الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جـــامعـــة محمد الصديق بن يحـيـــــى جيجـــل

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Sciences de l'Environnement et Sciences Agronomiques

كليـة عـــلوم الطـبيعـة والحـــياة
قســـم: عـــلوم البيئة والعـــلوم الفلاحية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Toxicologie Fondamentale et Appliquée

Thème

Evaluation de l'activité antioxydante des substances nouvellement synthétisées (3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones) contre un stress oxydatif induit par le Plomb

Membres de Jury
Président : Mme Lemzeri H.
Examinatrice: Dr. Mohdeb R.
Encadreur : Dr. Habila S.

Présenté par :
Abdi Selma

Année Universitaire 2018-2019

Numéro d'ordre (bibliothèque) :……..…

Remerciement

Avec un grand soulagement, je dis hamdoulleh. Grace à dieu et à tous mes collaborateurs et collaboratrices ce mémoire est fini.

*Merci à **Dr. Habila Safia** de m'avoir guidé dans mon travail, et de m'avoir apporté son soutien.*

*Je tiens à remercie **Mr Habila Tahir** qui a contribué à ce modeste travail en m'aidant par l'apport de ces précieux produits synthétisés par lui-même.*

*Merci au membre du jury. **Mme Lemzeri Houria** et **Dr Mohdeb Rima**, d'avoir accepté d'évaluer et d'examiner ce travail.*

Merci aux responsables du laboratoire de Pharmacologie et Phytochimie à la Faculté des sciences exactes de l'Université de Jijel.
Qu'ils ont facilité la réalisation de ce travail.

*Je remercie également **Pr Khelili Smail, Dr Lahouel Asma** et **Dr Zabaiou Nada**.*
Enseignants à l'Université de Jijel, pour l'aide qu'ils m'ont apporté au cours de la réalisation de ce modeste travail.

*Je n'oublierai jamais toute la fine équipe du laboratoire de Chimie pharmaceutique de la faculté des Sciences Exactes à l'Université de Jijel en particulier **Rofida, Imen, Nesrine, Adel, Idriss, et Anis.***
Merci pour tout ce que vous avez apporté au labo, Merci pour votre chouette ambiance, votre joie de vivre, vos engagements. Merci pour tous nos petits délires qui pour moi ont imprégné le laboratoire et sont associés à la recherche. Je n'oublierai jamais toutes nos discussions scientifiques et personnelles.

*Mes remerciements iront aussi à tous les enseignants durant mon cursus universitaire. Plus particulièrement **Dr . kebieche Mouhammed** Ex enseignant à l'université de Jijel qui est juste « mon leader ».*

Merci à tous !

