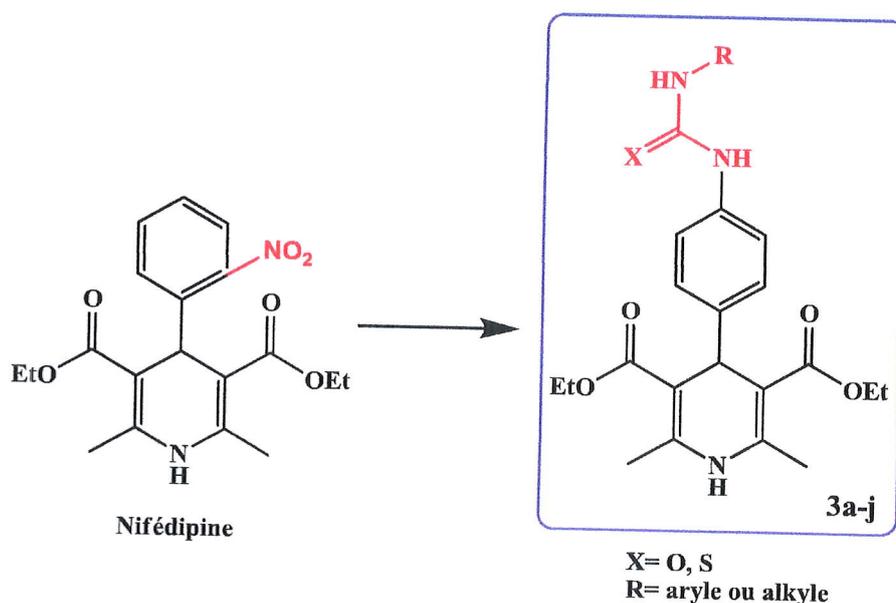


Figure III.1. Conception des molécules à tester par modulation structurale de la nifédipine. Ces molécules ont subi trois tests dans lesquels ils réagissent avec trois réactifs qui sont :

- ✓ DPPH
- ✓ ABTS
- ✓ FRAP

Les principes de base de ces trois tests ont été expliqués dans le chapitre 4 (partie expérimentale). Ainsi, dix composés ont été testés dans le cadre de ces trois tests (Figure III.1).

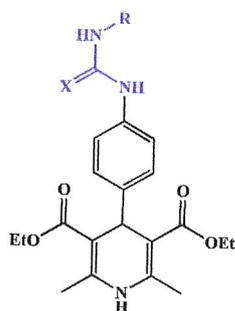
III.2. Résultats et discussion

III.2.1. Test de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

L'activité antioxydante des dérivées de la DHP est mesurée en comparaison à un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique (vitamine C). Les résultats sont exprimés sous forme d' $EC_{50} \pm$ l'écart-type et sont présentés dans le tableau III.1.

D'après le tableau III.1 on peut remarquer que les composés **3a**, **3c**, **3g**, **3h-j** sont totalement inactifs. Par contre les composés **3b**, **3d-e** présentent une activité antioxydante. Les composés les plus actifs sont **3b** et **3d**, mais comparés à l'acide ascorbique, ils sont environ 4 fois moins actifs que lui. On peut remarquer que toutes les urées sont inactives (**3a**, **3c**, **3h**, **3i**) alors que quatre thiourées (**3b**, **3d-f**) sur six sont actives.

Tableau III.1. EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) de nos composés et celle de l'acide ascorbique avec le test DPPH.



Composé	X	R	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
3a	O	Et	Inactif
3b	S	2-Et-C ₆ H ₄	24,12 \pm 0,49
3c	O	Butyl	Inactif
3d	S	3-C ₆ H ₄	26,96 \pm 1,47
3^e	S	3-Cl-C ₆ H ₄	51,44 \pm 1,59
3f	S	4-OMe-C ₆ H ₄	55,29 \pm 1,31
3g	S	3-NO ₂ -C ₆ H ₄	Inactif
3h	O	4-OMe-C ₆ H ₄	Inactif
3i	O	3-Cl-C ₆ H ₄	Inactif
3j	S	3-CN-C ₆ H ₄	Inactif
A. Ascorbique	-----	-----	6,31 \pm 2,25

Ceci indiquerait que le groupe C=S joue un rôle important dans l'activité antioxydante de nos composés. En effet, des travaux décrits montrent que certaines thiourées et carbonylurées

présentaient des activités antioxydantes très fortes.^[1-8] En effet, une thiourée est capable de subir l'équilibre thione-thiol (Figure III.1). Le groupe thiol est responsable de l'activité antioxydante de nombreux antioxydants endogènes comme le glutathion.

