

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

Et DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Mohamed Seddik
BEN-YAHIA-Jijel
Faculté de Sciences Exactes et
Informatique
Département de chimie



جامعة محمد الصديق بن يحيى-جيجل

كلية العلوم الدقيقة والاعلام الالي

قسم الكيمياء

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention de **Master en Chimie**

Option : **Chimie Pharmaceutique**

Réalisé par

Souhila ROUANA & Hayat BOUDOUR

Thème

**Etude de l'activité antioxydante de
quelques composés de synthèse organique**

Devant le jury :

Dr. Kamel HARROUCHE

M.C.A

Président

Dr. Nafila BOUIDER

M.C.B

Encadreur

Dr. Khalil SAHRA

M.C.B

Examineur

Année Universitaire 2019/2020

Remerciements

En premier lieu nous tenons à dire « El-Hamdouli'Allah », merci à Dieu de nous avoir donné la santé, le courage, la force et la volonté pour accomplir ce travail.

*Nos remerciements et notre vive reconnaissance à notre encadreur **Dr. Nafila BOUIDER**, maitre de conférence au département de Chimie pour avoir accepté de nous encadrées et dirigées ce travail par excellence. Aussi bien pour ces conseils judicieux, Nous la remercies pour sa disponibilité, sa grande patience, ses conseils et ses remarques précieuses.*

*Nos vifs remerciements au **Dr. Kamel HARROUCHE** maitre de conférences au département de Chimie pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance.*

*Et **Dr. Sahra KHALIL** pour l'importance qu'il a accordée à notre travail en acceptant d'être membre de ce jury et pour le temps qu'il a consacré à examiner de ce mémoire.*

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.

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

Souhila et Hayat

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail qui n'aurait pu aboutir et voir la lumière sans l'aide
de dieu le tout puissant ;*

A** ma très chère mère **Saida

*Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier
pour moi. Et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver t'accorder santé,
longue vie et bonheur.*

A** mon cher père **Samir

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

***A** ma très chère sœur unique **khadidja** pour son aide et son soutien que dieu
vous garde et vous protège que votre chemin soit.*

***A** mes frères : **Fouzi** ; **Sid ali** ; **Abd samad** ; **Younes**.*

***A** mon très cher fiancé **Ismail** : de son soutien moral et matériel.*

***A** mon binôme **Hayat** qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce
travail.*

***A** Sans oublier mes amies et a Tous ceux qui m'ont connus.*

***A** tous les étudiants de ma promotion chimie pharmaceutique **Master2(2020)**.*

Souhila

Dédicaces

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je dédie ce modeste travail :

*À ma très chère mère décédée **Liela**, qu'Allah la fasse miséricorde.*

Qui m'a apporté son appui tout au long de mes années scolaires, pour son sacrifice et son soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité ...

*À Mon très chère père **Ibrahim** qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort....*

*À mon très cher mari **Mourad**, en signe d'amour et de gratitude pour m'avoir supporté, soutenu et surtout compris en permanence, pour ces sacrifices, ces encouragements, sa fidélité et sa gentillesse. Sans lui, je ne saurais pu progresser et en arriver à l'achèvement de ce travail...*

*À mon fils **yahia** ; je t'aime énormément.*

*À mes chères sœurs : **Soufia, fadia, Souad et Amira**, Sans eux, je ne pourrais pas être qui je suis, en reconnaissance de leurs efforts, de leur amour et de leurs encouragements tout au long de mes études.*

*À mon frère : **Mohamed** et sa femme **Rim**.*

*À mon frère : **raouf** et sa femme **Sihem**.*

*À ma belle-mère **Hafida**.*

*Aux mes chers beaux-parents : **Daoud et Salima**.*

*À mes beaux frères et mes belles sœurs, **Ahmed, Mezian, Amine, Cherif, Zakaria et Djawida**, **Khadija** ainsi qu'à leurs petites familles.*

*À mon binôme **souhila** qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail.*

À la promotion 2019/2020 de chimie pharmaceutique.

À mes amies et à tous ceux qui me sont chers.

Hayat

Sommaire

Liste des figures

Liste des schémas

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale et objectif de travail 01

Etude bibliographique

Chapitre 1 : les radicaux libre et le stress oxydant

| | |
|--|----|
| I. Introduction..... | 02 |
| I.1. radicaux libres | 02 |
| I.1.1.Historique..... | 02 |
| I.1.2.Définition | 03 |
| I.1.3. Différents types des radicaux libres..... | 04 |
| I.1.4.Nature des radicaux libres | 04 |
| I.1.4.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)..... | 04 |
| I.1.4.2. Les espèces réactives de l'oxygène radicalaires | 05 |
| I.1.4.3. Les espèces oxygénées non radicalaires | 07 |
| I.1.4.4. Autres espèces réactives de l'oxygène..... | 07 |
| I.1.4.5. Autres radicaux libres | 08 |
| I.1.4.5.1 Radicaux libre biologique..... | 08 |
| I.1.4.5.2. Radicaux libre non biologique | 08 |
| I.1.5. Sources métaboliques des radicaux libres..... | 09 |
| I.1.5.1. La production intracellulaire (endogène)..... | 09 |
| I.1.5.2. Production exogène..... | 09 |
| I.1.6. Rôles physiologiques des radicaux libres | 10 |
| I.2. Stress oxydatif..... | 11 |
| I.2.1. Définition | 11 |
| I.2.2. Conséquence du stress oxydatif | 12 |
| I.2.2.1.Conséquences biochimiques | 13 |
| I.2.3. Maladies liées au stress oxydant | 15 |

Chapitre II : Antioxydant et activité antioxydante

| | |
|---|----|
| II. Antioxydants..... | 16 |
| II.1. Introduction | 16 |
| II.2. Définition..... | 16 |
| II.3. Classification des antioxydants | 17 |
| II.3.1. En fonction de leur activité..... | 17 |
| II.3.2. En fonction de leur solubilité dans l'eau ou les lipides..... | 17 |
| II.3.3. En fonction de leur taille | 17 |
| II.4. Antioxydants et système de défense..... | 17 |
| II.4.1. Les antioxydants enzymatiques (endogène)..... | 18 |
| II.4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD) | 18 |
| II.4.1.2. La Catalase CAT | 19 |
| II.4.1.3. La glutathion peroxydase (GPX)..... | 19 |
| II.4.2. Antioxydants non-enzymatiques | 20 |
| II.4.2.1. Les antioxydants endogènes | 20 |
| II.4.2.2. Antioxydants exogènes..... | 22 |
| II.5. Mode d'action des antioxydants | 27 |
| II.6. La toxicité des antioxydants | 27 |

Chapitre III : Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

| | |
|---|----|
| III. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante | 29 |
| III.1. Introduction | 29 |
| III.2. Test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) | 29 |
| III.3. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power) | 30 |
| III.4. Test de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)..... | 30 |
| III.5. Test de piégeage du radical ABTS | 30 |
| III.6. Le test TRAP | 32 |
| III.7. Test de résonance paramagnétique électronique RPE..... | 32 |
| III.8. Méthode DMPD (dichlorhydrate de N, N-diméthyl-p-phénylène diamine) | 32 |
| III.9. Activité de chélation des métaux | 33 |
| III.10. Présentation de quelques composés de synthèses à l'effet antioxydant..... | 33 |

| | |
|---|----|
| III.10. 1. Effet antioxydant de quelques dérivés de 3-aryyl-1- (4 sulfamoylphényl) thiourée..... | 33 |
| III.10.2. Etude de l'activité antioxydante de quelques 1, 2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes portant des fractions sulfonylthiourées..... | 36 |

Liste des figures

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figure 01 : | formation des radicaux libres | 03 |
| Figure 02 : | La production d'ERO et ses conséquences cellulaires..... | 05 |
| Figure 03 : | Sites de production d'ERO dans la chaîne de transport des électrons Mitochondrie | 09 |
| Figure 04 : | La balance entre les espèces réactives oxygénées (ERO) et les Antioxydants | 12 |
| Figure 05 : | Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellule..... | 14 |
| Figure 06 : | Structure tridimensionnelle :(a) CAT, (b) GSHPx, (c) SOD, et Prx-I..... | 19 |
| Figure 07 : | Schématisation des molécules intervenant dans les protections Cellulaires..... | 20 |
| Figure 08 : | Structure du glutathion (GSH)..... | 21 |
| Figure 09 : | Structure chimique de l'acide urique..... | 21 |
| Figure 10 : | Structure de la vitamine E | 24 |
| Figure 11 : | Structures des caroténoïdes | 24 |
| Figure 12 : | Structure de la β -carotène | 25 |
| Figure 13 : | Structure chimique d'un flavonoïde quercétine | 25 |
| Figure 14 : | Structure chimique de la fluorescéine | 29 |
| Figure 15 : | 3-aroyle-1- (4-sulfamoylphényl) thiourée | 34 |

Liste des Schémas

| | | |
|--------------------|--|----|
| Schéma 01 : | Les molécules cible de l'attaque radicalaire | 12 |
| Schéma 02 : | Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées..... | 15 |
| Schéma 03 : | Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de L'oxygène | 18 |
| Schéma 04 : | la famille des antioxydants naturels | 22 |
| Schéma 05 : | Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux..... | 23 |
| Schéma 06 : | Réduction du complexe Fe ³⁺ (TPTZ) en Fe ²⁺ (TPTZ) | 30 |
| Schéma 07 : | Réduction du DPPH par un antioxydant | 31 |
| Schéma 08 : | La réaction chimique de l'ABTS | 32 |
| Schéma 09 : | Formation du radical DMPD et sa réaction avec les antioxydants(AOH) ... | 33 |
| Schéma 10 : | Synthèse des composés 4a-o | 34 |
| Schéma 11 : | Synthèse de molécule 12a-n..... | 36 |

Liste des tableaux

| | | |
|---------------------|---|----|
| Tableau 01 : | Différents types des espèces réactives | 05 |
| Tableau 02 : | Principaux rôles physiologiques des radicaux libres et ces dérivés..... | 10 |
| Tableau 03 : | Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées | 26 |
| Tableau 04 : | Principaux mode d'action de quelques antioxydants..... | 27 |
| Tableau 05 : | Activité inhibitrice de la 15-LOX (CI ₅₀ , µM) et potentiel Antioxydant des composés 4a-o..... | 35 |
| Tableau 06 : | Propriétés antioxydantes des 1, 2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes synthétisés (EC ₅₀) et% d'inhibition in vitro des valeurs de peroxydation lipidique de 12a-n..... | 37 |

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Température en degrés celsius

μM : Micromole

¹O₂: Oxygène singulet

AAPH : 2,2'-azobis (2-amidinopropane)

ABTS : 2,2-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline-Acide cationique 6-sulfonique

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGPI : Acide gras polyinsaturé

ATP : Adénosine triphosphate

BHA : Butylhydroxyanisole

BHT : Butylhydroxytoluène

CAT : Catalase

EC₅₀ : Concentration évoquant 50% d'activité

CI₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

DMPD : Dichlorhydrate de N, N-diméthyl-p-phénylène diamine

DPPH : 2,2- diphényl-1-picrylhydrazyle

DTNB : 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque)

ERA : Espèces réactives activés

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

Fe²⁺ : L'ion ferreux

Fe³⁺ : L'ion ferrique

FRAP : Capacités réductrices ferriques d'antioxydants

GPX : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion

GSHPx : Glutathion peroxydase dépendant du sélénium cellulaire

GSSG : Disulfure de glutathion

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HClO : Acide hypochloreux

LDLs : Lipoprotéines de basse densité dans le sang

LOO[•] : Peroxydes lipidiques

LOX : Lipoxygénase

LP : Peroxydation lipidique

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

mM : Millimole

MPO : Myéloperoxydase

MPOC : Maladie pulmonaire obstructive chronique

NAD(P)H : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADPHO : Dihydro nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase

NF-κB : Nuclear factor-kappa B

NO : Monoxyde d'azote

NO₂ : Dioxyde d'azote

NO₂[•] : Dioxyde de nitrogène

O₂^{•-} : Anion superoxyde

OH[•] : Radical hydroxyle

ONOO[•]: Peroxynitrite

ONOOH : Acide du peroxynitrite

ORAC : Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène

PI : Pourcentage d'inhibition

Prx-I : Peroxirédoxine

R[•] : Radical alkyle

RNS : Radicaux libres azotés

RO[•] : Radical alkoxyde

ROO[•] : Radical peroxyde

ROOH: Peroxyde organique

ROS: Reactive oxygen species

RPE : Résonance paramagnétique électronique

RSNO : S-nitroso thiols

SH : Sulfhydryle

SOD : Superoxyde dismutase

TRAP : Paramètre du piégeage du radical total

UV : Ultraviolet

XO : Xanthine oxydase

HPSC : Capacité d'élimination du peroxyde d'hydrogène

*Introduction Générale et
objectif du travail*

Introduction générale

L'oxygène, élément indispensable à la vie pour les organismes aérobies, est à l'origine de la formation de composés peu stables mais hautement réactifs et toxiques. Des processus physiologiques, certaines activités enzymatiques, l'auto-oxydation des molécules physiologiques, génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui sont capables d'entraîner des effets délétères dans l'organisme.

Le stress oxydatif est un déséquilibre dû à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et à une diminution des défenses antioxydantes responsable de plusieurs pathologies. Cependant, des études récentes ont également mis en évidence le rôle physiologique des ERO en tant que promoteurs des défenses naturelles (par exemple l'apoptose) [1]. Le stress oxydant peut être de courte durée et, grâce aux systèmes antioxydants, limité, avec un retour rapide à un état redox physiologique [2].

L'oxydation est l'un des processus les plus producteurs des radicaux libres dans les aliments et les tissus vivants. Ces radicaux causent des dégradations majeures dans les macromolécules et l'acide nucléique [3]. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants [4].

L'étude et l'évaluation des antioxydants synthétiques sont devenues un objet de recherche populaire et fiable car il vise à développer et découvrir de nouvelles molécules antioxydantes puissantes sans risque sur l'organisme.

Ce travail porte sur l'étude bibliographique de l'activité antioxydante, les méthodes expérimentales de son évaluation et la capacité antioxydante des composés organiques de synthèse.

Notre travail sera présenté comme suit :

Le premier chapitre consiste à une étude bibliographique sur les radicaux libre et le stress oxydatif. Le deuxième chapitre présente un aperçu sur les systèmes antioxydants enzymatique et non enzymatique.

Le troisième chapitre concerne les différentes méthodes pour l'évaluation de l'activité antioxydante et aussi mener d'une présentation de quelques composées de synthèse organique étudiés en tant qu'antioxydants dans des travaux déjà réalisés.

Etude

Bibliographique



Chapitre I

Les radicaux libres

et

stress oxydant

I. Introduction

Radicaux libres, espèces oxygénées activées (EOA), stress oxydant et antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public. Au début des années 2000, ces notions n'étaient généralement évoquées que dans les congrès scientifiques. Mais ces dernières années, l'industrie pharmaceutique, les laboratoires d'analyses médicales et la presse grand public ont massivement diffusé des informations relatives aux antioxydants [1].

Les radicaux libres participent à un large éventail de domaines de la chimie, y compris la chimie sous rayonnement ionisant, la chimie des éléments radioactifs, la chimie organique, inorganique et la photochimie. Les réactions d'oxydation et de réduction comprennent généralement des intermédiaires radicalaires. Ces interactions sont omniprésentes dans le milieu de vie et a régissent des processus importants tels que la reproduction des espèces, les mutations et la défense contre les maladies. Ces réactions surviennent lors du vieillissement et de certaines maladies [2].

L'oxydation est le processus le plus productif de radicaux libres dans les aliments et les tissus vivants. Ces radicaux provoquent une dégradation importante des particules d'acide nucléiques [3].

II. Les radicaux libres

II.1. Historique

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé la compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes [4].

Les radicaux libres ont été découverts dans les systèmes biologiques il y a environ soixante ans. En 1956, Harman a soulevé une hypothèse liée au vieillissement cellulaire : elle est causée par l'accumulation de dommages cellulaires et moléculaires causés par les radicaux libres dus à l'oxygène. Ces radicaux libres, bénéfiques pour l'organisme à faibles doses, sont produits par divers mécanismes physiologiques. Lorsque la production devient excessive, divers systèmes antioxydants sont créés mais peuvent être surmontés. Ce déséquilibre entre la production d'ERO et les capacités antioxydants cellulaires correspond au stress oxydatif [5].