Sommaire

Indroduction générale 1

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les métaux lourds 2

1.2. Le plomb (Pb) métal étudié 2

1.2.1 Les principaux effets toxiques du plomb sur la santé humaine 3

2. Le stress oxydant 4

2.1. Les espèces réactives (RS) 5

2.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) 5

2.1.2 Les espèces réactives de l'azote (RNS) 5

2.2. La forme des espèces réactives 6

2.2.1 Les espèces radicalaires 6

2.2.2 Les espèces non radicalaires 6

2.3 La source de production des radicaux libres 6

2.3.1 Les source endogènes 6

2.3.2 Les source exogènes 8

2.4 Le rôle biologique des radicaux libres 10

2.5 Les implications pathologiques des radicaux libres (RLs) 10

2.6 Les antioxydants et la protection cellulaire 11

2.6.1 Les systèmes enzymatiques 12

2.6.2 Les antioxydants non enzymatiques 13

2.7 Antioxydants synthétiques 13

2.7.1 Les dihydropyrimidinones 14

2.7.2 L'activité antioxydant des dihydoropyrimidinones 15

MATERIEL ET METHODES

1. Généralités sur les composés étudiés 16

2. L'évaluation de l'activité antioxydant 18

2.1. L'évaluation de l'activité antioxydant *in vitro* 18

2.1.1. Le pouvoir réducteur (FRAP) 19

2.1.2. Le piégeage du radical cationique ($ABTS^{+\bullet}$) 19

2.1.3. Le piégeage du radical (DPPH) 20

2.2. L'évaluation de l'activité antioxydant *in vitro* sur l'homogénat de foie des souris 21

2.2.1. L'entretien des animaux 21

2.2.2. La préparation de l'homogénat 21

2.2.3. L'induction du stress oxydatif 21

2.2.4. Le dosage tissulaire du Malone-dialdéhyde (MDA) 22

2.2.5. Le dosage tissulaire du glutathion (GSH) 22

3. Les analyses statistiques. 23

RESULTATS ET DISCUSSION

1. L'effet anti-radicalaire contre le radical libre DPPH° 24

2. La détermination du pouvoir réducteur (FRAP) 27

3. Le test de piégeage du radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ 28

4. Le stress oxydatif et le Plomb 30

4.1. La peroxydation lipidique (MDA) 30

4.2. Le dosage tissulaire du glutathion (GSH) 32

Conclusion 36

Référence bibliographiques 37

Annexe

Liste des figures

Figures	Titre	Page
Figure 1	La prédominance des processus d'oxydation causés par le stress oxydatif.	4
Figure 2	Les sites de production intracellulaire des radicaux libres.	7
Figure 3	La génération des ROS par le Cytochrome P450 (CYP).	7
Figure 4	Les sites de production extracellulaire des radicaux libres.	8
Figure 5	Les mécanismes d'action des antioxydants.	11
Figure 6	La structure basique des dihydropyrimidinones.	14
Figure 7	La voie de Synthèse des dérivés des 3,4-dihydriroprimidinone portant des restes urée, thiourée et sulfonylurée (6a-q et 7a-n).	17
Figure 8	La réduction du DPPH° par un antioxydant.	20
Figure 9	L'effet Scavenger des différentes concentrations des échantillons envers le radical $DPPH^{\bullet}$.	25
Figure 10	L'activité antiradicalaire des molécules étudiés et de l'acide ascorbique envers le radical $DPPH^{\bullet}$.	26
Figure 11	Le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique et de nos molécules à différentes concentrations.	27
Figure 12	L'effet piégeur des différentes concentrations des échantillons.	28
Figure 13	L'activité antiradicalaire de nos molécules et de l'acide ascorbique envers le radical $ABTS^{\bullet+}$.	29
Figure 14	La variation des taux du MDA hépatique par le Pb seul.	30
Figure 15	La variation des taux du MDA hépatique en nmol/g de tissu en présence de Pb et de la solution oxydante $FeCl_3$/ $FeSO_4$.	31
Figure 16	La variation des taux du GSH hépatique en µmol/g de tissu en présence de Pb seul.	32
Figure 17	La variation des taux du GSH hépatique en µmol/g de tissu en présence de Pb et de la solution oxydante $FeCl_3$/ $FeSO_4$.	33

Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Les propriétés physico-chimiques du plomb	3
Tableau 2	Les différents types des espèces réactives	6
Tableau 3	Certaines pathologies résultent de stress oxydatif	11
Tableau 4	Les Molécules testés avec la structure chimique de la molécule mère	17

Liste des Abréviations

ABTS : Cide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANOVA : Analyse de variance

BHA : Hydroxyanisole butylé

BHT : Hydroxytoluène butylé

CAT : Catalase

DHPM : Dihydropyrimidinones

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazl

DTNB : 5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)

EC_{50} : Concentration effectrice de 50%

EC-SOD : Extracellulaire superoxyde dismutase

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.

GPx : Glutathions peroxydases

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

MDA : Malone-dialdéhyde

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NOS : Oxyde nitrique synthase

PBS : Phosphate buffer saline

Pb : Plomb

PG : Gallate de propyle

DMSO : Dimethyl sulfoxide

RL : Radical libre

RNS: Reactive nitrogen species

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RS: Reactive species

SNC : Système nerveux centrale

SOD : Superoxyde dismutase

TBHQ : Tert-butylhydroquinone

Vit C : Vitamine C

XO : Xanthine oxydase

Les problèmes posés par la dispersion des polluants dans l'environnement ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique depuis de nombreuses décennies. La prise de conscience de la nécessité de préserver l'écosystème terrestre et aquatique a ainsi fait émerger certaines questions notamment celles du devenir de ces polluants dans l'environnement ainsi que de leurs effets sur les communautés animales et végétales (**Amara, 2011**).