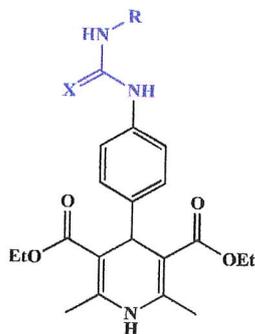


Figure III.2. Equilibre thione-thiol chez les thiourées.

III.2.2. Test de piégeage du radical-cation ABTS^{•+}

Au cours de ce test, l'acide d'ABTS perd un électron pour former un radical cation ABTS^{•+} de couleur bleue, et qui se décolore en présence d'une substance antioxydante. L'activité antioxydante des dérivées de la DHP est mesurée en comparaison à un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique (vitamine C). Les résultats sont exprimés sous forme d'EC₅₀ ± l'écart-type et sont présentés dans le tableau III.2.

Tableau III.2. EC₅₀ (µg/ml) de nos composés et celle de l'acide ascorbique avec le test ABTS.



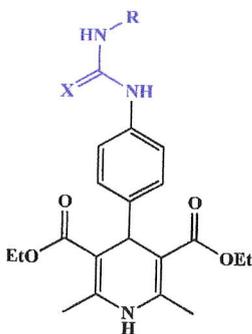
Composé	X	R	EC ₅₀ (µg/ml)
3a	O	Et	87,00 ± 4,72
3b	S	2-Et-C ₆ H ₄	5.90 ± 0,31
3c	O	Butyl	11.00 ± 0,54
3d	S	3-OMe-C ₆ H ₄	4.48 ± 0,46
3e	S	3-Cl-C ₆ H ₄	3.54 ± 1,10
3f	S	4-OMe-C ₆ H ₄	1.74 ± 1,83
3g	S	3-NO ₂ -C ₆ H ₄	35.12 ± 0,32
3h	O	4-OMe-C ₆ H ₄	48.04 ± 4,11
3i	O	3-Cl-C ₆ H ₄	95.00 ± 2,22
3j	S	3-CN-C ₆ H ₄	18.61 ± 1,83
A. ascorbique	-----	-----	5.53 ± 0,99

D'après le tableau III.2, on peut voir que les composés qui étaient inactifs avec le test DPPH sont devenus actifs avec le test ABTS (**3a**, **3c**, **3g-j**), mais restent largement moins actifs que l'acide ascorbique. Les plus actifs d'entre ceux-là, les deux composés **3c** et **3j**, sont deux et trois fois moins actifs que l'acide ascorbique. Les autres composés, **3b**, **3d-e**, qui étaient les plus actifs avec le test DPPH montrent avec le test ABTS une excellente activité antioxydante qui est soit comparable à celle de l'acide ascorbique (**3b**) ou nettement plus actifs (**3d-f**), en particulier le composé **3f** qui environ trois fois plus actif que l'acide ascorbique. Ces résultats montrent aussi que les thiourées sont plus actives que les urées et que les thiourées portant des substituants donneurs d'électrons sont plus actives que celles portant des substituants attracteurs.

III.2.3. Test de pouvoir réducteur (FRAP)

L'activité réductrice des dérivés de DHP a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est une analyse d'activité antioxydante rapide, reproductible, et facile à exécuter. La méthode est basée sur la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . Par conséquent, Fe^{2+} est évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur vert dans le milieu réactionnel à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés. L'activité antioxydante des dérivées de la DHP est mesurée en comparaison à un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique (vitamine C). Les résultats sont exprimés sous forme d' $EC_{50} \pm$ l'écart-type et sont présentés dans le tableau III.3.

Tableau III.3. EC_{50} ($\mu g/ml$) de nos composés et celle de l'acide ascorbique avec le test FRAP.