La biochimie des radicaux libres est née en 1960, quand McCord et Fridovich montrent que l'anion superoxyde est sécrété en milieu vivant [2].

En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humaines un système enzymatique antioxydant la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ERO 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 [4].

II.2. Définition

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé : espèces réactives de l'oxygène [3]. Il est caractérisé par un temps de demi-vie extrêmement court (10^{-9} - 10^{-3} s). Il peut se former soit par la réaction redox (gain ou perte d'un ou de plusieurs électrons), soit par la fission homolytique (rupture de la liaison covalente par laquelle chaque atome possède un électron) (Figure 01) [6].

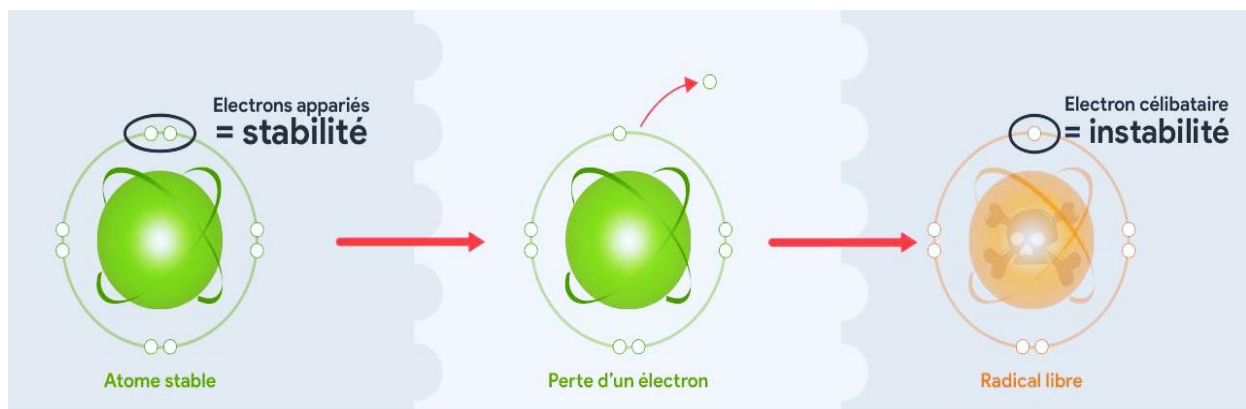


Figure 01 : Formation des radicaux libre [07].

Les radicaux libres agissent comme des accepteurs d'électrons et arrachent donc des électrons à d'autres molécules, Cette perte caractéristique d'un électron correspond au phénomène d'oxydation et considérés comme des agents oxydants puisqu'ils incitent les molécules à donner des électrons [8]. Les radicaux libres sont générés dans les processus aérobiques comme la respiration cellulaire, l'exposition aux infections microbiennes impliquant l'activation des phagocytes, pendant l'activité physique intensive ou l'action des polluants et toxines telles que la fumée de cigarette, l'alcool, ionisation et radiations UV, les pesticides et l'ozone [9].

Les radicaux libres en excès qui ne sont pas neutralisés par les défenses endommagent gravement les molécules primaires de nos cellules, entraînant une expression anormale des gènes

et des récepteurs membranaires, une prolifération ou la mort cellulaire, des troubles immunitaires, des mutations, des protéines ou des dépôts de lipofuscine dans les tissus [10].

II.3. Différents types des radicaux libres

Il existe de nombreux composés oxydants qui se forment par oxydation en consommant l'oxygène que nous respirons :

- ✓ **Les radicaux libres primaires** : ils dérivent directement de l'O₂ par une réaction de réduction.
- ✓ **Les radicaux libres secondaires** : ils sont formés par la réaction des radicaux libres primaires sur des composés biochimiques cellulaires.
- ✓ **Les espèces actives de l'oxygène** : ce sont des molécules ne possédant pas d'électron non apparié mais au fort pouvoir oxydant car elles peuvent donner naissance à des radicaux libres.

Les radicaux libres primaires et secondaires et les espèces actives de l'oxygène sont regroupées sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène ou ERO (ou « ROS » reactive oxygen species) [5].

II.4. Nature des radicaux libres

II.4.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'oxygène (O₂) est un élément essentiel pour des processus de la vie en aérobie. Cependant, environ 5 % ou plus de l'O₂ inhalé est converti en espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO présentent un groupe de composés dérivés de la réduction incomplète de l'oxygène moléculaire [11].

Les ERO sont des médiateurs importants de la signalisation pendant divers processus biologiques, ils sont produits en réponse à des divers stimuli, y compris des facteurs de croissance, des cytokines et des facteurs chimiotactiques [12].

La présence d'ERO dans les matériaux biologiques a été relevée il y a cinquante ans. Dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire lorsque leur production est aiguë et transitoire, les ERO jouent le rôle de seconds messagers et participent activement à la signalisation cellulaire. C'est quand ils sont produits de manière incontrôlée ou chronique, ou lorsque les défenses antioxydantes ne sont pas suffisamment puissantes qu'ils sont à l'origine de stress oxydant comme le schématise la (Figure 02) ci-dessous [13].

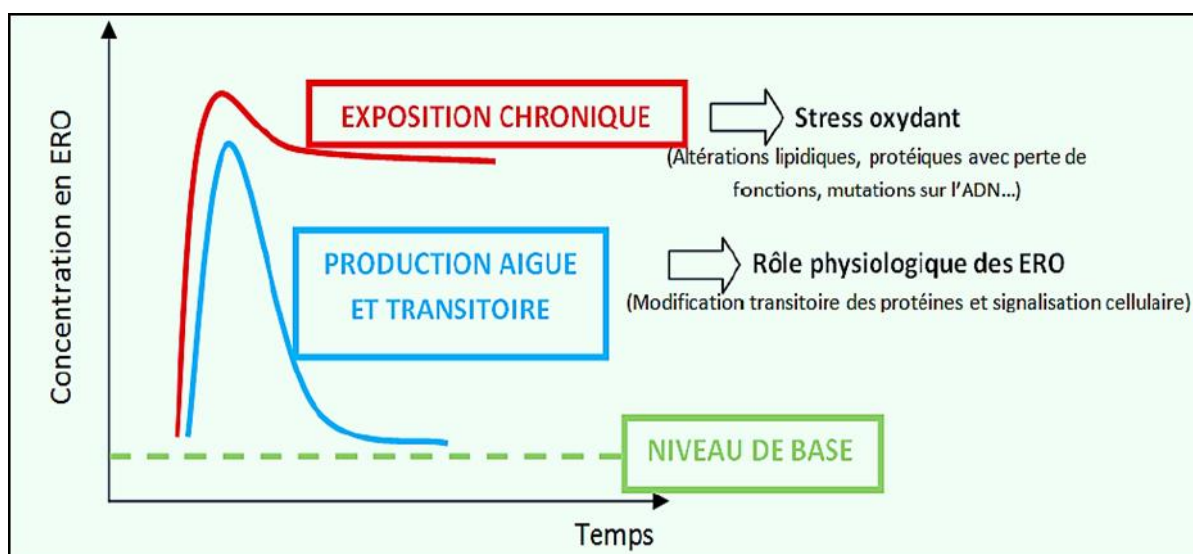


Figure 02 : La production d'ERO et ses conséquences cellulaires [14].

Il existe deux types des espèces réactives et ils sont résumés dans le tableau suivant (Tableau01):

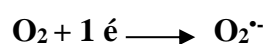
Tableau 01 : Différents types des espèces réactives [15].

| Espèces radicalaires | | Espèces non radicalaires | |
|----------------------|----------------|--------------------------|-----------------|
| Nom | Symbole | Nom | Symbole |
| Anion superoxyde | $O_2^{\cdot-}$ | Acide hypochloreux | HClO |
| Monoxyde d'azote | NO^{\cdot} | Oxygène singulet | 1O_2 |
| Radical alkoxyde | RO^{\cdot} | Peroxyde d'hydrogène | H_2O_2 |
| Radical hydroxyle | OH^{\cdot} | Peroxyde organique | ROOH |
| Radical peroxyde | ROO^{\cdot} | Peroxynitrite | $ONOO^{\cdot-}$ |

II.4.2. Les espèces réactives de l'oxygène radicalaires

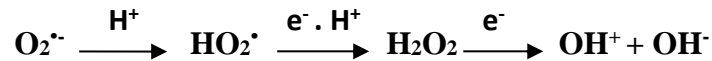
❖ Anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$

Dans la respiration cellulaire, le processus de réduction des molécules d'oxygène par un seul électron est la principale source endogène de $O_2^{\cdot-}$ [16], D'après :

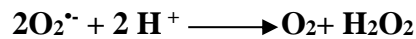


Le superoxyde résulte d'une réduction de l'oxygène par diverses oxydases, tels que la dihydro nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPHO), la xanthine oxydase (XO) et la cyclo-oxygénase. Les radicaux superoxydes peuvent également être formés dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons, au cours de la phosphorylation oxydative qui

produit l'ATP. Le radical résultant est un précurseur à d'autres ERO, y compris le radical hydroxyle (OH[•]).



L'anion superoxyde peut être dismuté, produisant l'oxygène moléculaire et le peroxyde d'hydrogène.



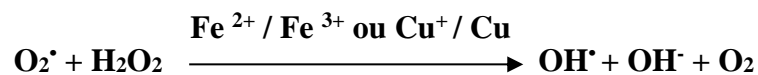
Le radical superoxyde peut être transformé par des enzymes appartenant à la famille du superoxyde dismutase (SOD), qui détruisent les radicaux superoxydes dans la chaîne de transport d'électrons [17].

❖ Le radical hydroperoxyde (HO₂[•])

C'est une forme protonée de l'anion superoxyde. Le radical hydroperoxyde est à la fois un oxydant et un réducteur plus fort que l'anion superoxyde, mais il est beaucoup moins stable que l'anion superoxyde à pH 7.4. A cette valeur de pH physiologique, le HO₂[•] se dissocie donnant le radical superoxyde [18].

❖ Le radical hydroxyle (OH[•])

C'est une espèce radicalaire très agressive, responsable de la plupart des dommages oxydatifs des biomolécules. Il a été rapporté comme le radical oxydant le plus puissant qui peut interagir au niveau du site de sa génération avec la plupart des molécules (ADN, protéines, lipides, acides aminés et sucres) [18]. La présence d'ions métalliques catalyse la voie connue comme la réaction de Fenton. Dans ce procédé, le substrat, qui est le peroxyde d'hydrogène, génère le radical hydroxyle [16].



❖ Les radicaux peroxydes

Le processus de la chaîne de peroxydation lipidique est un générateur des groupes des radicaux : peroxydes (ROO[•]), hydrocarbures (R[•]), lipidiques (L[•]) et peroxydes lipidiques (LOO[•]). La plupart d'entre eux sont capables d'induire un état singulet de la molécule d'oxygène (¹O₂) [16].

II.4.3. Les espèces oxygénées non radicalaires

❖ Oxygène singulet $^1\text{O}_2$

C'est une forme très réactive de l'oxygène d'une durée de vie très limitée (10^{-4}s). Sa formation est très importante dans les réactions photochimiques. L'oxygène singulet réagit souvent par fixation à la double liaison pour former un endoperoxyde qui peut être réduit pour former un radical Alkoyle. Ce dernier initie les réactions radicalaires [19].

❖ Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant très fort de deux électrons, mais à cause de l'énergie d'activation élevée, la plupart de ses réactions d'oxydation à deux électrons sont trop lentes pour être biologiquement pertinentes [20]. Le peroxyde d'hydrogène n'oxyde pas directement les molécules sensibles aux oxydants dans l'usage courant. Il est beaucoup plus réactif avec les métaux de transition, soit sous la forme de complexes de faible poids moléculaire ou des métalloprotéines. Les complexes métalliques résultants peuvent réagir avec une large gamme de substrats, y compris les molécules sensibles aux oxydants, pour générer des radicaux libres [21].

II.4.4. Autres espèces réactives de l'oxygène

- **L'acide hypochloreux (HClO)**

L'acide hypochloreux ressort grâce à la présence de la myéloperoxydase (MPO) dans les macrophages et les neutrophiles. Il est doté d'une capacité oxydante très élevée [21].

La myéloperoxydase est responsable de la production catalytique de l'acide hypochloreux à partir du peroxyde d'hydrogène en présence de l'anion chlorure (Cl^-). Le HClO provoque la Chloration oxydative sur les biomolécules telles que les lipides, les protéoglycanes, les acides aminés, ainsi que d'autres composés intracellulaires ou membranaires [18].

- **Monoxyde d'azote (NO), peroxyde d'azote (ONOO^\bullet) et dioxyde de nitrogène (NO_2^\bullet)**

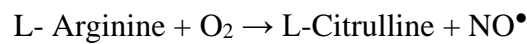
L'oxyde nitrique endogène (monoxyde d'azote: NO) est synthétisé à partir de la L-arginine, de l'oxygène et du NADPH, par la NO synthase (NOS) ou par réduction du nitrate inorganique. Il est également libéré par les phagocytes (monocytes, macrophages et neutrophiles) en tant que résultat de la réaction du système immunitaire [18]. Il réagit avec l'anion superoxyde, donnant une espèce d'azote très réactive (peroxyde d'azote: ONOO^\bullet), qui est un puissant oxydant de nombreuses molécules biologiques [16]. Le peroxyde d'azote peut par la suite être décomposé en radicaux hydroxyle et dioxyde de nitrogène (NO_2^\bullet) [21].

II.4.5. Autres radicaux libres

II.4.5.1 Radicaux libres biologiques

- **Radicaux libres azotés (RNS)**

Monoxyde d'azote NO[•] est principalement produit par un système enzymatique, qui transforme l'arginine en citrulline en présence de la NADPH [22], D'après :



Il est aussi possible de le produire par réduction des nitrites en nitrates sans l'aide d'enzyme. Le NO[•] peut réagir avec les fonctions thiols en donnant naissance aux *S-nitroso thiols* (RSNO), avec les métaux de transition (fer, cuivre) et avec l'anion superoxyde pour former le Peroxynitrite [23].

La forme acide du peroxynitrite (ONOOH) est un oxydant fort, dont la rupture produit deux Oxydants puissants (NO₂[•], OH[•]). Il peut également s'additionner au CO₂ pour donner un adduit instable, qui donne par la suite les radicaux NO₂[•] et CO₃^{•-} [24].

- **Radicaux libres soufrés**

Ils ont comme origine l'oxydoréduction à un électron du couple disulfure/dithiol de protéines ou de petits peptides. Le principal disulfure cellulaire est le glutathion, qui est un tripeptide dont la concentration dans le cytosol peut aller jusqu'au mM. Dans le milieu intracellulaire réducteur, il est présent à l'état réduit thiol (GSH). Lors d'une attaque oxydante, il se dimérise pour donner GSSG, tout en passant par le radical thiyle (GS[•]) qui est un oxydant fort, puis un disulfure (GSSG^{•-}) [2].

- **Radicaux libres à partir de Flavines et Quinones**

Les quinones et les flavines sont aptes à transférer les électrons un à un. Leurs formes radicalaires sont stabilisées par résonance. Ce sont des cofacteurs enzymatiques [2].

II.4.5.2. Radicaux libres non biologique

Radical 2,2-diphényl-1picrylhydrazyl (DPPH[•]) Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α , α -diphényl- β - picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure activité antioxydante des composés phénoliques [25]. Ainsi que le radical cation ABTS^{•+} (sel d'ammonium de 2,2-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline-Acide cationique 6-sulfonique)). L'AAPH (le sel di chloré du 2,2'-azobis (2-amidinopropane)) n'est pas un radical libre mais cette molécule peut être utilisée comme générateur de radicaux libres notamment dans les études de la peroxydation lipidique [26].

II.5. Sources métaboliques des radicaux libres

II.5.1. La production intracellulaire (endogène)

L'une des sources majeures des ERO est la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette production résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire. Une telle réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial [27]. Dans les conditions physiologiques, la chaîne respiratoire mitochondriale est la source la plus significative des ERO dans les cellules des mammifères (Figure 03). Les ERO libérés par les mitochondries peuvent être balayés par les systèmes antioxydants cellulaires, ou causer des dommages oxydatifs des acides gras polyinsaturés dans les membranes biologiques, des protéines et des acides nucléiques [28].