Parmi les contaminants majeurs de l'environnement, les métaux lourds qui posent de sérieux problèmes écologiques, tant par leur caractère ubiquiste que par leur forte rémanence et leur toxicité élevée (**Chouahda et *al*., 2013**). Le plomb est l'un des métaux le plus anciennement utilisé par l'homme est un métal exploité depuis des millénaires, mais son usage s'est accentué avec la révolution industrielle. Plusieurs études ont révélé les effets délétères de ce métal sur différentes fonctions biologiques, notamment la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) agissant comme étant médiateurs des lésions cellulaires en raison de leur capacité de causer un stress oxydatif **(Ercal et *al*., 1996 ; Moon et Shibamoto, 2009 ; Jamesdaniel et *al*., 2018).**

Le stress oxydatif imposé à la santé humaine par les oxydants environnementaux peut être réduit par une consommation accrue des antioxydants, or la synthèse chimique des antioxydants dotés de propriétés anti-radicalaires est devenue un axe de recherche primordial dans les milieux universitaires et la recherche industrielle (**Anastas et Warner, 1998 ; Clark et Macquarie, 2002 ; Gangwar et kasana, 2012 ; Attri et *al*., 2017**).

La chimie médicinale a progressé avec la synthèse de composés de plus en plus spécifiques à faible cytotoxicité. Dans ce contexte, les chercheurs se sont orientés ces dernières années vers la synthèse d'une série de dérivés de composés chimique dits dihydropyrimidinones (DHPM) (**Kumar et *al*., 2009 ; Kaur, 2017 ; Attri et *al*., 2017**), qui sont des composés hétérocycliques synthétisés par des réactions classiques comme la réaction de Biginelli (**Biginelli, 1893**). Cette classe de composés est devenue importante dans le domaine de la chimie médicinale grâce au noyau dihydropyrimidinone considéré comme étant pharmacophore dotant de plusieurs propriétés biologique **(Kappe, 2000).**

Ce travail vise d'une part à évaluer l'activité antioxydante *in vitro* de nouveaux dérivés de composés 3,4-dihydropyrimidine-2(1H)-on portant des groupes sulfonylurée, urée et thio-urée en utilisant le test $DPPH^{\bullet}$ (2,2-diphényl-1picrylhydrazyl), le test de piégeage du radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ [acide 2,20-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic) et le test de réduction de fer (FRAP) , et d'autre part à tester les produits les plus actifs comme des agents antioxydants contre un stress oxydatif induit par le plomb *in vitro* au niveau des homogénats des foies des souris albinos *Wistar*.

1. Les métaux lourds

L'appellation métaux lourds est attribuée aux éléments métalliques ayant une densité supérieure à 5 g/cm³ et présentent un caractère toxique à des faibles concentrations **(Adriano, 2001 ; Cossio et *al*., 2002 ; Bánfalvi, 2011).** Bien qu'elle soit relativement claire et non ambiguë, cette définition peut être une source de confusion, car certains métaux ne sont pas particulièrement lourds comme le zinc, tandis que certains éléments toxiques ne sont pas des métaux comme l'arsenic **(Cossio et *al*., 2002).** Parmi les principales caractéristiques communes entre tous les métaux lourds est leur non biodégradabilité dans l'environnement et leur bioaccumulation **(Zhuang et *al*., 2016 ; Xu et *al*., 2017).** Certains métaux, les oligoéléments essentiels, comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le chrome (Cr), nickel (Ni), le cobalt (Co), le molybdène (Mo) et le fer (Fe), sont indispensables à la vie et peuvent être toxiques à des très faibles ou des très fortes concentrations. D'autres comme l'aluminium (Al), l'Arsenic (As), le cadmium (Cd), le mercure (Hg), l'étain (Sn) et le plomb (Pb) (également appelés xénobiotiques) n'ont aucun rôle biologique et sont considérés comme néfastes et peuvent entraîner des effets toxiques à des très faibles concentrations **(Arockia Vasanthi et *al*., 2013 ; Sfakianakis et *al*., 2015).**

1.2. Le plomb (Pb)

Le plomb est, sans nul doute, l'un des métaux qui a été le plus anciennement et le plus largement utilisé par l'homme, Le plomb, du latin *plombum*, est un métal mou, gris bleuâtre malléable, sans goût ni odeur caractéristique, est un métal de classe B, post-transition (numéro atomique 82). Il existe principalement dans son état oxydant divalent **(Juste, 1988 ; Mager, 2011).** Sa présence dans l'environnement peut être d'origine naturelle ou anthropique **(Bektaş et *al*., 2004).** En effet, le plomb peut être issu de l'industrie métallurgique **(Stouthart et *al*., 1995).** Il provient également de la galvanoplastie, de la fabrication des batteries, des industries des pigments et des colorants, de l'emploi du plomb tétra méthyle dans les carburants et de l'utilisation des combustibles fossiles **(Subhashini et *al*., 2013 ; Ravindra Kumar Gautam, 2014).**