Composé	X	R	EC_{50} ($\mu g/ml$)
3a	O	Et	$54.00 \pm 0,12$
3b	S	2-Et-C ₆ H ₄	$29.74 \pm 1,23$
3c	O	Butyl	$49.22 \pm 5,85$
3d	S	3-OMe-C ₆ H ₄	$64.47 \pm 1,11$
3e	S	3-Cl-C ₆ H ₄	$30.12 \pm 3,10$

3f	S	4-OMe-C ₆ H ₄	53.64 ± 2,69
3g	S	3-NO ₂ -C ₆ H ₄	51.43 ± 1,40
3h	O	4-OMe-C ₆ H ₄	8.745 ± 1,41
3i	O	3-Cl-C ₆ H ₄	46.00 ± 1,98
3j	S	3-CN-C ₆ H ₄	54.74 ± 5,85
A. ascorbique	-----	-----	24.63 ± 1,14

Les résultats montrent que les composés **3b**, **3e** et **3h** sont les composés les plus actifs, où **3b** et **3e** sont proches de l'acide ascorbique alors que **3h** est environ trois fois plus actif que lui. Les autres composés (**3a**, **3c**, **3d**, **3f**, **3g**, **3i** et **3j**) sont environ deux à trois fois moins actifs que l'acide ascorbique. On peut remarquer que le composé le plus actif avec ce test est l'urée **3h** portant un groupe donneur en position para sur le groupe phényle.

On peut voir qu'il y a une différence de comportement de nos molécules selon le système oxydant en face. En effet, alors que les molécules testées étaient actives avec les tests ABTS et FRAP (de faiblement actives à très actives), plus que la moitié des molécules étaient inactives avec le test DPPH. Une autre différence de taille est le fait qu'avec les tests DPPH et ABTS les thiourées sont généralement plus actives que les urées, alors que pour le test FRAP, les composés les plus actives sont des urées et des thiourées. Mieux encore, le composé le plus actif avec le test FRAP est une urée (composé **3h**). 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.

Références

- [1] Mohammad, W., Barry, H., Martin, G., Christopher, P. M., Duncan, C. S. H., & Harold, B. (1987). The specificity of thiourea, dimethylthiourea and dimethylsulfoxide as scavengers of hydroxyl radicals. *Biochem. J.*, 243, 867-870.
- [2] Kelner, M. J., Bagnell, R., & Welch, K. J. (1990). Thioureas react with superoxide radicals to yield a sulfhydryl compound. Explanation for protective effect against paraquat. *Journal of Biological Chemistry*, 265(3), 1306-1311.
- [3] Kim, S. G., Kim, H. J., & Yang, C. H. (1999). Thioureas differentially induce rat hepatic microsomal epoxide hydrolase and rGSTA2 irrespective of their oxygen radical scavenging effect: effects on toxicant-induced liver injury. *Chemico-biological interactions*, 117(2), 117-134.
- [4] Venkatesh, P.; Pandey, S. N. (2009), *International Journal of ChemTech Research*. 1(3), 733.ISSN : 0974-4290.
- [5] Mahdavi, M., Shirazi, M. S., Taherkhani, R., Saeedi, M., Alipour, E., Moghadam, F. H., & Shafiee, A. (2014). Synthesis, biological evaluation and docking study of 3-aryloyl-1-(4-sulfamoylphenyl) thiourea derivatives as 15-lipoxygenase inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 82, 308-313.
- [6] Curtis, W. E., Muldrow, M. E., Parker, N. B., Barkley, R., Linas, S. L., & Repine, J. E. (1988). N, N'-dimethylthiourea dioxide formation from N, N'-dimethylthiourea reflects hydrogen peroxide concentrations in simple biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(10), 3422-3425.
- [7] Parker, N. B., Berger, E. M., Curtis, W. E., Muldrow, M. E., Linas, S. L., & Repine, J. E. (1985). Hydrogen peroxide causes dimethylthiourea consumption while hydroxyl radical causes dimethyl sulfoxide consumption in vitro. *Journal of free radicals in biology & medicine*, 1(5-6), 415-419.
- [8] Dong, Y., Venkatachalam, T. K., Narla, R. K., Trieu, V. N., Sudbeck, E. A., & Uckun, F. M. (2000). Antioxidant function of phenethyl-5-bromo-pyridyl thiourea compounds with potent anti-HIV activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 10(1), 87-90.