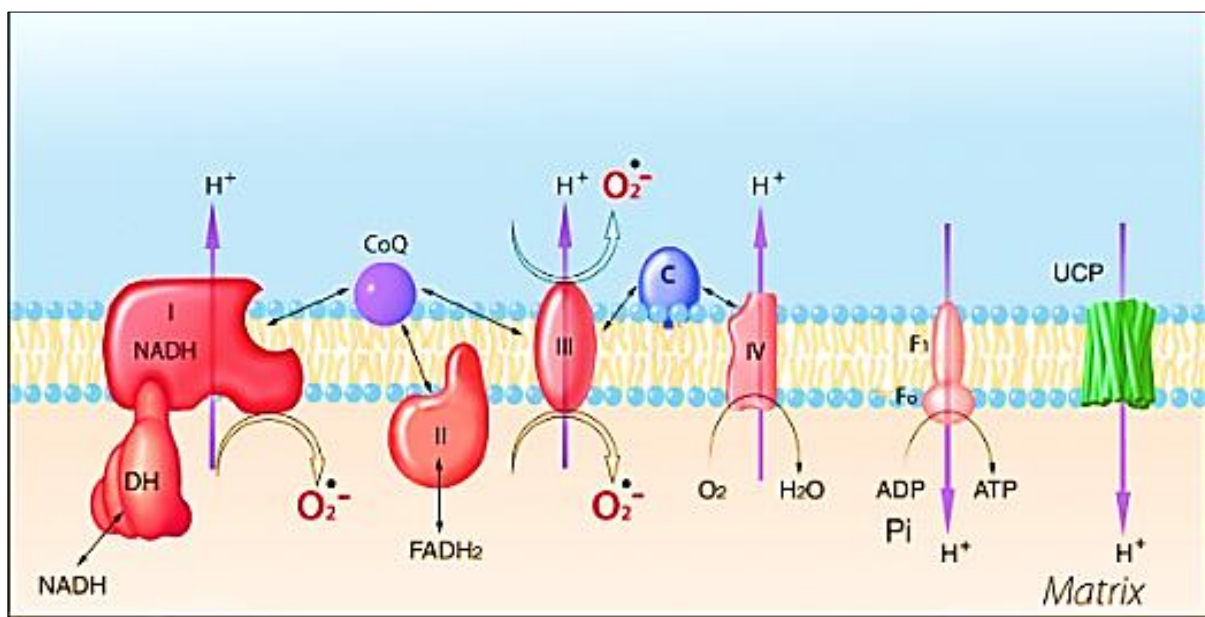


Figure 03 : Sites de production d'ERO dans la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie [29].

II.5.2. Production exogène

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV (ultra-violet) induisent la synthèse de radicaux libres et de molécules génératrices de radicaux libres par l'intermédiaire d'agents photo-sensibilisants. Les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène.

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes. Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂), présents dans notre environnement (goudron, tabac, polluants industriels), sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires [27].

II.6. Rôles physiologiques des radicaux libres

Les radicaux libres ont les fonctions physiologiques suivantes (Tableau 02) :

Tableau02 : Principaux rôles physiologiques des radicaux libres et ces dérivés [30].

| Espèce | Rôle physiologique |
|---|---|
| O₂·⁻ et dérivés | Transduction du signal. Relaxation du muscle lisse. Activation du facteur nucléaire (NF-κB) responsable de l'expression du gène de l'interleukine 2 (IL-2). Activation de la protéine kinase C. Amélioration des fonctions immunologiques par amplification du signal intracellulaire. dans les lymphocytes T. Induction de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales. Induction et exécution du phénomène d'apoptose. |
| NO· | Relaxation des muscles lisses. Modulation des fonctions des protéines kinases, phosphodiesterases, et des canaux ioniques. Activation des MAPK des cellules endothéliales et monocytes. Protection contre l'apoptose par inhibition de certaines cascades. |

III. Stress oxydatif

Des composés à fort potentiel oxydant, sont produits constamment en situation physiologique au sein d'un organisme. Il se met alors en place un système antioxydant. En situation normale, la balance antioxydant/prooxydant est équilibrée. Mais l'organisme peut être confronté à une surexposition à des composés oxydants lorsque la production endogène d'ERO devient excessive ou suite à l'exposition à un phénomène toxique exogène. Lorsqu'un déséquilibre intervient, on parle de stress oxydatif ou stress oxydant [5].

En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des ERO, suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue de ROS, soit à une diminution de la capacité de défenses antioxydantes [31].

La pollution, le tabagisme, l'alcoolisme, la prise des contraceptifs, l'exposition prolongée au soleil ou à des radiations, la pratique du sport de haut niveau et l'inflammation chronique sont des sources de production des ERO. Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouve la majeure partie des antioxydants exogènes nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols) favorise une baisse de la capacité antioxydante. Le stress oxydant peut être de courte durée et, grâce aux systèmes antioxydants, limité, avec un retour rapide à un état redox physiologique. Un déséquilibre redox prolongé a des conséquences en pathologie et dans le vieillissement des tissus [32].

III.1. Définition

Le stress oxydatif a été défini comme le déséquilibre entre la présence d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ERO et ERA) et la capacité de l'organisme à neutraliser leur action par les systèmes de protection antioxydants [33].

Le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer [34].

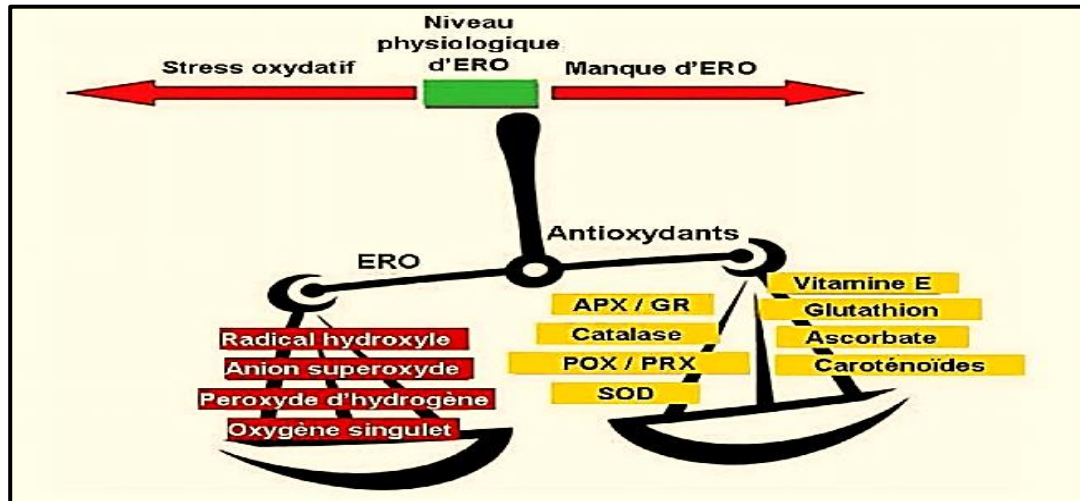


Figure 04 : La balance entre les espèces réactives oxygénées (ERO) et les antioxydants [35].

III.2. Conséquence du stress oxydatif

Les espèces activées de l'oxygène de par leur structure électronique instable peuvent attaquer les composants cellulaires (schéma 01). Les molécules biologiques : protéines, les lipides, glucides et l'ADN sont sujettes à l'attaque radicalaire, provoquant ainsi un Dysfonctionnement dans les activités vitales des cellules à l'origine du développement de diverses pathologies [36].

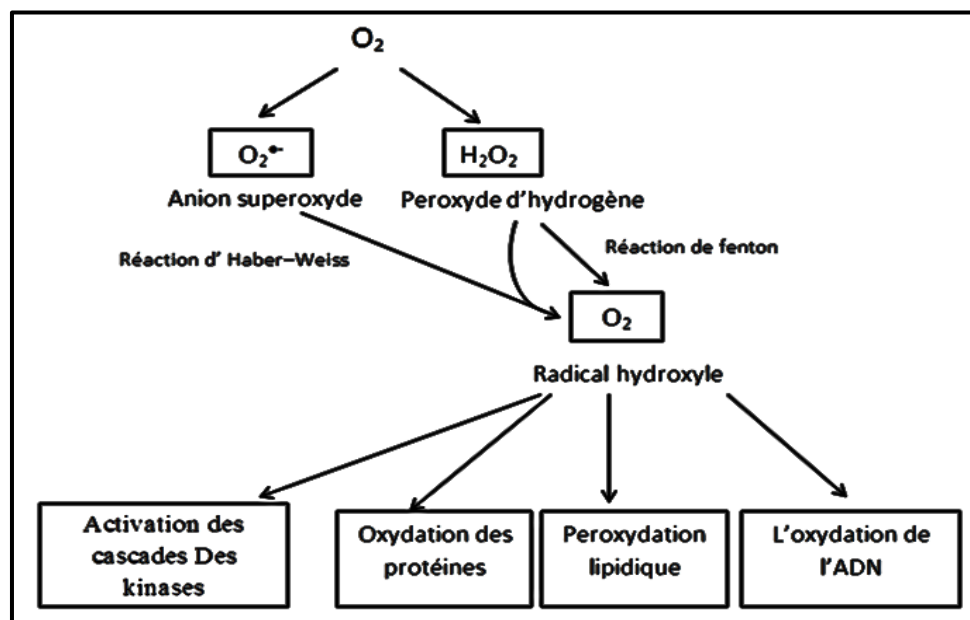


Schéma 01 : Les molécules cibles de l'attaque radicalaire [36].

III.2.1. Conséquences biochimiques

- **Dommages oxydatifs des protéines**

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) [4].

- **Dommages oxydatifs sur l'ADN**

L'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Au bas mot, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par OH^\bullet peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées [4].

L'ADN est plus vulnérable aux dégâts oxydatifs, les ERO peuvent réagir avec la guanine, base constitutive de l'ADN, pour la transformer en 8-hydroxy-2' désoxyguanosine qui est capable d'induire des mutations spécifiques. Les dégâts sur l'ADN peuvent résulter en des cassures de brins, des enchainements croisés protéines-ADN et des modifications de bases. La figure 05 résume les dommages de l'ADN causés par les radicaux libres. L'accumulation de dommages oxydatifs à l'ADN risque de développer un cancer au cours de la vie. Les mécanismes oxydatifs ont été reconnus pour avoir un rôle important à jouer dans les principales étapes de la carcinogenèse, soit l'initiation, la promotion et la progression du cancer [36].

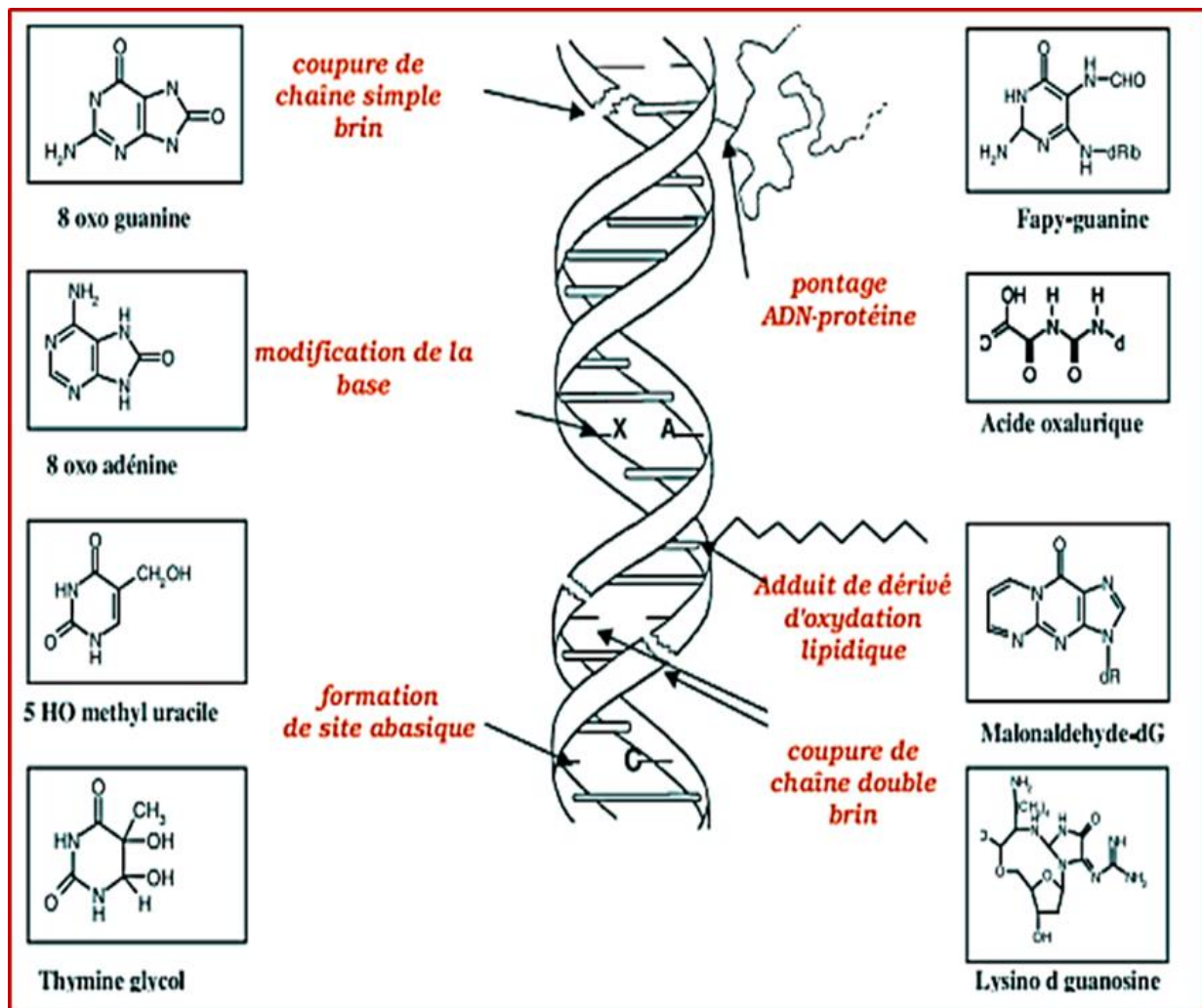


Figure 05 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.

- **Oxydation des lipides**

Un acide gras polyinsaturé (AGPI) est la cible lipidique majeure des ERO. Les membranes plasmiques et des organites cellulaires sont particulièrement vulnérables. La peroxydation lipidique est la détérioration oxydative des acides gras polyinsaturé, dans notre organisme, des lésions d'origine radicalaire sont en effet susceptibles de modifier la structure des lipides, qui va se propager à d'autres types moléculaires et produire des aldéhydes génotoxiques.

Les produits de peroxydation lipidique (4-Hydroxynonanal, malondialdéhyde) sont hautement délétères pour les cellules. Le 4-Hydroxynonanal peut oxyder les protéines en se liant à leur groupement thiol (SH). La peroxydation des lipides membranaires altère la fluidité et les propriétés biologiques de la membrane et peut mener à l'inactivation d'enzymes et de récepteurs liés à la membrane, ce qui risque d'affecter le fonctionnement cellulaire normal et d'augmenter la perméabilité. La peroxydation lipidique contribue également au phénomène du vieillissement et

semble responsable du développement de nombreuses maladies liées à l'âge, donc de diverses maladies chroniques [36].

III.3. Maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies (schéma 02) comme facteur déclenchant ou associé à des complications. Il peut être associé à l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers [34]. Néanmoins, Le seul facteur commun favorisant le stress oxydant est l'âge, dans la mesure où le vieillissement affaiblit les réponses antioxydantes et perturbe la respiration mitochondriale [37].