Tous les auteurs s'accordent pour reconnaître qu'il est souvent difficile d'identifier la source de plomb ayant intoxiqués l'être humain (**Landrans et Paclot, 1994 ; Landrans et *al*., 1999**). Environ 1/3 des causes d'intoxications restaient inconnues, bien que les principaux secteurs d'activité exposés au plomb sont le bâtiment, l'industrie et l'artisanat (**Certin et *al*., 2007**), pour les enfants, en raison de leurs comportements de « Pica » et de « mainbouche », sont plus fréquemment soumis aux risques engendrés par les écailles de peintures ou les poussières chargées en plomb (**Goyer et Clarkson, 2001**).

Les principales propriétés physico-chimiques du plomb sont représentées dans le **tableau 1**.

Tableau 1. *Propriétés physico-chimiques du plomb* ***(Lenntech, 2007).***

Symbole chimique	*Pb*
Numéro atomique	82
Masse volumique	11.34 g/cm3 à 20°C
Masse atomique	207.2g/mol
Etat d'oxydation	+2
Température de fusion	327.4°C
Température d'ébullition	1740°C

1.2.1. Les principaux effets toxiques du plomb sur la santé humaine

- **La toxicologie aiguë**

L'intoxication aiguë ne se rencontre plus que très rarement aussi bien dans l'industrie qu'en milieu non professionnel, mais elle peut néanmoins se produire par inhalation ou par absorption dans des situations accidentelles. L'essentiel des données rapportées dans littérature concerne l'absorption de plomb ou ses dérivés par voie orale. Les troubles digestifs sont parmi les symptômes les plus précoces. Ils se traduisent par l'apparition de fortes coliques associées à des douleurs et crampes abdominales, ainsi qu'à des vomissements (**Awad et *al*., 1981 ; Schyeitzer et *al*., 1990**).

Le plomb présente un certain nombre de particularités au plan de sa toxicocinétique. La première d'entre elles est sa très forte absorption chez l'enfant comparativement à l'adulte **(Goullé et *al*., 2016)**, les enfants présentaient des signes de constipations sévères, souffraient d'anorexies de vomissements par phases intermittentes **(Malcom et Dascher, 1970).** L'atteinte rénale a été décrite par différents auteurs, et plusieurs s'accordent à mentionner l'apparition de lésions tubulaires caractérisées par une oligurie, une albuminurie, une glycosurie et une hyperphosphaturie (**Bennett, 1985**). La sévérité des lésions peut aller jusqu'à entraîner la mort des sujets exposés, mais l'administration rapide d'un traitement rend en principe les effets réversibles (**Cézard, 1992**). En cas d'atteinte sévère, les lésions au niveau du système nerveux central se manifestent cliniquement par une encéphalopathie convulsive et un coma pouvant conduire à la mort (**Kehoe, 1961**).

Des atteintes hépatiques ont parfois été observées chez des enfants présentant des signes d'intoxication aiguë par le plomb **(Etchevers et *al*., 2017)**. Elles se manifestent par la réduction de

la métabolisation de certains médicaments (antipyrine, EDTA) qui serait liée à la diminution du contenu en cytochrome P450 (**Saenger et *al.*, 1984**).

- **La toxicologie chronique**

Les signes cliniques d'exposition répétée au plomb (intoxication chronique) sont peu spécifiques car les symptômes demeurent pour la plupart du temps discrets et insidieux **(Saka et *al.*, 2011).** Les principales pathologies sont très variées et dissemblables. On relève à titre d'exemple les syndromes : Hématologiques **(Hammond et *al.*, 1985**), les effets sur le SNC (**Parkinson et *al.*, 1986**), sur effet le système rénal **(Nuyts et *al.*, 1991**), effets cardiovasculaires **(Dingwall-Fordyce et Lane, 1963**), effets sur la reproduction (**Garnier, 2005**), effets cancérogènes (**IARC, 2006**).

2. Le stress oxydant

L'organisme doit confronter et contrôler la présence des antioxydants et des pro-oxydants continuellement, ces derniers sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Le stress oxydant est le terme se rapportant au déséquilibre entre les systèmes producteurs des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène et les systèmes de défense antioxydants (**figure 1**). C'est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des espèces radicalaire toxiques (**Durackova, 2008 ; Ríos-Arrabal et *al.*, 2013**).