Chapitre IV

Partie experimentale

IV. Matériels et méthodes

IV.1. Matériels utilisés

✓ Solvants et réactifs utilisés

- DMSO (Diméthyle sulfoxyde)
- Méthanol : solvant
- Ethanol : solvant
- Tampon phosphate : pour fixer le pH à 6.6
- $K_3Fe(CN)_6$: Réactif
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$: Réactif
- Acide trichloroacétique : Réactif
- 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) : Réactif
- Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) : Réactif
- Acide ascorbique : référence.
- Eau distillée.

✓ Molécules à tester

Dix molécules ont été choisies pour être testées comme antioxydants. Elles ont été synthétisées par M. Mohamed Zakaria Stiti, doctorant au laboratoire de pharmacologie et de phytochimie (université de Jijel), dont le directeur de thèse est le professeur Smail Khelili. Les structures de ces molécules sont présentées dans la figure IV.1, et leur schéma de synthèse a été décrit dans le chapitre 1.

✓ Appareillage

a- Spectrométrie UV-visible

La spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible est une méthode basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde de 180 à 800 nm.^[1] Cette technique d'analyse, souvent utilisée dans un mode quantitatif pour déterminer la concentration d'une entité chimique en solution, se base sur la loi de Beer-Lambert pour des longueurs d'ondes correspondant au maximum des bandes d'absorption (Eq.IV.1).

$$A = \epsilon \cdot C \cdot \ell \quad \text{Eq. IV.1}$$

C : Concentration molaire de la solution ;

A : Absorbance normalisée ;

ℓ : Longueur du trajet optique dans la solution traversée (Figure IV.2).