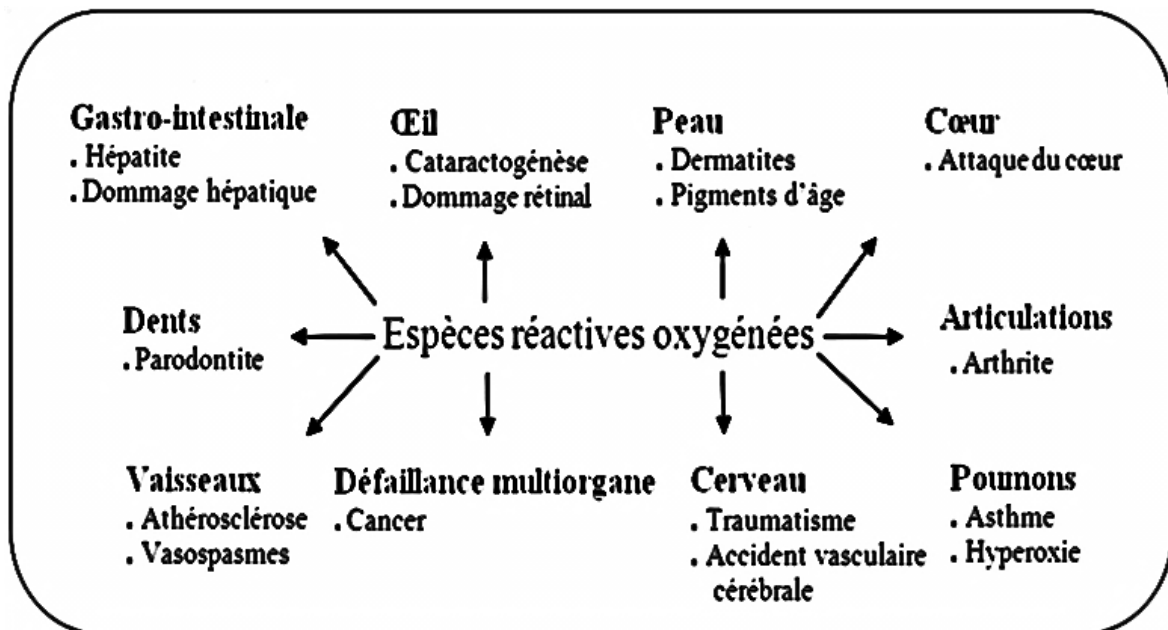


Schéma 02 : Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées [34].

Chapitre II

Antioxydants

et

Activité antioxydante

II. Antioxydants

II.1.Introduction

A l'origine, le terme antioxydant était utilisé pour désigner spécifiquement un produit chimique qui empêchant la consommation d'oxygène. A la fin du XIX^{ème} Siècle et au début du XX^{ème} siècle les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisation dans les procédés industriels afin de réduire par exemple, La vulcanisation du caoutchouc et la polymérisation des carburants dans les moteur à explosion.

Les premières recherches ont mis en évidence l'utilisation d'antioxydants pour empêcher l'oxydation des graisses insaturées qui est la cause du rancissement par leur rôle dans le milieu biologique. L'activité antioxydante pourrait être mesurée simplement en plaçant la graisse dans un récipient fermé contenant de l'oxygène et en mesurant le taux de consommation d'oxygène. [38]. Les antioxydants peuvent ralentir l'oxydation des matières grasses et des huiles de quatre façons possibles :

- Don d'hydrogène par l'antioxydant;
- Don d'électrons par l'antioxydant;
- Addition du lipide à l'antioxydant;
- Formation d'un complexe entre le lipide et l'antioxydant [39].

L'identification des vitamines A, C et E comme antioxydants a été l'une des principales raisons de comprendre l'importance des antioxydants dans la biochimie des organismes vivants. [38].

II.2.Définition

Un antioxydant est une molécule naturelle ou synthétique qui inhibent ou retardent l'oxydation d'autres molécules en intervenant à différents stades du processus d'oxydation [40]. C'est une molécule suffisamment stable pour donner un électron à un radical libre déchainé et le neutraliser, réduisant ainsi sa capacité d'endommager [41].

Il peut agir de différentes façons : piéger les composés qui initient la réaction radicalaire, piéger les ions métalliques tel que Fe^{2+} , neutraliser l'anion Superoxyde pour éviter la formation de peroxydes, terminer la réaction de propagation dans la réaction radicalaire mise en place ou réduire la concentration en O_2 [40].

II.3. Classification des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés de plusieurs façons :

II.3.1. En fonction de leur activité

Ils peuvent être classés comme enzymatiques et non enzymatiques :

- **Les antioxydants enzymatiques**

Cela fonctionne en brisant les radicaux libres et en les éliminant. Les enzymes antioxydantes transforment les produits d'oxydation dangereux en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) puis en eau, selon un procédé en plusieurs étapes en présence de catalyseurs tels que le cuivre, le zinc, le manganèse et le fer [41].

- **Les antioxydants non enzymatiques**

Agissent en interrompant les réactions en chaîne des radicaux libres. Parmi ces antioxydants, la vitamine C, la vitamine E, le polyphénol végétal, caroténoïdes et glutathion [41].

II.3.2. En fonction de leur solubilité dans l'eau ou les lipides

Les antioxydants peuvent être classés en tant qu'antioxydants solubles dans l'eau et liposolubles. Les antioxydants solubles dans l'eau (vitamine C) se trouvent dans les acides cellulaires tels que le cytosol ou la matrice cytoplasmique. Les antioxydants liposolubles (tels que la vitamine E, les caroténoïdes et l'acide lipoïque) se trouvent principalement dans les cellules de la membrane [41].

II.3.3. En fonction de leur taille

Les antioxydants peuvent être également classés en petites molécules et en grosses molécules. Les antioxydants à petites molécules neutralisent les ERO dans un processus appelé nettoyage radical et les emporter. Les principaux antioxydants de cette catégorie sont la vitamine C, la vitamine E, caroténoïdes et glutathion (GSH).

Les antioxydants à grandes molécules sont des enzymes (SOD, CAT et GSHPx) et des protéines sacrificielles (albumine) qui absorbent les ERO et les empêchent d'attaquer d'autres protéines essentielles [41].

II.4. Antioxydants et système de défense

Les antioxydants sont incorporés dans cette région comme toute substance présente à une faible concentration par rapport au substrat oxydant, ce qui contribue à ralentir ou à empêcher l'oxydation de ce substrat [42]. Ce modèle fonctionnel s'applique à un grand nombre de

substances, des enzymes qui ont des propriétés catalytiques spécifiques, ainsi qu'aux petites molécules solubles dans l'eau ou les graisses. Cette grande diversité chimique permet la présence d'antioxydants dans toutes les parties du corps, qu'elles soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires [42].

II.4.1. Les antioxydants enzymatiques endogène

Le système défensif comprend des enzymes antioxydantes internes telles que le Superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX), la catalase (CTA) (Schéma 03) [18].

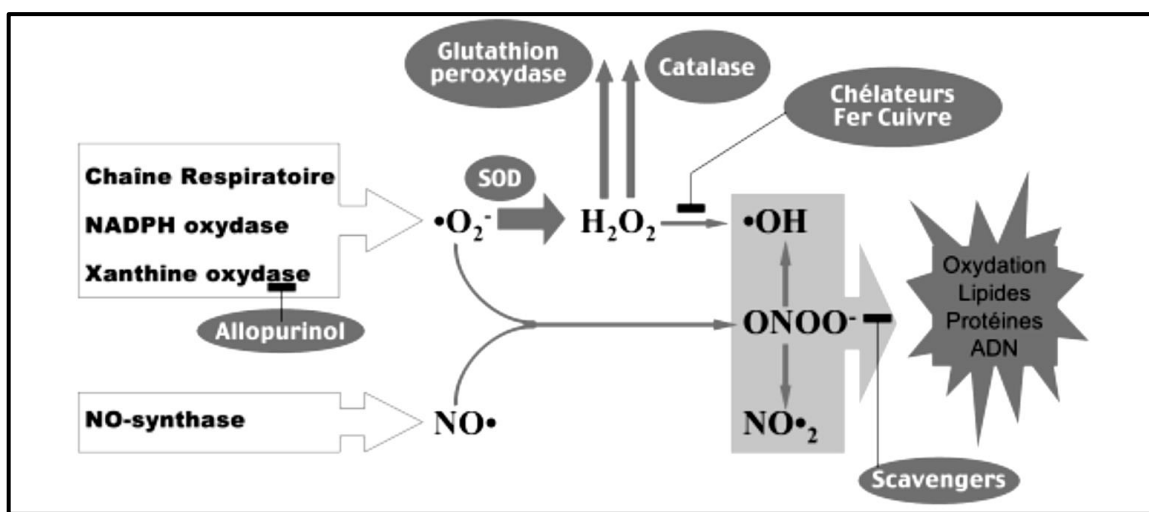
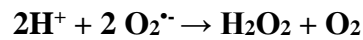


Schéma 03 : Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène [42].

II.4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Superoxyde dismutase (SOD) est une protéine minérale qui a une activité enzymatique qui lui permet d'améliorer la dégradation de l'anion Superoxyde $O_2^{\bullet-}$ [43]. Il existe de nombreuses SOD, et elles diffèrent par le ou les minéraux (métaux) présents dans leur structure [44].

Une molécule montrant une activité SOD in vitro doit être non toxique, stable, avoir une longue demi-vie, ne pas former de complexes ternaires avec les composants cellulaires, réagir lentement avec l'oxygène moléculaire sous sa forme réduite, être capable de traverser des membranes cellulaires et de gagner un site hydrophile ou lipophile [4]. Cela permettra la liaison enzyme-ligand. Il est important de noter qu'il existe trois différentes classes de SOD : la SOD à cuivre et à zinc que l'on trouve dans le cytosol et au niveau des liquides extracellulaires, la SOD à fer et la SOD à manganèse, dans les mitochondries [43].



II.4.1.2. La Catalase CAT

La catalase est une enzyme présente dans les cellules des plantes, des animaux et des bactéries aérobies [41]. La catalase se trouve principalement dans un organe cellulaire nommé Les peroxysomes, dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales [43]. Elle convertit le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en eau et en oxygène, qui ont une affinité inférieure à GPX. Des concentrations importantes de CAT ont de nouveau été trouvées dans les fibres musculaires oxydées [44].



II.4.1.3. La glutathion peroxydase (GPX)

Ces enzymes dépendent du sélénium. La glutathion peroxydase (GPX) se trouve dans le cytoplasme car elle joue un rôle important dans la régulation de l'état d'oxydation et de la réduction physiologique au sein des cellules vasculaires. Stimule la réduction des hydro peroxydes (H_2O_2) et des peroxydes lipidiques en utilisant du glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène [2].

Les antioxydants enzymatiques (figure 06), réduisent les niveaux d'hydroperoxyde lipidique et de H_2O_2 , elles sont donc importantes dans la prévention de la peroxydation lipidique et le maintien de la structure et fonction des membranes cellulaires. Exemples des antioxydants enzymatiques :(CAT, GSHPx, SOD, et la peroxirédoxine) [41].

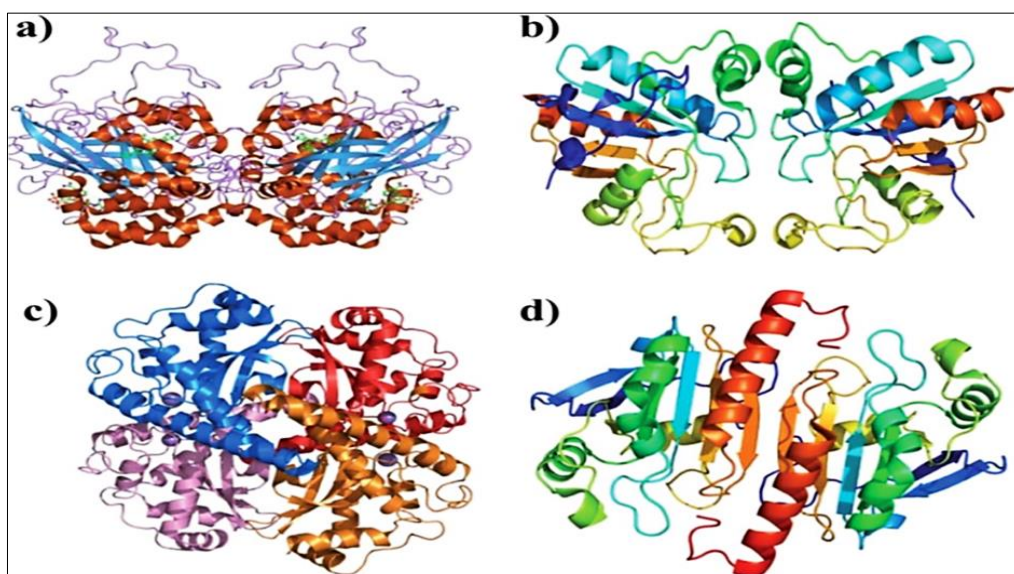


Figure 06 : Structure tridimensionnelle : (a) CAT, (b) GSHPx, (c) SOD, et Prx-I [41].

Il existe plusieurs antioxydants enzymatiques (figure 07), notamment la peroxyoxine, la thiouroxine réductase et la glutathion peroxydase, principalement dans les cellules, de sorte qu'ils sont responsables de l'inactivation de H_2O_2 ainsi que des peroxydes organiques, de la production d'eau et d'alcool, et d'oxygène [18].

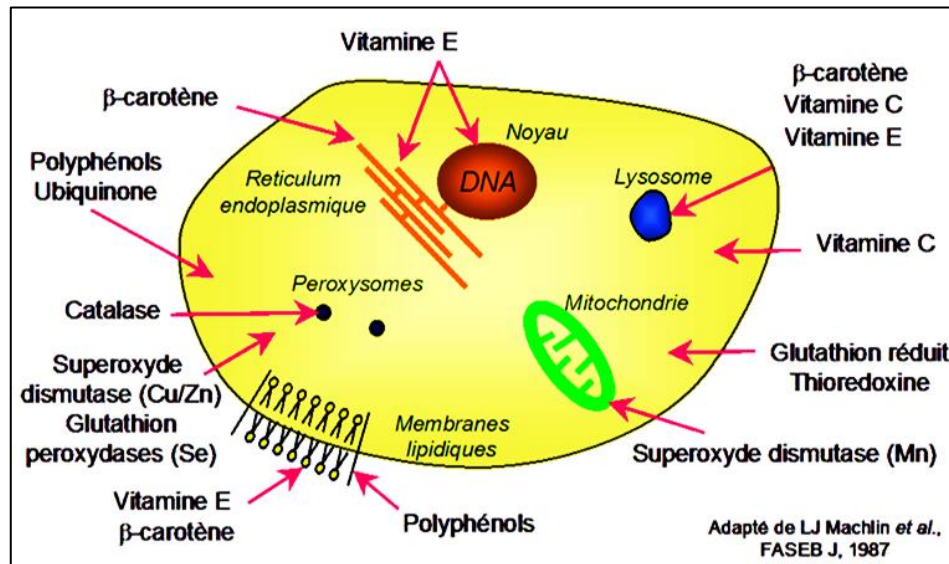


Figure 07: Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires [45].

II.4.2. Antioxydants non-enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques sont divisés en antioxydants métaboliques (endogènes) et aussi des nutriments antioxydants (exogènes).

Les antioxydants non-enzymatiques sont nombreux et de divers types. Commençons par les vitamines qui sont des antioxydants exogènes, c'est-à-dire extérieurs à l'organisme. La vitamine C est un piègeur de radicaux libres. La vitamine A s'associe aux radicaux peroxydes pour éviter la propagation de la peroxydation lipidique. Elle existe sous trois formes : le rétinol, le rétinal et l'acide rétinoïde. La vitamine E peut stopper la réaction radicalaire en chaîne. La forme la plus active de la vitamine E est l' α -tocophérol [40].

II.4.2.1. Les antioxydants endogènes

Les systèmes antioxydants non enzymatiques endogène comprennent de nombreux thiols, la plupart sont du glutathion.

➤ Le glutathion

Le glutathion tri peptide γ -glutamyl-cysteinyl-glycine, (GSH) (Figure 08) est l'un des principaux thiols non protéiques de faible poids moléculaire [46]. Qui joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de coenzyme de GSHP_x.

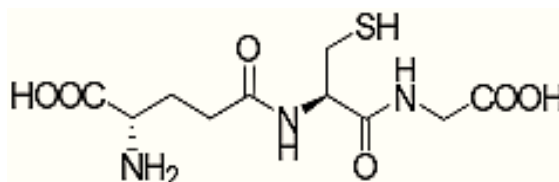


Figure 08 : Structure du glutathion (GSH).

Il fait aussi l'objet d'interaction synergique avec d'autres composants du système de protection antioxydante tel que la vitamine C ou la vitamine E [47].

➤ L'acide urique

L'acide urique (figure 09) est le Produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux (OH[•], ROO[•], NOO[•] ...). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C). Les propriétés antioxydantes de l'urate in vivo peuvent être appréciées indirectement par le fait qu'un produit de réaction de l'urate avec les EOA, l'allantoïne, est présent à des taux élevés lors d'un stress oxydant [48].