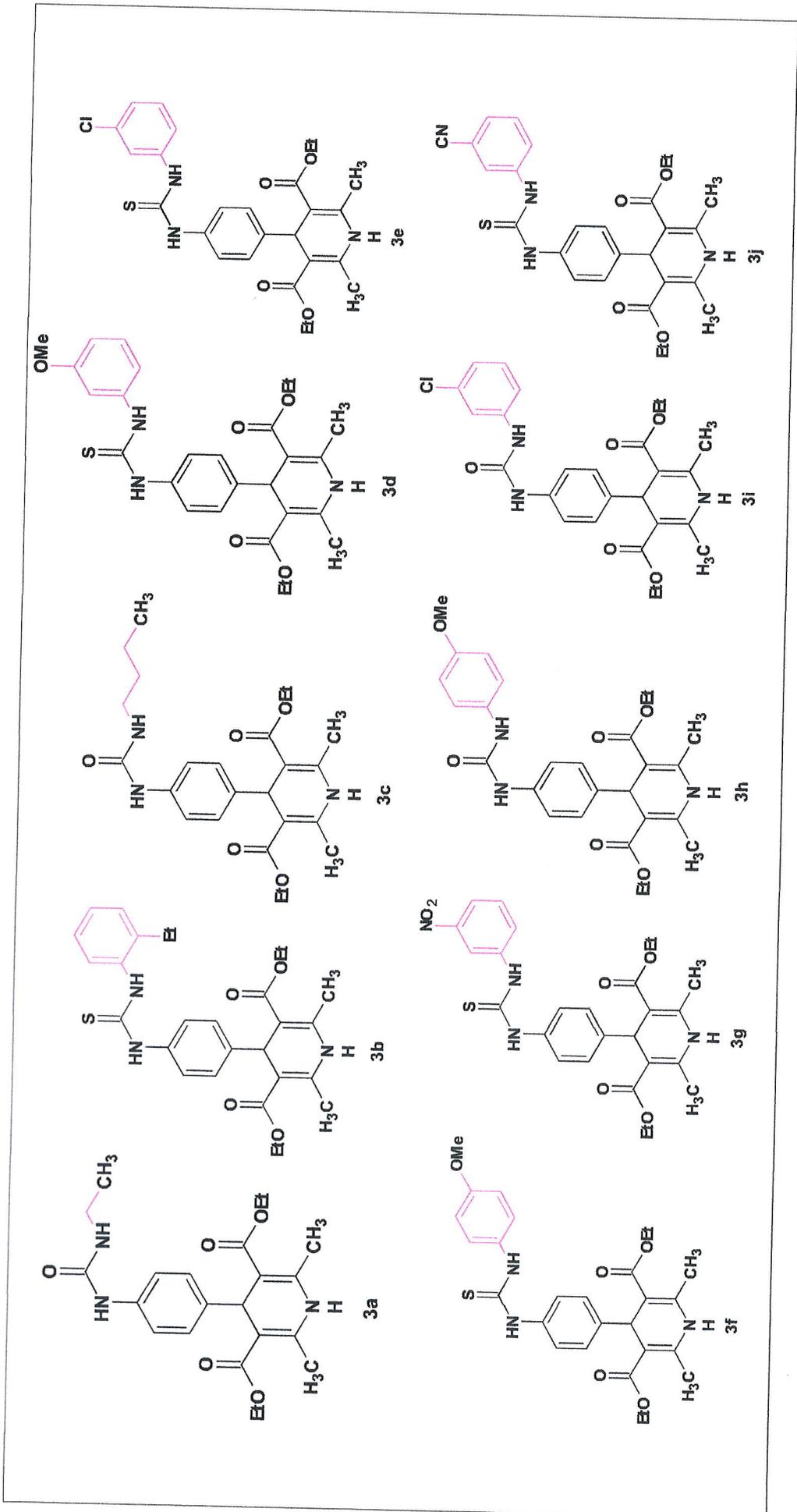


Figure IV.1. Structures chimiques des composés à tester.

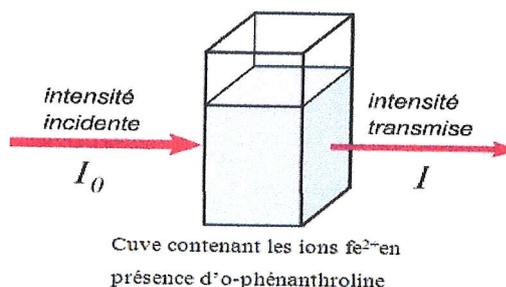


Figure IV.2. Cuve utilisée en spectrométrie UV-visible, remplie par l'échantillon à analyser et traversée par un rayon lumineux.

IV.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante. comme par exemple, les méthodes ABTS (Sel d'Ammonium de l'Acide 2,2- Azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonique), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) et le FRAP (pouvoir réducteur) qui reposent sur le transfert de l'électron, ainsi que les méthodes DPPH (2,2-DiPhényl-PicrylHydrazyle) et ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) qui se basent sur le transfert d'un atome d'hydrogène.^[2]

Le pouvoir antioxydant des produits testés a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel (l'acide ascorbique).

Cette étude a été réalisée au niveau de laboratoire de pharmacologie et de phytochimie faculté des sciences exactes et informatique de l'université de Jijel.

IV.2.1. Préparation des solutions des produits à tester

Les composés à tester sont sous forme de poudre. 1mg de chaque composé a été solubilisé dans 1 ml de DMSO, donnant une solution mère. Toutes les molécules ont été, dans un premier temps, testées à cette concentration (1 mg/ml). 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, afin de déterminer les concentrations à 50 % de l'effet maximal (EC_{50}). Les solutions diluées ainsi préparées vont de 10 à 500 $\mu\text{g/ml}$ suivant (Tableau IV.1).

Tableau IV.1. Préparation de la solution mère et les solutions filles.

Solution à tester	S _m	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	1000	500	250	100	50	25	10
Volume totale (ml)	1	1	1	1	1	1	1



Nous avons utilisé l'acide ascorbique comme un antioxydant de référence (control positif), dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. L'acide ascorbique est un antioxydant puissant hydrosoluble, capable de piéger ou neutraliser à des concentrations très faibles les espèces réactives de l'oxygène.^[3] Il est un réducteur susceptible de limiter la peroxydation lipidique en intervenant dans la régénération des autres antioxydants tels que α -tocophérol.^[4]

IV.2.2. Test DPPH

IV.2.2.1. Principe du test

Le test au DPPH permet de mesurer la capacité d'un antioxydant à réduire le radical stable DPPH• par transfert d'un hydrogène (ou d'un électron selon sa nature chimique). Le DPPH• initialement violet, se transforme en DPPHH, jaune pâle (Figure IV.3), Le maximum de son absorption dans le visible se situe vers 515 nm dans le méthanol ou l'éthanol.^[5]

Les absorbances mesurées à 515 nm servent alors à calculer le pourcentage de réduction du radical DPPH•, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon, selon l'équation suivante (Eq. IV.2).

$$PR(\%) = \frac{(A_{\text{blan}} - A_{\text{antioxydant}})}{A_{\text{blan}}} \times 100 \quad \text{Eq. IV.2}$$

A : absorbance pour une concentration en antioxydant.