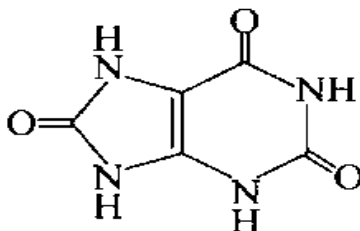


Figure 09 : Structure chimique de l'acide urique.

II.4.2.2. Antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes, sont des composés qui ne peuvent pas être synthétisés dans l'organisme et doivent être consommés dans notre régime alimentaire, notamment ceux contenus dans les fruits et légumes.

➤ les antioxydants naturels

Les antioxydants les plus courants sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) et aussi les composés phénoliques. dont, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles et superoxydes (Schéma 04) [09].

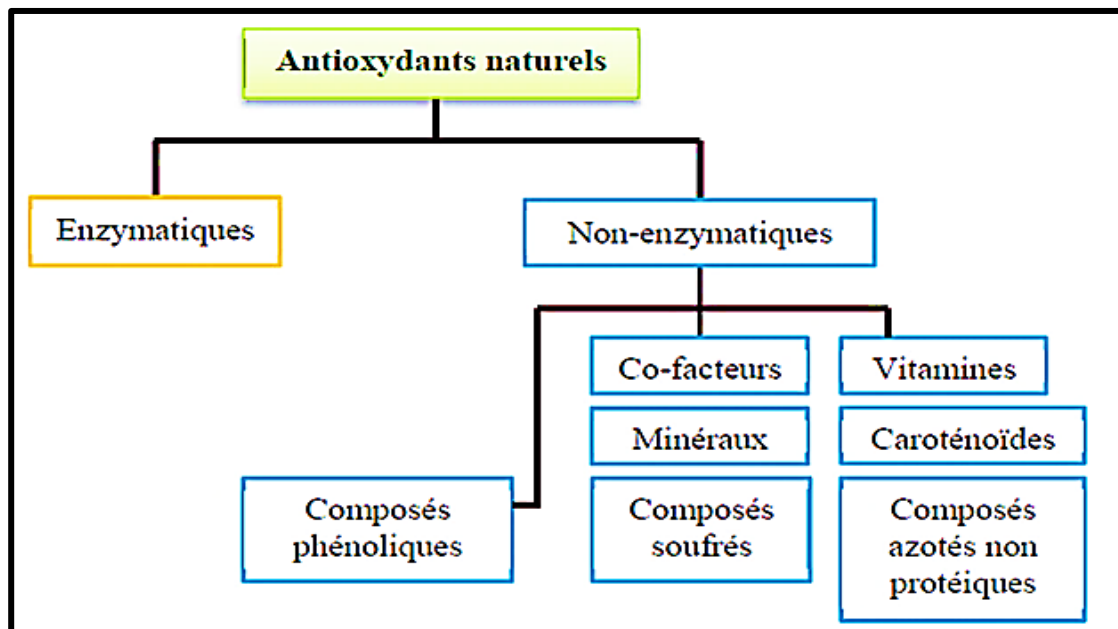


Schéma 04 : la famille des antioxydants naturels [40].

➤ Les oligoéléments

Les oligo-éléments se définissent comme une classe de nutriments nécessaires, en quantité très faible, à la vie d'un organisme. L'apport par l'alimentation, en quantité raisonnable, est crucial. En effet, ils n'agissent pas directement contre les ROS, mais ils sont essentiels pour les enzymes. Un apport excessif en oligo-éléments peut entraîner de sérieux dysfonctionnements [43].

C'est une classe de nutriments et d'éléments minéraux présents dans l'organisme comme le sélénium, le zinc, le silicium, l'iode, le fer, le cuivre, le manganèse....

➤ Acide ascorbique (vitamine C)

L'acide ascorbique (Schéma 05) appelée aussi la vitamine C se trouve dans la plupart des fruits et légumes, Cette vitamine n'est pas synthétisée par l'organisme, c'est une molécule hydrosoluble, sensible à la chaleur à l'ultraviolet et à l'oxygène connu pour avoir un effet protecteur contre l'oxydation des membranes. Sa caractéristique antioxydante vient de sa forme ionisée abondante (AscH^-) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle ($\text{Asc}^{\cdot-}$), stabilisé par résonance. Du fait de son très faible pK, la forme non protonée radicalaire faiblement réactive est privilégiée ($\text{Asc}^{\cdot-}$) [45]. Elle joue un rôle important dans la protection de divers substrats Biologiques tels que l'ADN, les protéines et les acides gras et joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E [49].

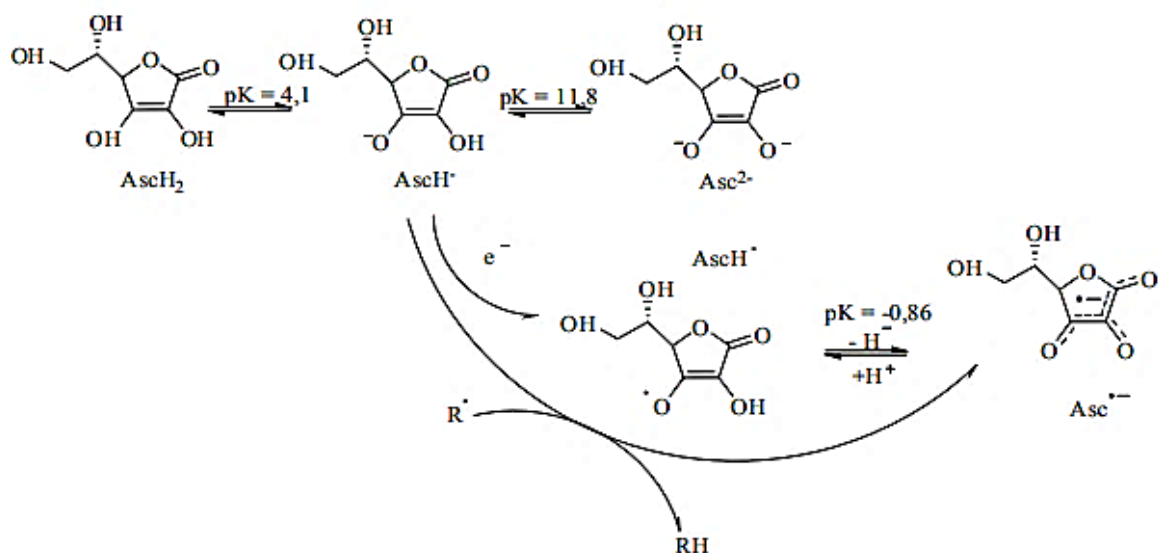


Schéma 05 : Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux [45].

➤ Vitamine E

La vitamine E (figure 10) est impliquée dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines et ralentit l'agrégation des plaquettes sanguines [50]. C'est une molécule antioxydante liposoluble, elle se trouve le plus souvent dans l'organisme. Elle est présente dans les membranes cellulaires et circule dans le sang liée aux lipoprotéines. Elle est chargée de neutraliser les radicaux libres en excès, et agit de deux différentes manières soit par piégeage directement les ERO, soit par régulation à la hausse Les enzymes antioxydantes, telles que la

SOD, la glutathion peroxydase, la catalase du foie, la glutathion-transférase et la NAD(P)H réductase [51]. La vitamine E n'est pas synthétisée biologiquement, Elle se trouve souvent dans les huiles végétales, en particulier dans le germe de blé, le tournesol, le soja, les arachides ou l'huile d'olive. On le trouve également en plus petites quantités dans les céréales, les amandes, les légumes verts, le beurre, le ghee et les poissons gras [51].

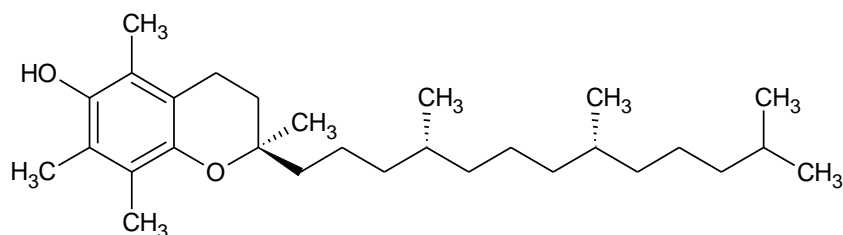


Figure 10 : structure de la vitamine E.

➤ Les caroténoïdes

Caroténoïdes sont des pigments liposolubles qui se trouvent dans les plantes et les micro-organismes. Il y en a plus de 600 caroténoïdes survenant dans la nature. Diverses études ont Indiqué que les caroténoïdes peuvent prévenir ou inhiber certains types de cancer, l'athérosclérose, musculaire liée à l'âge dégénérescence et autres maladies [52].

L'activité antioxydante des caroténoïdes résulte principalement de la capacité de la structure conjuguée à double liaison (Figure11) pour délocaliser des électrons non appariés [52]. Les Caroténoïdes, appartiennent également au groupe des antioxydants lipophiles et son capable de détoxifier divers formes de ERO [43].

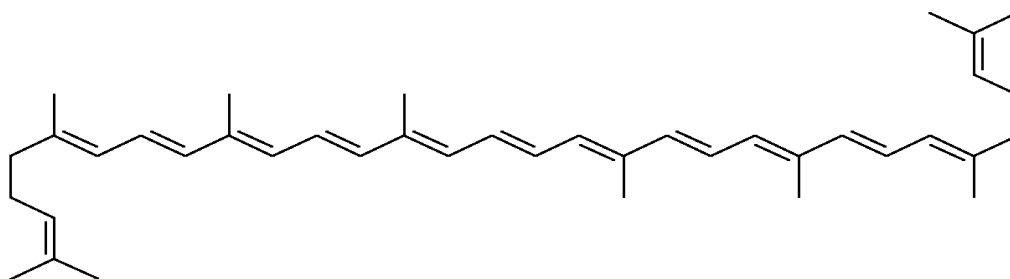


Figure 11: Structures des caroténoïdes [52].

➤ Le β -carotène

On l'appelle aussi (provitamine A) (Figure12), Il peut capter l'oxygène lunaire et se trouve dans les légumes verts, les salades, les carottes, les épinards, les abricots, la papaye, les melons, les courges et autres fruits jaunes. Il a une composition de polyène qui lui permet de piéger l'oxygène en formant du dioxétane (en ajoutant une oléfine et une molécule d'oxygène) ou en produisant des hydroperoxydes (en introduisant de l'oxygène dans toutes les liaisons CH-conjuguées de la double liaison) qui à leur tour peuvent être réduites (figure 18) [36].

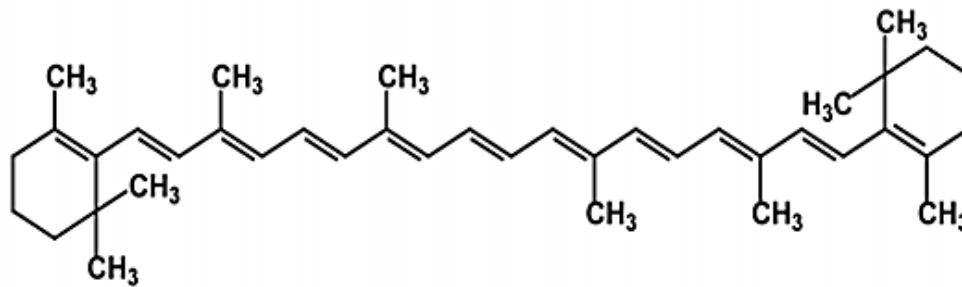


Figure 12 : Structure de la β -carotène (provitamine A).

➤ Les composés phénoliques

Le terme phénolique est utilisé pour définir des substances liposoluble et hydrosoluble qui possèdent au moins un groupement hydroxyle (OH) substitué sur un cycle aromatique. Ce nom provient du composé parent le plus simple : le phénol (figure 13) [45].

Les composés phénoliques, et en particulier les flavonoïdes sont des métabolites secondaires produits par les plantes pour interagir avec les autres végétaux et les animaux. Ils constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. On les retrouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits [45].

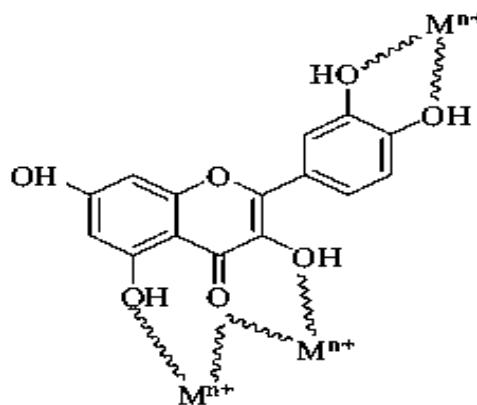


Figure 13 : Structure chimique d'un flavonoïde quercétine.

➤ Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques sont inclus dans toutes les formulations qui contiennent les corps gras insaturés et parfois inclus dans les phases aqueuses, où il y a des extraits de plantes riches en oxydases. Habituellement, la concentration de leur utilisation est dix fois plus faible que celle des conservateurs et varie entre 0,02 et 0,05%. Ce sont :

- le butylhydroxytoluène (BHT) ;
- le butylhydroxyanisole (BHA) ;
- les gallates de propyle, octyle et de dodécyle [53].

Le Tableau 03 reporte les principaux antioxydants non-enzymatiques retrouvés dans l'alimentation. Parmi ceux-ci, on retrouve certaines vitamines : la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C (ascorbate), les caroténoïdes (vitamine A et β -carotène, les flavonoïdes...). Ce tableau montre toute l'importance d'une alimentation équilibrée, riche en fruits et légumes, pour l'efficacité cellulaire de notre système antioxydant. Notre organisme a donc besoin d'un équilibre nutritionnel afin de préserver un équilibre cellulaire adéquat entre EOR et antioxydants. Cet équilibre cellulaire entre éléments [6].

Tableau 03 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées [36].

| Principaux nutriments Antioxydants | Sources alimentaires |
|--|---|
| Vitamine E | Huile : de tournesol, de soja, de maïs Beurre, œufs, noix |
| β -carotène | Légumes et fruits |
| Vitamine C | Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron |
| Acides phénoliques | Céréales complètes, baies, cerises |
| Flavonoïdes | Fruits, légumes, thé vert |
| Tannins | Lentilles, thé, raisins |
| Sélénium | Poisson, œufs, viandes, céréales, volaille |
| Zinc | Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers |
| Métabolisme de la cystéine, glutathion | Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou Œufs, poissons, viandes |

➤ Antioxydants synergiques

Les antioxydants synergiques sont des substances qui ne sont guère actives en tant qu'antioxydants, et dont les propriétés antioxydantes apparaissent surtout en présence des autres antioxydants. Il en est ainsi des lécithines, des acides citrique et tartrique, des acides aminés, de certains flavonoïdes. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants. Certains produits ont un effet inhibiteur de la décomposition des hydroperoxydes, et d'autres semblent régénérer des antioxydants, comme les tocophérols ou les dérivés de l'acide ascorbique à partir de leurs formes oxydées [6].

II.5. Mode d'action des antioxydants

Il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydante Dans l'organisme, avec les mécanismes d'action sont différents (Tableau 04).

Tableau 04 : Principaux mode d'action de quelques antioxydants [54].

| | Nature | Mode d'action |
|---------------------------|-----------------------|--|
| Défenses non enzymatiques | Vitamine E | piéger des radicaux libres |
| | Vitamine C | piéger des radicaux libres |
| | Bêta carotène | piéger des radicaux libres |
| | Bêta carotène | piéger des radicaux libres |
| | Bêta carotène | Fixation des métaux de Transition |
| | acide urique... | piéger certains radicaux libres |
| Défenses enzymatiques | Superoxyde dismutase | Catalyse la dismutation de l'anion Superoxyde |
| | Catalase Métabolise | Métabolise H ₂ O ₂ |
| | Glutathion peroxydase | Action réductrice sur H ₂ O ₂ et les hydro peroxydes |

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

- **Système de défense primaire** : ex : la catalase (CAT), le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production d'ERO en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.
- **Système de défense secondaire** : ex : les tocophérols. Ces molécules sont dites « chainbreaking ». Elles réagissent avec les ROO° et/ou les R°, bloquant ainsi les réactions de

Propagation. Ce type d'antioxydant permet d'éviter le passage de formes peu réactives ($O_2^{\cdot-}$) à très réactives (OH^{\cdot}) [54].

II.6. La toxicité des antioxydants

Les antioxydants sont des molécules en général faiblement toxiques. Pourtant, pour certains d'entre eux, leur utilisation à forte dose n'est pas dénuée de danger. Par exemple, le radical α -tocophérol stabilisé par mésomérie, peut initier des réactions d'oxydation avec les acides gras mono et poly insaturés des phospholipides membranaires (LH, LOOH) à l'origine de radicaux libres, et peut ainsi contribuer à la phase de propagation des réactions radicalaires survenant dans la peroxydation lipidique. Ce rôle pro oxydant de l' α -tocophérol en tant qu'initiateur des réactions radicalaires n'est néanmoins possible que si le radical α -tocophéryl est présent en forte concentration dans les membranes et que la vitamine C n'assure pas sa régénération [55].

Chapitre III

Méthodes d'évaluation de

L'activité antioxydante

III. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

III.1.Introduction

Comme nous l'avons mentionné précédemment, L'activité antioxydante est la capacité à piéger les radicaux libres, par rapport à un atome d'hydrogène ou à un électron et la stabilisation des espèces formées. Sur la base de cette activité, ils existent plusieurs méthodes pour mesurer l'activité antioxydante dans un système biologique *in vitro*, mais il reste très compliqué *in vivo*. Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes: soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron. Parmi ces techniques, nous mentionnons:

- La méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) ;
- La méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) ;
- La méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) ;
- Le teste de piégeage du radical ABTS ;
- La méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) ;
- Méthode DMPD (dichlorhydrate de N, N-diméthyl-p-phénylène diamine) ;
- activité de chélation des métaux [56].

III.2. Test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Cette méthode est fondée sur la mesure de la capacité antioxydante des échantillons biologiques *in vitro*. Afin qu'elle mesure la dégradation oxydative d'une molécule fluorescente (figure14) après ajout d'un générateur des radicaux libres, le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH). La dégradation thermique de cette molécule en présence d'oxygène va générer régulièrement des radicaux libres qui pourront attaquer la membrane des globules rouges [43].

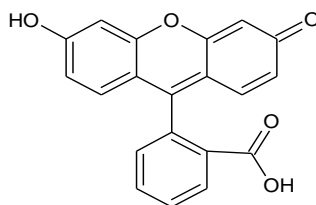


Figure14: Structure chimique de la fluorescéine.

Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de la diminution de fluorescence. La génération des radicaux libres permet la dégradation optique de la molécule active, qui perd alors sa propriété émissive, et conduit ainsi à une perte fluorescence du milieu. L'ajout de composés antioxydants efficaces devrait (i) permettre le piégeage des radicaux libres et (ii) protéger la molécule fluorescente. Le milieu sera alors analysé 35 minutes après l'ajout du

générateur des radicaux libres par spectrofluorimétrie, permettant de relier l'intensité de fluorescence à la concentration présente dans le milieu [43].

III.3. Test de la réduction du fer FRAP (Ferricreducing-antioxidant power)

Cette méthode basée sur le changement de coloration lors de la réduction du fer après un transfert d'électrons, c'est un passage de l'ion ferrique (Fe^{3+}) à l'ion ferreux (Fe^{2+}). Les résultats sont obtenus lorsque l'absorbance augmente à 593 nm et peuvent être exprimés en équivalents micro molaire Fe^{2+} ou par rapport à un étalon antioxydant. La capacité de réduction mesurée ne reflète pas nécessairement l'activité antioxydante. Au lieu de cela, il fournit une concentration «totale» très bénéfique d'antioxydants, sans mesurer ni mettre en commun la concentration de tous les antioxydants impliqués. La méthode a été appliquée à l'origine au plasma mais a été étendue à d'autres fluides biologiques, aliments, extraits de plantes, jus, etc... (Schéma 06) [57].

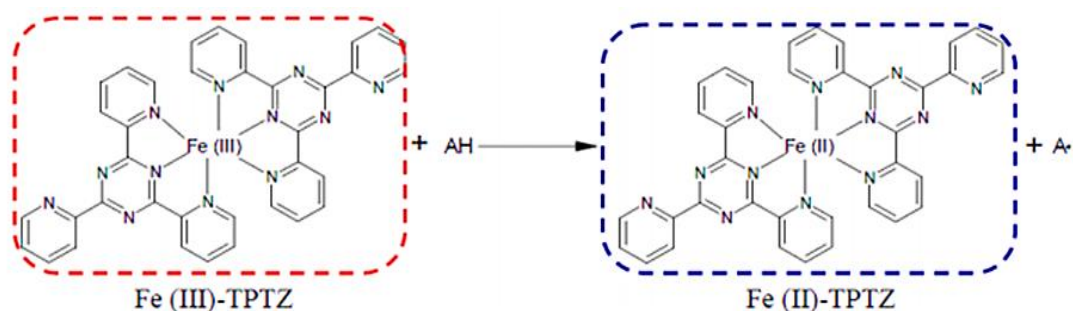


Schéma 06 : Réduction du complexe $\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})$ en $\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})$ [19].

Ce test est peu coûteux, simple, reproductible et rapide. Toutefois il n'est pas capable d'évaluer l'activité antioxydante des thiols (SH), incluant donc les polypeptides et les protéines à groupement cystéine [43].

III.4. Test de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse [58]. Il possède dans sa structure un électron non apparié sur un atome du pont azote-azote. Sa particularité provient de la modification de ses propriétés d'absorption UV/Visible selon son état : la forme réduite absorbe à 515-518 nm alors que sa forme oxydée ne présente pas de pic d'absorption [43].

Cette méthode est basée sur le transfert d'électrons qui produit une solution violette dans l'éthanol. Ce radical libre, stable à la température ambiante et de couleur violette caractéristique, est réduit en présence d'une molécule antioxydante, donnant naissance à une solution d'éthanol incolore. L'utilisation du test DPPH fournit un moyen simple et rapide d'évaluer les antioxydants par spectrophotométrie, il peut donc être utile d'évaluer différents produits à la fois (Schéma 07) [59].

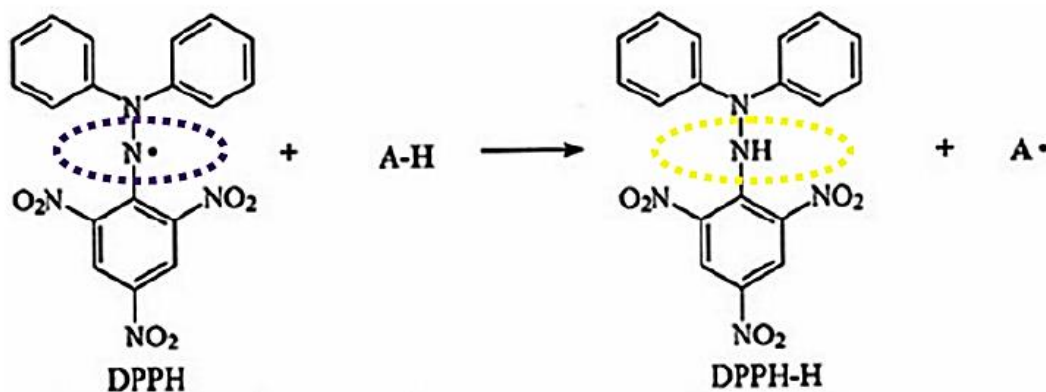


Schéma 07 : Réduction du DPPH par un antioxydant.

III.5. Test de piégeage du radical ABTS

Cette méthode permet de mesurer l'activité antioxydante de mélanges des substances et permet donc de distinguer des effets additifs et synergiques. Le test est basé sur l'interaction entre l'antioxydant et le radical cation ABTS ($ABTS^{•+}$) qui a une couleur caractéristique montrant des maxima à 645, 734 et 815 nm [60].

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique $ABTS^{•+}$ de coloration bleu-vert en le transformant en $ABTS^+$ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant [53]. Ce radical doit être régénéré par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS incolore en utilisant différents réactifs, tel que le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), le dioxyde de manganèse, ou le peroxyde d'hydrogène [61].

Lors de la mise en œuvre de ce test, l'ABTS incolore est préalablement oxydé avec du persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) pour former le radical cationique $ABTS^{•+}$ de coloration bleu-vert (Schéma 08). L'addition d'un composé antioxydant engendre la réduction du radical $ABTS^{•+}$ en ABTS. L'activité antioxydante est déterminée par la décoloration de la solution et s'exprime par le pourcentage d'inhibition (PI) de l'absorbance à 734 nm, longueur d'onde à laquelle le radical $ABTS^{•+}$ présente une bande d'absorption caractéristique [62].

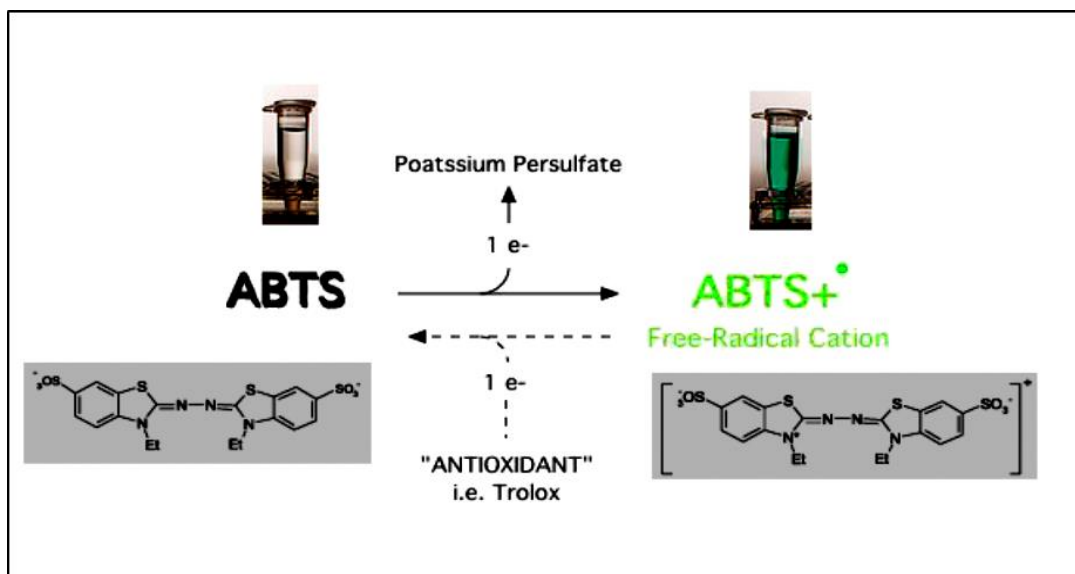


Schéma 08 : la réaction chimique de l'ABTS [61].

III.6. Le test TRAP

Le test TRAP implique l'initiation de la peroxydation lipidique en générant des radicaux peroxydes hydrosolubles et est sensible à tous les antioxydants connus de rupture de chaîne, mais il est relativement complexe et long à réaliser, nécessitant un degré d'expertise et d'expérience. Cependant, le test TRAP a été critiqué comme employant un oxydant non physiologique stress (radicaux peroxydes hydrosolubles), mais la méthode peut être adaptée pour utiliser des initiateurs liposolubles [19].

III.7. Test de résonance paramagnétique électronique RPE

Cette méthode est la seule technique d'analyse capable à détecter spécifiquement les radicaux libres impliqués dans l'autoxydation et les processus associés. Cependant, bien qu'intrinsèquement sensible aux radicaux libres stables tels que le di-ter-butylnitroxyde, la RPE est insensible à la détection de radicaux libres réactifs de courte durée impliqués dans l'autoxydation [57].

III.8. Méthode DMPD (dichlorhydrate de N, N-diméthyl-p-phénylène diamine)

La méthode de décoloration par cation radicalaire (DMPD) a été mise au point pour mesurer l'activité antioxydante dans des échantillons alimentaires et biologiques. Cet essai est basé sur la réduction de la solution tamponnée de DMPD coloré dans un tampon acétate et du chlorure ferrique. La procédure implique la mesure de la diminution de l'absorbance du DMSO

en présence de capteurs à son maximum d'absorption de 505 nm. L'activité s'exprime en pourcentage de réduction du DMPD (Schéma 09) [63].

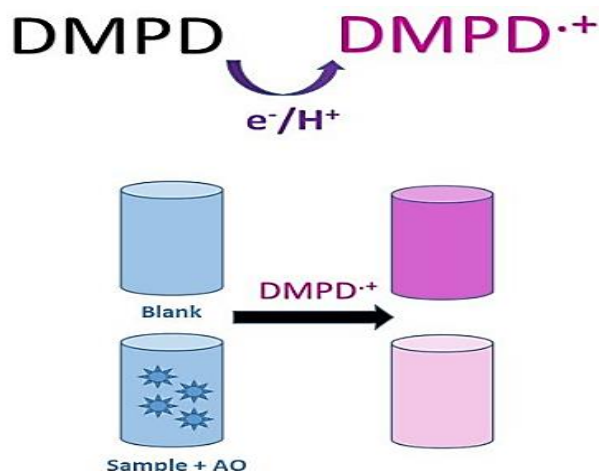


Schéma 09 : Formation du radical DMPD et sa réaction avec les antioxydants (AOH).

III.9. Activité de chélation des métaux

La ferrozine peut former un complexe de couleur rouge en formant des chélates avec Fe²⁺. Cette réaction est limitée en présence d'autres agents chélateurs et entraîne une diminution de la couleur rouge des complexes ferrozine-Fe²⁺ [64]. La mesure de la réduction de la couleur détermine l'activité chélatante qui doit entrer en compétition avec la ferrozine pour les ions ferreux. La chélation des ions ferreux est estimée à l'aide de la méthode de (*Dinis et al*) [65].

III.10. Présentation de quelques composés de synthèses à l'effet antioxydant

Dans Cette partie, nous présentons l'activité antioxydante de certains composés organiques de synthèse déjà étudiés. Nous nous sommes basés sur les travaux de *M. Mahdavi et al* qui ont utilisé la méthode de pouvoir antioxydant réducteur ferrique. Une étude récente réalisé par *K.Harrouche et al* montre aussi l'effet antioxydant de quelques composés de synthèse de la famille des benzothiadiazines, c'est derniers ont été évalué par différentes méthodes [67].

III.10. 1. Effet antioxydant de quelques dérivés de 3-aroyle-1- (4 sulfamoylphényl) thiourée

Une série de dérivés de 3-aroyle-1- (4-sulfamoylphényl) thiourée (figure 15) contenant une fonction sulfonamide ont été conçu et synthétisé comme inhibiteurs de la 15-lipoxygénase (15-LOX) et étudié comme antioxydants (*M. Mahdavi et al*) [67].

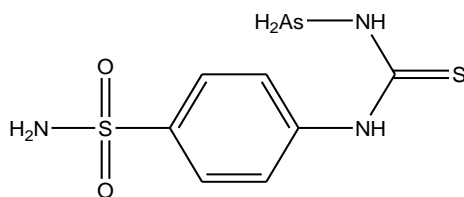
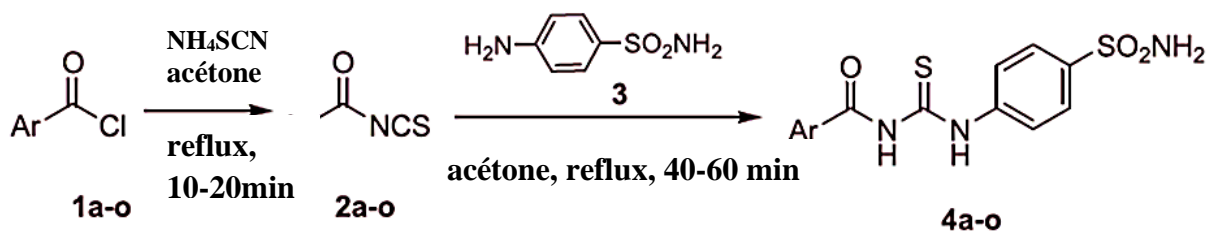


Figure 15 :3-aryl-1- (4-sulfamoylphényl) thiourée.

Chimie

La voie de synthèse suivie pour obtenir ces dérivés (4a-o) est illustrée dans le (Schéma 10). Premièrement, les dérivés d'isothiocyanate d'aroyle 2 ont été synthétisés en utilisant différents chlorures d'aroyle 1 et thiocyanate d'ammonium. Ensuite, les composés 2a-o ont été mis à réagir avec 4- sulfamoylaniline 3 pour donner les composés finaux 4a-o. Composés 4a-d, 4f, 4g, 4j, 4k et 4n.