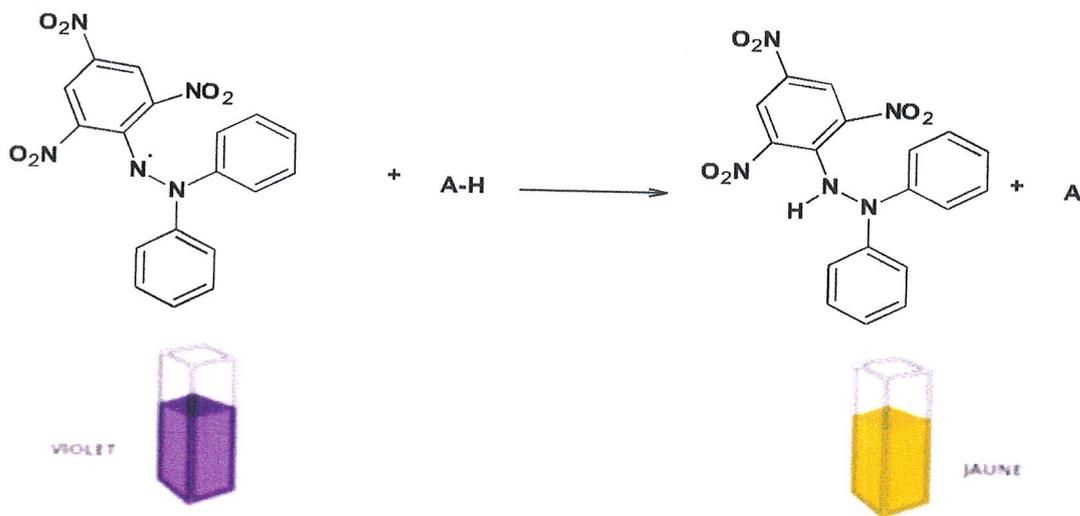


Figure IV.3. Conversion de DPPH• en DPPHH par transfert d'un hydrogène.

IV.2.2.2. Mode opératoire

Ce mode opératoire a été exécuté selon une méthode décrite.^[6] Un volume de 50 μl de solutions de différentes concentrations de chaque produit est ajouté à 1950 μl de la solution méthanolique du DPPH (60 μM) fraîchement préparée. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 μl de DMSO avec 1950 μl de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite pour chaque concentration à 515 nm après 30 min 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 mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration, le test est répété 4 fois.

IV.2.3. Test ABTS

IV.2.3.1. Principe du test

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cationique ABTS $^{\bullet+}$ qui présente un spectre d'absorption dans le visible à 734 nm.^[7] En réagissant avec le persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), l'ABTS forme le radical ABTS $^{\bullet+}$, de couleur bleue à verte. L'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. Cette dernière est proportionnelle à la concentration en antioxydants.

Le radical ABTS $^{\bullet+}$ est formé par arrachement d'un électron (e^-) à un des atomes d'azote du pont azoté de l'ABTS (Figure IV.4). En présence d'un antioxydant donneur de H^\bullet , le radical d'azote concerné piège un H^\bullet , conduisant à l'ABTSH $^+$, ce qui entraîne la décoloration de la solution

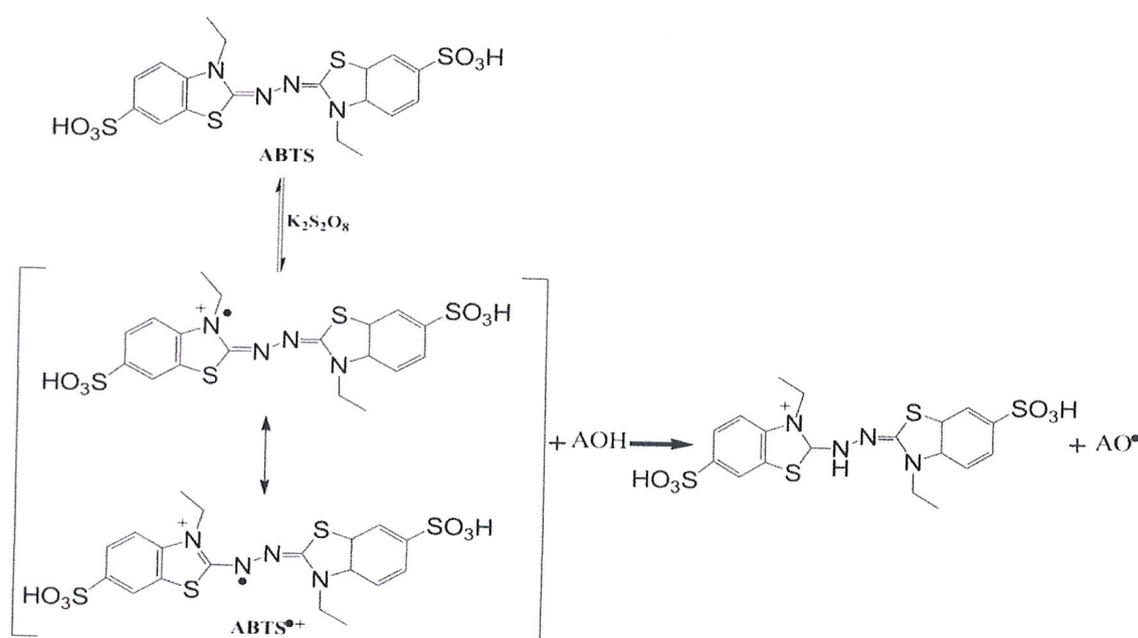


Figure IV.4. Génération du radical-cation ABTS $^{\bullet+}$ avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant (AOH).

IV.2.3.2. Mode opératoire

Le potentiel antioxydant radicalaire des dérivés de dihydropyridine a été mesuré en utilisant le test de piégeage par le cation radicalaire ABTS^{•+} suivant la méthode décrite par Re et al. avec de mineurs modifications.^[8] Le radical cation ABTS^{•+} a été formé par la réaction entre un mélange (1: 1) de solution d'ABTS (7 mM) et de persulfate de potassium (2,45 mM), conservée à l'obscurité et à température ambiante, pendant 12 à 16 h avant utilisation. La solution ABTS^{•+} a ensuite été diluée avec de l'éthanol pour obtenir une absorbance de 0,700 à 734 nm. Après addition de 100 µl d'échantillon ou (acide ascorbique comme contrôle positif) à différentes concentrations a 900 µl de la solution ABTS^{•+} diluée, l'absorbance a été mesurée après 10 min d'incubation à température ambiante (20 ± 2 °C). Toutes les déterminations ont été répétées quatre fois.

Les résultats des absorbances obtenues permettent d'exprimer le pourcentage d'inhibition comme décrit précédemment pour le test DPPH•.

IV.2.4. Test du pouvoir réducteur (PRAP)

IV.2.4.1. Principe du test

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe²⁺. La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) vers la couleur bleu vert du fer ferreux (Fe²⁺). L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

Les conditions d'essai favorisent la réduction du complexe et donc le développement de la couleur, à condition qu'un réducteur (antioxydant) soit présent.

IV.2.4.2. Mode opératoire

L'activité réductrice d'un composé est évaluée par la réaction d'oxydo-réduction entre la molécule et les ions métalliques de transition, notamment le fer. Le ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ fournit des ions ferriques (Fe⁺³) qui seront réduits en fer ferreux (Fe⁺²) par les antioxydants présents. Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu avec quelques modifications.^[9] 100 µl de l'échantillon à différentes concentrations dilué dans le DMSO est mélangé avec 250 µl d'une solution tampon phosphate (0,2 M ; pH : 6,6) et 250 µl d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1 %. Le mélange est incubé dans des tubes à 50 °C pendant 20 minutes. Après retour des tubes à température ambiante, 250 µl d'acide trichloracétique (ATA) à 10 % sont ajoutés pour stopper la réaction, puis on ajoute au ce mélange 850 µL d'eau distillée. Nous additionnons ensuite au mélange 170 µl d'une solution de chlorure de fer III (FeCl₃, 6H₂O) à 0,1 % fraîchement préparée. La lecture des absorbances se

fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions. Chaque test est répété 4 fois.