Ar = phényle (substitué); 2-naphtyle; furil; 2-thiényle

Schéma10 : Synthèse des composés 4a-o [66].

Pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)

Le dosage du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) a été utilisé pour déterminer le potentiel antioxydant total des composés cibles 4a-o. Dans cette méthode, le complexe ferrique tripyridyl triazine est réduit par le composé d'essai à une forme ferreuse qui a une couleur bleue. Le changement d'absorbance est mesuré à 585 nm.

Les résultats ont été exprimés en mmole de ferreux / g de masse sèche (Tableau 05). L'acide ascorbique a été utilisé comme composé de référence.

Le travail publié montrent que les meilleurs résultats sont obtenus avec un substituant de méthyle sur le cycle aromatique. Le composé 4c a montré l'activité antioxydante la plus élevée, telle que déterminée par le test FRAP. La capacité de réduction des ions ferriques était supérieure à celle de l'acide ascorbique. Néanmoins, les composés 4k et 4l ont également montré

une puissance élevée pour la réduction ferrique. La comparaison des valeurs FRAP obtenues pour le composé 4a non substitué et analogues substitués 4b-l, a révélé que le potentiel antioxydant était parfois augmenté par substitution sur le groupement benzoyle.

Tableau 05 : Activité inhibitrice de la 15-LOX (CI_{50} , μM) et potentiel antioxydant des composés 4a-o [66].

| Composée | Ar | Valeur FRAP ^b |
|------------------|------------------------------|--------------------------|
| 4a | Ph | 190 |
| 4b | 2-CH ₃ -Ph | 214 |
| 4c | 3-CH ₃ -Ph | 554 |
| 4d | 4-CH ₃ -Ph | 370 |
| 4e | 4-CH ₃ O-Ph | 285 |
| 4f | 4-NO ₂ -Ph | ND |
| 4g | 3-F-Ph | 282 |
| 4h | 2, 3, 4,5-F ₄ -Ph | 69 |
| 4i | 2-Cl-Ph | 242.5 |
| 4j | 3-Cl-Ph | 150 |
| 4k | 4-Cl-Ph | 410 |
| 4l | 2,4-Cl ₂ -Ph | 468 |
| 4m | 2-Naphtyle | 290 |
| 4n | 2-Furyl | <150 |
| 4o | 2-Thiényl | <150 |
| Quercétine | — | — |
| Acide ascorbique | — | 546 |

III.10.2. Etude de l'activité antioxydante de quelques 1, 2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes portant des fractions sulfonylthiourées

Les 1,2,4-benzothiadiazine 1,1 dioxydes sont des composés hétérocycliques remarquablement importants. Ils appartiennent à la classe des sulfamides cycliques, qui ont été largement étudiés comme ouvreurs de canaux potassiques sensibles à l'ATP. Cette activité rend ces composés intéressants pour une large gamme d'applications thérapeutiques.

Dans cette étude réalisé par *K.Harrouche et al* l'activité antioxydante d'une série de 1, 2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxyde portant des groupes sulfonylthiourées a été étudiée par des tests in vitro. En raison de la complexité du processus d'oxydation, il n'y a pas de méthode unique pour refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi (*K.Harrouche et al*) ont réalisé différents tests pour mesurer la capacité antioxydante [67].

L'activité antioxydante des composés cibles, 12a-n (Schéma 11), a été évaluée et comparée à celle des antioxydants standards, comme la vitamine C (acide ascorbique) et la quercétine. Six systèmes modèles ont été utilisés, à savoir les dosages de piégeage des radicaux de l'acide 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis-3-éthyl-benzthiazoline-6-sulfonique (ABTS), le dosage du pouvoir réducteur, essai d'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène, essai d'inhibition de la peroxydation lipidique (LP) et essai de prévention de l'oxydation du glutathion (GSH).

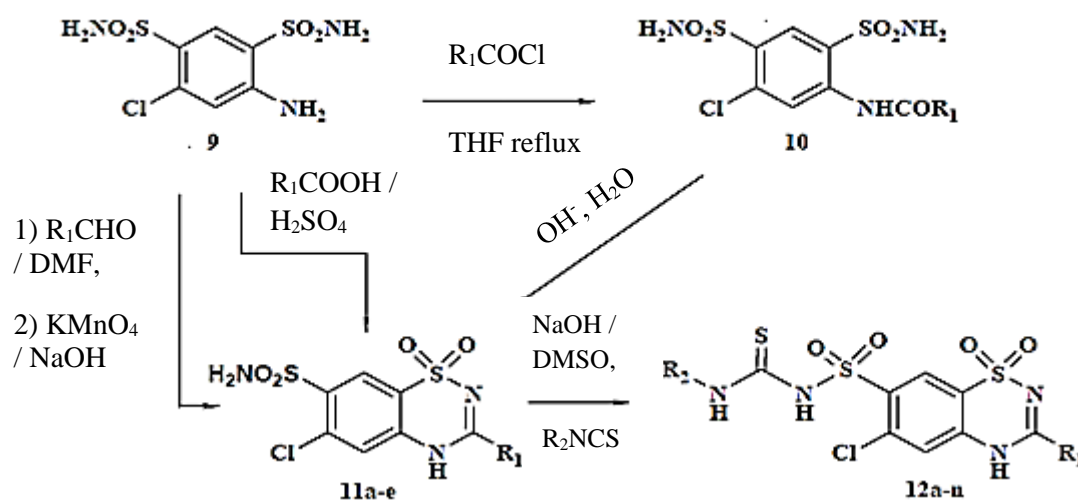


Schéma 11 : Synthèse de molécule 12a-n [67].

Les propriétés antioxydantes ont été exprimées en valeurs de (EC₅₀) dans les quatre premiers essais et en pourcentage d'inhibition de l'oxydation des lipides et du GSH. Les résultats sont présentés dans le tableau 06.

Tableau 06 : Propriétés antioxydantes des 1, 2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes synthétisés (CE₅₀) et% d'inhibition in vitro des valeurs de peroxydation lipidique de 12a-n [67].

| Les Composées | EC ₅₀ (Mm) | | | | | | % d'inhibition de la peroxydation lipidique (5,10 à 4 millions) | % Inhibition de l'oxydation du glutathion (200 µM) |
|---------------|-----------------------|----------------|------------------------|------------------------|--|--------------------------------|---|--|
| | R ₁ | R ₂ | DPPH | ABTS | H ₂ O ₂ capacité de récupération | Dosage de puissance réductrice | | |
| 12a | H | iPr | 0.49±0.03 ^a | 0.39±0.03 ^a | 0,38±0, 07 ^a | 1.70±0.07 ^a | 35.50±3.45 | 8,04±1.47 |
| 12b | Me | iPr | 0.70±0.03 ^b | 0.20±0.02 ^b | 0, 61±0, 09 | 2.19±0.15 ^b | 34.92±3.30 | 24,80±1.95 |
| 12c | Ph | iPr | 0.77±0.03 ^b | 0.52±0.04 ^a | NE | 2.27±0.08 ^b | 14.03±1.50 | 17,10±1.94 |
| 12d | Bn | iPr | 0.73±0.03 ^b | 1.83±0.11 ^c | NE | 1.26±0.11 ^c | 26.26±3.02 | ND |
| 12e | 4-OMePh | iPr | 0.98±0.05 ^c | 1.73±0.07 ^c | 1.56±0.15 ^c | 2.57±0.15 ^b | 17.61±2.49 | ND |
| 12f | H | Me | 1.73±0.13 ^d | 3.95±0.17 ^d | 0.63±0.12 ^b | 8.44±0.38 ^d | 23.28±3.02 | ND |
| 12g | Me | Me | NE | NE | NE | 1.89±0.05 ^{a,b} | NE | ND |
| 12h | Ph | Me | 5.71±0.65 ^e | NE | NE | NE | NE | 12,47±0.54 |
| 12i | H | Ph | 0.72±0.06 ^b | 0.40±0.04 ^a | 0.30±0.05 ^a | 1.05±0.05 ^c | 26.27±3.65 | 16,93±1.54 |
| 12j | Me | Ph | NE | NE | NE | NE | NE | ND |
| 12k | Ph | Ph | 5.47±0.84 ^e | NE | NE | 5.59±0.26 ^e | NE | ND |
| 12l | H | C6H11 | NE | NE | NE | 8.46±0.73 ^d | NE | ND |
| 12m | Me | C6H11 | NE | NE | NE | NE | NE | ND |
| 12n | Ph | C6H11 | NE | NE | NE | NE | NE | ND |
| As | ----- | ----- | 0.31±0.01 ^f | 0.17±0.01 ^b | 5.75±0.89 ^d | 0.27±0.04 ^f | ----- | 12,47±0.54 |
| Qr | ----- | ----- | 0.18±0.01 ^g | 0.17±0.01 ^b | 0.67±0.03 ^b | 0.13±0.02 ^g | 33.33±3.23 | ND |

Valeur EC₅₀: La concentration efficace à laquelle l'activité antioxydante était de 50% pour les radicaux DPPH[•], ABTS^{•+} et H₂O₂ a été éliminée de 50%, respectivement, et l'absorbance était de 0,5 pour le pouvoir réducteur.

Les valeurs EC₅₀ ont été obtenues par interpolation à partir d'une analyse de régression linéaire. Les valeurs étaient les moyennes de trois répliques ± écart-type. Les valeurs avec des lettres

différentes (a, b, c, d, e, f, g) dans la même colonne étaient significativement différentes ($p < 0,05$).

NE: aucun effet. ND: non déterminé. As: acide ascorbique. Qr: quercétine.

➤ **Activité de piégeage des radicaux DPPH**

Le tableau 06 présente la capacité de piégeage du DPPH de certains 1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxydes synthétisés (12a-n). Le résultat obtenu montre une activité antioxydante intéressante des composés en particulier 12a-e ($0,49 < EC_{50} < 0,98$ mM).

Le composé le plus actif était le 12a qui n'était pas loin de l'acide ascorbique nettement moins actif que la quercétine. Les composés 12b, 12c, 12d et 12i ont montré une activité de piégeage du radical DPPH similaire mais étaient moins actifs par rapport aux composés de référence, l'acide ascorbique et la quercétine.

Les groupes les plus favorables à l'activité antioxydante étaient l'atome d'hydrogène, CH_3 et C_6H_5 , $CH_2C_6H_5$, en tant que groupe R_1 , et C_6H_5 et, en particulier, isopropyle en tant que groupe R_2 . En effet, le composé le plus actif, 12a, a respectivement un atome d'hydrogène et un isopropyle comme groupes R_1 et R_2 .

Bien que le DPPH puisse théoriquement être neutralisé soit par réduction directe via transfert d'électrons (ET) soit par transfert d'atome d'hydrogène (HAT), il est considéré que la réaction est principalement basée sur un transfert d'électron, et l'abstraction des atomes d'hydrogène est une voie de réaction marginale.

➤ **Activité de piégeage des radicaux ABTS**

Dans la présente étude, la valeur EC_{50} correspond à la concentration efficace à laquelle les radicaux ABTS ont été piégés à 50%). Selon le tableau 6, les composés les plus actifs du DPPH, à savoir le 12a-e et le 12i, ont également montré l'activité antioxydante la plus puissante avec l'essai ABTS.

En particulier, 12b était aussi actif que l'acide ascorbique tandis que 12a, 12c et 12i étaient deux fois moins actifs que l'acide ascorbique. On peut voir que les valeurs EC_{50} de ces composés avec le dosage ABTS étaient inférieures à celles obtenues avec le dosage DPPH, à l'exception de celles de 12d et 12e. En revanche, ils étaient tous largement moins actifs que le composé de référence quercétine.

Les groupes les plus favorables pour l'activité antioxydante étaient l'atome d'hydrogène, CH₃ et C₆H₅, en tant que groupe R₁, tandis que R₂ était de préférence C₆H₅ et isopropyle. En effet, le composé le plus actif, 12b, a CH₃ comme R₁ et isopropyle comme groupe R₂. On peut faire la même remarque faite ci-dessus à propos de l'effet de la nature des groupes R₁ et R₂, sur l'activité anti-oxydante des composés cibles, sauf l'inversion entre les ordres de l'atome d'hydrogène et du groupe CH₃ (pour le radical côté R₁) (12a >12b dans le test DPPH mais 12b >12a dans le test ABTS).

Les tests ABTS sont à la fois basés sur le transfert d'atomes d'hydrogène (HAT) et le transfert d'électrons (ET) et le mécanisme de réaction peut changer avec le pH, l'activité anti-oxydante peut être considérée via un mécanisme de transfert d'électrons.

➤ Dosage de la puissance réductrice (FRAP)

Le test de réduction de puissance est un test basé sur un transfert d'électrons unique (SET). Il s'agit d'un test colorimétrique de transfert d'électrons, basé sur la capacité des produits testés à réduire le fer (le passage de la forme ferrique (Fe³⁺) à la forme ferreuse (Fe²⁺). La valeur EC₅₀ du pouvoir réducteur est calculée comme la concentration correspondant à 0,5 absorbance du complexe ferrique ferrocyanure de potassium, dans le milieu. Selon le tableau 6, les composés les plus actifs dans les essais DPPH et ABTS, à savoir, 12a-e et 12i, en plus de 12g, qui était inactif, ont montré les activités antioxydantes les plus puissantes avec le test FRAP. En revanche, ils étaient tous largement moins actifs que les composés acides ascorbiques et quercétine. De plus, les valeurs EC₅₀ étaient largement supérieures à celles obtenues avec les essais DPPH et ABTS.

Les composés les plus actifs étaient 12i et 12d portant un atome H et CH₂C₆H₅ comme groupe R₁, et C₆H₅ et CH(CH₃)₂ comme groupe R₂. Le test ayant été réalisé à un pH égal à 6,6.

➤ Capacité d'élimination du peroxyde d'hydrogène (HPSC)

Le peroxyde d'hydrogène à un potentiel de réduction élevé et est donc un agent oxydant puissant. Cependant, la plupart de ses réactions ont une énergie d'activation élevée et sont lentes. La capacité de piégeage des dérivés de benzothiadiazine sur le peroxyde d'hydrogène est montrée dans le tableau 06. Alors que la quercétine témoin a montré un HPSC fort, l'effet de l'acide ascorbique était très hebdomadaire. Les résultats obtenus ont également montré que quatre dérivés de benzothiadiazine présentaient un HPSC puissant, à savoir 12i, 12a, 12f et 12b. En effet, les composés les plus actifs, 12i et 12a étaient tous deux deux fois plus actifs que la

quercétine, et respectivement 19 et 15 fois plus actifs que l'acide ascorbique. L'acide ascorbique était presque neuf fois moins actif que la quercétine. De plus, les composés 12b et 12f étaient aussi actifs que la quercétine et neuf fois plus actifs que l'acide ascorbique.

Les groupes R_1 les plus favorables étaient l'atome d'hydrogène et le méthyle, tandis que l'isopropyle, C_6H_5 et CH_3 étaient les groupes R_2 les plus favorables.

➤ Inhibition de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est une série de processus de réaction en chaîne médiée par les radicaux libres et est associée à plusieurs types de dommages biologiques. Dans cette étude, la peroxydation lipidique a été induite par le chlorure ferrique. Selon le tableau 06, tous les composés présentant une activité antioxydante avec les quatre dosages discutés précédemment ont montré un pourcentage d'inhibition important de la peroxydation lipidique. En effet, à 0,5 mM, les composés les plus puissants, 12a et 12b, ont montré une activité antioxydante relativement légèrement supérieure à celle de la quercétine (35,50%, 34,92% et $33,33 \pm 278$ 3,23% d'inhibition de la peroxydation lipidique respectivement).

Les autres composés ayant une activité anti-oxydante relativement plus faible étaient 12i, 12d, 12f, 12e et 12c tandis que 12g, 12h et 12j-n étaient complètement inactifs. Les composés les plus actifs, 12a, 12b, portent H, CH_3 comme groupe R_1 tandis que R_2 était un groupe isopropyle. Le mécanisme anti-oxydant ici est probablement basé sur un processus de transfert d'électrons, où l'ion thiolate pourrait perdre un électron et conduire à un radical sulfhydryle.