Références

- [1] Bernard, A. S. (2012). Techniques expérimentales en CHIMIE. Dunod.
- [2] Lee, C. Y., Sharma, A., Cheong, J. E., & Nelson, J. L. (2009). Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(22), 6326-6330.
- [3] Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., & Codina, C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6882-6890.
- [4] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- [5] Belkheiri, N. (2010). *Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- [6] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- [7] Chung YC, Chen S.J, Hsu C.K, Chang C.T, Chou S.T. (2005). studies on the antioxidant activity of *Graptopetalum paraguayense* e. walther, *Food Chem*, 91: 419-24.
- [8] Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., & Uygun, D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*, 111(2), 400-407.
- [9] Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., & Chou, S. T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2454-2458.

Conclusion
Général

Conclusion générale

Ce travail avait comme objet l'évaluation de l'activité antioxydante de quelques 1,4-dihydropyridines portant des fragments urée et thiourée 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 et, aussi la fonction thiourée, posséderait des propriétés antioxydantes. Le manuscrit a commencé par une introduction générale, puis s'en suivit des généralités sur les 1,4-dihydropyridines, incluant leur 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, voir 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 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-à-dire, les tester *in vivo*.

Résumé

Ce travail a comme objet l'évaluation de l'activité antioxydante de quelques 1,4-dihydropyridines portant des fragments urée et thiourée 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 et, aussi la fonction thiourée, posséderait des propriétés antioxydantes. Les travaux réalisés, comprenant trois tests différents (DPPH, ABTS, FRAP), ont montré que globalement, les molécules testés possèdent un réel pouvoir antioxydant et certains d'entre eux se sont montrés aussi actif, voir 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. 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*.

Mots-clés : 1,4-dihydropyridine, Activitéantioxydante, DPPH, ABTS, FRAP.

Abstract

The purpose of this work is to evaluate the antioxidant activity of some 1,4-dihydropyridines bearing urea and thiourea moieties linked to the phenyl group of the heterocycle. The choice of these molecules was guided by the fact that the 1,4-dihydroxyridine ring itself and, also the thiourea function, possess antioxidant properties. The work carried out, comprising three different tests (DPPH, ABTS, FRAP), showed that overall, the tested molecules have a real antioxidant power and some of them have been as active, or significantly more active than the reference antioxidant, ascorbic acid. The use of three different tests was necessary because the antioxidant behaviour of a chemical compound depends on the oxidizing system in front and the oxidation mechanism. It would be important and necessary to test them on biological systems that bring them closer to the reality of the body, that is to say, testing them *in vivo*.

Keywords: Dihydropyridine, Antioxidant activity, DPPH, ABTS, FRAP.

ملخص

الغرض من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة لبعض مشتقات 1,4-ديهيدروبيريدين تحمل شقوق اليوريا و ثيوريا على مجموعة فينيل المرتبطة بالحلقة غير المتجانسة. وقد تم اختيار هذه الجزيئات بحقيقة أن حلقة 1,4-ديهيدروبيريدين هي نفسها. و أيضًا وظيفة ثيوريا و يوريا تمتلكان خصائص مضادة للأكسدة. حيث أظهر العمل المنجز، الذي يشتمل بشكل عام ثلاثة اختبارات مختلفة (DPPH, ABTS, FRAP). تمتلك هذه الجزيئات نشاطا حقيقيا مضادا للأكسدة مقاربا لنشاط حمض الاسكوربيك بالنسبة للبعض منها، و نشاطا اقوي منه بالنسبة للبعض الآخر. كان استخدام ثلاثة اختبارات مختلفة ضرورياً لأن السلوك المضاد للأكسدة لمركب كيميائي يعتمد على نظام الأكسدة و على آلية الأكسدة. سيكون من المهم والضروري اختبارها على الأنظمة البيولوجية التي تجعله أقرب إلى واقع الجسم، أي إجراء اختبار في الجسم الحي.

الكلمات المفتاحية : ديهيدروبيريدين ، نشاط مضاد للأكسدة ، DPPH ، ABTS ، FRAP.