➤ Prévention de l'oxydation du glutathion

Dans cet essai, le 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) a été utilisé comme réactif pour mesurer la concentration de GSH. En effet, les thiols réagissent avec le DTNB, clivant la liaison disulfure pour donner du 2-nitro-5-thiobenzoate ($TNB^{\cdot-}$), qui s'ionise en TNB^{2-} dianion de couleur jaune dans l'eau à pH alcalin, et peut être dosé par spectrophotométrie à 412 nm.

Comme les composés cibles sont ionisés à pH alcalin sous forme d'ion thiolate, ils auraient une activité de prévention contre l'oxydation du GSH. Selon le tableau 6, les composés cibles les plus puissants dans les tests précédents (12a, 12b, 12c, 12i) ont été sélectionnés pour évaluer leur effet préventif éventuel sur l'oxydation du GSH en milieu alcalin (pH 8,5). Les résultats sont représentés dans le tableau 6. Après 24 h d'incubation, 12i, 12c et 12b (200 μ M) ont considérablement empêché l'oxydation du GSH.

➤ Discussion comparative entre les cinq tests

Nous pouvons remarquer que les trois composés les plus puissants dans les essais DPPH, ABTS, H₂O₂ et LP étaient 12a, 12b et 12i, tandis que ceux du pouvoir réducteur et du GSH empêchant l'oxydation étaient respectivement 12a, 12d, 12i et 12b, 12c, 12i. Les résultats obtenus ont montré que, uniquement dans les essais de pouvoir réducteur, les composés cibles étaient largement moins actifs que les composés de référence, l'acide ascorbique et la quercétine.

Dans les autres tests, certains composés étaient très actifs. Par exemple, dans DPPH et ABTS, les essais 12a et 12b étaient presque aussi actifs que l'acide ascorbique, alors qu'ils étaient plus actifs que la quercétine dans le dosage de la peroxydation lipidique. Dans le test de prévention de l'oxydation du GSH, 12b, 12c et 12i étaient plus actifs que l'acide ascorbique. Dans le test de piégeage de H₂O₂, 12a et 12i étaient plus actifs que la quercétine, tandis que 12b et 12f étaient aussi actifs que ce composé de référence. Sur le même dernier modèle, les 12a, 12b, 12f et 12i étaient plus actifs que l'acide ascorbique.

Conclusion

Générale

Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous avons présenté une recherche bibliographique contenant des généralités sur les radicaux libres, le stress oxydatif, les principaux antioxydants naturels et synthétiques, nous avons ainsi montré quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante à savoir : test de piégeage du radical DPPH, test du piégeage du cation ABTS, le test de réduction de fer (FRAP)

L'utilisation des antioxydants issus de la synthèse organique est un sujet très étudié et d'actualité qui vise le développement de nouvelles molécules ayant un effet antioxydant puissant et sans danger pour l'organisme.

Vu que nous n'avons pas pu réaliser un travail expérimental pour évaluer l'effet antioxydant d'une série de composés organiques comme c'était tracer au début, à cause aux conditions de travail due à la pandémie du virus Covid-19, nous avons présenté dans ce mémoires des exemples de travaux déjà réalisés qui vise l'évaluation de certains composés organiques pour montrer l'intérêt de la synthèse organique dans la recherche et développement de nouveaux agents antioxydants.

Bibliographie

Référence bibliographique

- [1] J.O. Defraigne, J.Pincemail, stress oxydant et antioxydants : Mythes et réalités. *Revue Med Liège*, 2008, 63,10-19.
- [2] B.Bouguerne, conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat, université Toulouse III, 2012.
- [3] A.merouane., A.noui., H.Medjahed., K.Nedjari., A.nhadj, A.saadi, Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. *Int. J. Biol. Chem. Sci*, 2014, 8(4) : 1865-1870.
- [4] A.Favier, Le stress oxydant-son intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, 2003,108-115.
- [5] M.mongens, origine et conséquences du stress oxydant. Thèse de doctorat, école nationale vétérinaire d'alfort, 2013.
- [6] CH.Kochelin-Ramonatxo, Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2006, 20,165-177.
- [7] M. Ghouti, H. Halbigue, Simulation du pouvoir antioxydant de deux anticancéreux de la famille des antimétabolites. Mémoire de master, université de Djilali BOUNAAMA-KHEMIS MILIANA, 2019.
- [8] Y.Gilgun-Sherki., E .Melamed, D.Offen, Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 2001, 40, 959-975.
- [9] B. Poljsak., D. Šuput, I. Milisav, Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 2013, p: 1-11.
- [10] A. Favier, stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm. Fr*, 2006, 64,390-396.

- [11] P.I. Merksamer., Y Liu., W He., M.D. Hirschey., D. Chen, E. Verdin, The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging*, 2013 ,5 (3) : 144-150.
- [12] Y.Zhou., H.Yan., M.Guo., J .Zhu., Q. Xiao, L .Zhang, Reactive oxygen species in vascular formation and development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, V ; 1- 14.
- [13] A. Carrière., A. Galinier., Y. Fernandez., M.C. Carmona., L. Pénicaud, L. Casteilla, les espèces réactives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Medecine/Science*, 2006,22, 47-53.
- [14] A-T.H. Mossa., T.M. Heikal, E.A. Z. Omara, Liver damage associated with exposure to aspirin and diazinon in male rats and the ameliorative effect of selenium. *Biomed. Aging*, 2014, 40,23-26.
- [15] M.Gutowski, S.Kowalczyk, study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *ACTA biochimica polonica*, 2013, 60(1): 1-16.
- [16] A. Moniczewski., M. Gawlik., I. Smaga., E .Niedzielska., J .Krzek., E. Przegaliński., J. Pera, M. Filipe, Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacological Reports*, 2015, 67, 560-568.
- [17] M. ADJADJ, Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale *Paronychia argentea* L. Thèse de Doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1, 2016.
- [18] A.M. Pisochi, A.Pop, the role of antioxidant in the Chemistry of oxidative stress.*European Journal of Medecinal Chemistry*, 2015, 97, 55-74.
- [19] R. L. Prior., X. Wu, K. Schaich, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4290-4302.
- [20] C.C.Winterbourn, The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol*, 2013, 528, 3-25.
- [21] C.C Winterbourn, the challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1840, 730-738.

- [22] J.P. Eiserich., R. P. Patel, V.B. O'Donnel, Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Molec. Aspects. Med*, 1998, 19:222.
- [23] R. Radi, Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. US*, 2004, 101, 4003-4008.
- [24] A. De Mel., F. Murad, A. M. Seifalian, Nitric Oxide: A Guardian for Vascular Grafts. *Chem. Rev*, 2011, 111(9):5742-5767.
- [25] W. Brand-willims., M. E. Cuvelier,C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxydant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft and technologie*, 1995 ,28 : 25-30.
- [26] G.Karp, *Biologie cellular et moléculaire : concepts and experiments*. Edition Boeck Supérieur, 2011, P35.
- [27] F. Kholkhal, *Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits descomposés phénoliques de Thymus ciliatus ssp coloratus et sspeuciliatus*. Thèse de Doctorat, Université Abou bekr belkaid ,2014.
- [28] P. Venditti., L. Di Stefano, S.DiMeo, Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*, 2013, 13, 71-82.
- [29] R.S.Balaban., S.emoto, T.Finkel, Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell!* , 2005, 120, 483-495.
- [30] W.Droge, Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 2002 ,82; 47.
- [31] H. Sies, Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 1991, 91, 31S-38S.
- [32] J.O.Defraige, J.Pincemail, stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Revue Med Liège*, 2008, 63, 10-19.
- [33] T. Persson., B. O. Popescu, A. Cedazo-Minguez, Oxidative Stress in Alzheimer's- Disease: Why Did Antioxidant Therapy Fail? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–11.

- [34] S.Benbrinis, Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*. Thèse de magister, université Ferhat Abbas-setif. 2012.
- [35] B. pourrut, etude des profils d'expression de peroxydases chez une plante sentinelle en fonction d'un stress métal lourd, ensat. Rapport de DEA, 2003 ,34 pp.
- [36] Z.Mohammedi, Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat, Université Abou bekr belkaid ,2013.
- [37] F. Beddou, Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. Thèse de doctorat, Année Université abou bekr belkaid, 2015.
- [38] V.Lobo., A.Patil., A.Phatak, N.Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods. Impact on human health, V 4(8), 2010, 118–126.
- [39] J .W.Hilton, Les antioxydants rôles, types et nécessites dans les aliments pour animaux de compagnie, 1989, 30,834.
- [40] K.Maurent, Synthèse de composés phénoliques de type diarylheptanoïde, évaluation de leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Thèse de Doctorat Chimie organique, Université Paul Sabatier de Toulouse, 2017.
- [41] S.B.Nimse, D.Pal, Free radicals, naturel antioxydants, and their reactions mechanisms.RSC advances journal, 2015, 5, 27986-28006.
- [42] C.Boubekri, Etude de l'activité antioxydante des polyphénols, extraits de *Solanummelongena* par des techniques électrochimiques .thèse doctorat, Université Mohamed Khider Biskra, 2014.
- [43] T.Desmier, Les Antioxydants De Nos Jours, Définition et Applications. Thèse de doctorat, Université de Limoges, 2016.
- [44] L. Frédéric, Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traineau en course de sprint. Thèse doctorat, vetagro sup campus de lyon, 2011.
- [45] A.Rezaire, Activité anti-oxydante, caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpusbataua* (patawa). Thèse de doctorat, Antilles-Guyane, 2012.

- [46] P. Sharma., A. BhushanJha., R. ShankerDubey, M.Pzssarakli, reactive OxydgenSpices, oxydative damage et antioxidativedefence, Mechanism in plants under stressful condition. Journal of Botany, 2012, p: 26.
- [47] M. Enoiu, Rôle pro-oxydant de la gamma-glutamyltransférase et de la gamma-glutamyltransférase" related" dans la peroxydation lipidique. Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré-Nancy 1, 2001.
- [48] J.Haleng., J.Pincemaol., J.O.Defraigne., Charlier, J.PChapelle, le strss oxidant.Rev Med Liege, 2007, 62,10:628-638.
- [49] S.Merabet, H.Sahraoui, évaluation de la corrélation du stress oxydatif et le syndrome du surentrainement et leurs impacts sur les indices de la performance physique chez les jeunes athlètes.thèse de Doctorat, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis, 2018.
- [50] H.D.Belitz., W.Grosch, P.Schieberle, Food Chemistry. Springer Edition, 2009, P : 407.
- [51] N.Belkheiri, Dérivés phénoliques à activités Antiathérogènes. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier de Toulouse, 2010.
- [52] M.Valko., C.Rhodes., J.Moncol., M.Izakovic, M.Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-biological interactions, 2006, vol 160(1), 1-40.
- [53] K.Bouhadjra, Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. Doctoral dissertation, UMMTO, 2011.
- [54] J.Pastre, Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques .Doctoral dissertation, 2005, p : 19 ,20.16.
- [55] J.Pastre, N.Priymenko, Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Revue de médecine vétérinaire, 2007, vol : 1(4), 180-189.
- [56] F. SEBTI, Synthèse, Caractérisation et activités biologiques d'un ligand chélateur des ions métalliques. Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas Setif, 2018.
- [57] M.Antolovich., P.D.prenzler., E.Patsalides., S.McDonald, K.Robards, Methods for testing antioxydantactivity. The royal society of Chemistry Journal, 2002, p :127 ; 183-198.

- [58] K.S.Evenamede., K.Kpegba., O.Simalou., P.Boyode., A.Agbonon, M.Gbeassor, Etude comparative des activités antioxydantes d'extraits éthanôïques de feuilles, d'écorces et de racines de *Cassia sieberiana*. *International Journal of Biological and Chemical*, 2017.
- [59] J.Garcia., T.L.Oldoni., SM.Alencar., A.Reis., AD.Loguercio, RH.Grande, antioxidant activity by DPPH assay of potentiel solutions to be applied bleedred teeth. *Braz Dent J*, 2012, 23(1), 22-27.
- [60] A. Augusti Boligon, M. Mansur Machado, M.Linde Athayde, Technical Evaluation of Antioxydant Activity.*Med Chem*, 2014, Vol 4(7).
- [61] Re.R.Pellegrini., N.Proteggente., A.Pannala., A.Yang, C.Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation. 1999, vol 26, N9.10, 1231-1237.
- [62] S. O Sarr., A. D. Fall., R. Gueye., A. Diop., K. Diatta., N.Diop., B. Ndilaye, Y. M. Diop, Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenacea).*Int. J. Biol. Chem. Sci* 2015, 9(3), 1263-1269.
- [63] Antonio Ceriello et al. Total Radical-Trapping Antioxidant parameter in NIDDM Patients. ARTICLE in *DIABETES CARE*, 1997.
- [64] V. Fogliano., V. Verde., G Randazzo, A. Ritieni, Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring antioxidant capacity of wines. *J. Agric.Food Chem*, (1999), 47, 1035-1040.
- [65] C.Soler-Rivas., J.C Espin, H.J. Wichers, An easy and fast testto compare total free radical scavengercapacity of foodstuffs.*phytochem.Anal.* 2000, 11, 330-338.
- [66] M.Mahdavi., M.Shahazad Shirazi., R.Taherkhani., M.Saeedi., E.Alipour., F.Homayouni Moghadam., A. Moradi., H Nadri., S. Emami., L. Firoozpour., A. Shafiee, A.Foroumadi, Synthesis, biological evaluation and docking study of 3-aroyl-1-(4-sulfamoylphenyl)thiourea derivatives as 15-lipoxygenase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 82, 308-313.

[67] K Harrouche., A.Lahouel., M.Belghobsi., B. Pirotte., and S. Khelili., Synthesis, characterization, and investigation of the antioxidant activity of some 1, 2, 4-benzothiadiazine-1, 1-dioxides bearing sulfonylthioureas moieties. *Canadian Journal of Chemistry*, 2019. 97(12): 824-832.

Résumé

L'utilisation des antioxydants issus de la synthèse organique est un sujet très étudié et d'actualité qui vise le développement de nouvelles molécules ayant un effet antioxydant puissant et sans danger pour l'organisme. Ce mémoire présente une recherche bibliographique contenant des généralités sur les radicaux libres, le stress oxydatif, les principaux antioxydants naturels et synthétiques, et quelques méthodes expérimentales d'évaluation de l'activité antioxydante à savoir : test de piégeage du radical DPPH, test du piégeage du cation ABTS, le test de réduction de fer (FRAP)....

Deux modèles de composés organiques, déjà étudiés en tant que nouveaux antioxydants ont été présentés comme exemples pour montrer l'intérêt de la synthèse organique dans la recherche et le développement des antioxydants.

Mots clé : radicaux libre, stress oxydant, activité antioxydante, FRAP, DPPH, ABTS.

Abstract

The use of antioxidants resulting from organic synthesis is a very studied and topical subject which the aims of development of new molecules having a powerful antioxidant effect and without danger for the body. This memory presents a bibliographic research containing generalities on free radicals, oxidative stress, the natural and synthetic antioxidants, and some experimental methods for evaluating antioxidant activity, namely: DPPH radical scavenging test, scavenging test the ABTS cation, the iron reduction test (FRAP)....

Two models of organic compounds, already studied as new antioxidants were presented as examples to show the interest of organic synthesis in the research and development of antioxidants.

Keywords: free radicals, oxidative stress, antioxidant activity, FRAP, DPPH, ABTS.

ملخص

يعد استخدام مضادات الأكسدة الناتجة عن التخليق العضوي موضوع بحث في غاية الأهمية يهدف الى تطوير جزيئات جديدة ذات تأثير قوي مضاد للأكسدة وبدون اضرار جانبية على الاجسام الحيوية . نعرض في هذه المذكرة بحثاً ببيولوجياً يحتوي على عموميات حول الجذور الحرة ، الإجهاد التأكسدي ، مضادات الأكسدة الطبيعية والاصطناعية ، وبعض الطرق التجريبية ، اختبار الحد من ABTS ، واختبار الكسح من الكاتيون DPPH لتقييم نشاط مضادات الأكسدة ، وهي: اختبار المسح الجذري (FRAP)..... الحديد

كما تم تقديم نموذجين من المركبات العضوية ، تم دراستهما كمضادات أكسدة جديدة كأمثلة لإظهار أهمية التخليق العضوي في البحث عن مضادات الأكسدة وتطويرها.

الكلمات المفتاحية: الجذور الحرة ، الإجهاد التأكسدي ، النشاط المضاد للأكسدة ، FRAP ، DPPH ، ABTS