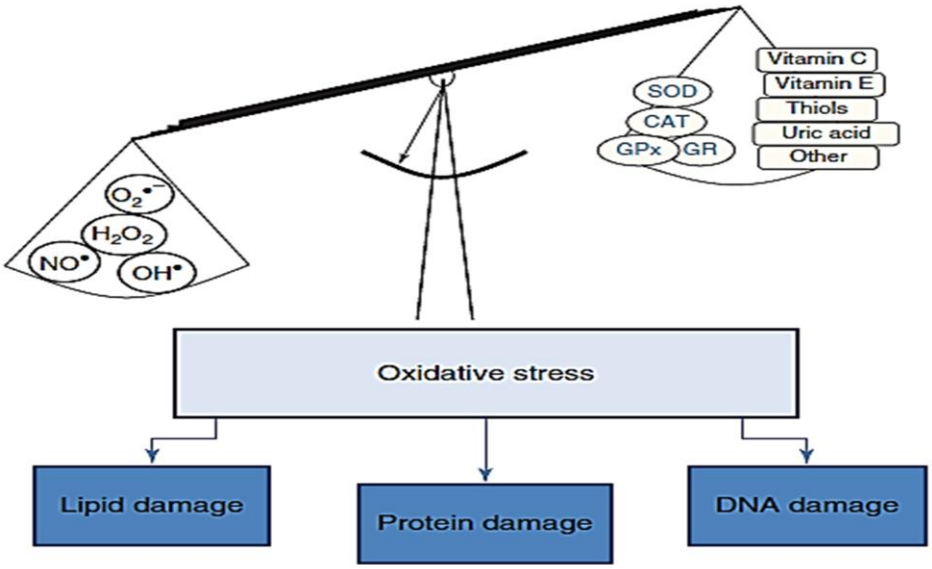


Figure 1**: La prédominance des processus d'oxydation causés par le stress oxydatif* ***(Armstrong, 2016).

2.1. Les espèces réactives (RS)

Les espèces réactives (RS) sont souvent des radicaux libres, un radical libre (RL) est un atome ou une molécule qui porte sur sa couche électronique périphérique un ou plusieurs électrons non appariés. Cela entraine une très haute réactivité chimique avec les éléments voisins. **(Leverve, 2009 ; Rochette, 2008)** formant des liaisons covalentes, procure aux radicaux libres une très grande instabilité **(Cheesman et *al*., 1993).**

Les radicaux libres sont omniprésents dans notre corps, générés par des processus physiologiques normaux y compris le métabolisme aérobie et les réponses inflammatoires, pour éliminer les microorganismes pathogènes envahisseurs. **(Govindarajan et *al*., 2005).**

Il existe majoritairement deux grandes classes d'espèces réactives: les espèces réactives de l'oxygène ROS (Reactive Oxygen Species) et les espèces réactives d'azote RNS (Reactive Nitrogen Species) **(Yan, 2014).**

2.1.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

L'oxygène (O2) est un élément essentiel pour des processus de la vie en aérobiose. Cependant, environ 5 % ou plus de l'O2 inhalé est converti en espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS présentent un groupe de composés dérivés de la réduction incomplète de l'oxygène moléculaire (**Merksamer *et al*., 2013**). Les ROS sont des médiateurs importants de la signalisation pendant divers processus biologiques, ils sont produits en réponse à des divers stimulus, y compris des facteurs de croissance, des cytokines et des facteurs chimiotactiques (**Zhou *et al*., 2013**).

2.1.2. Les espèces réactives de l'azote (RNS)

Le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$), un RNS, est produit de manière endogène à partir de L'arginine, de l'oxygène et du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) par plusieurs enzymes d'oxyde nitrique synthase (NOS) en réponse à un certain nombre de stimulus physiologiques. Le $NO^{\bullet}$ est une espèce très réactives, il représente le messager moléculaire idéal, il est impliqué dans le règlement d'un certain nombre de fonctions y compris la tension artérielle, phagocytes et l'activité antimicrobienne, homéostasie endothéliale et neuronale, adhérence de plaquette et de leucocyte, et l'induction de l'apoptose (**De Marco, 2013**).

2.2. La forme des espèces réactives

2.2.1. Les espèces radicalaires

Un radical libre est une espèce chimique (atome, molécule ou ion) qui porte sur sa couche électronique périphérique un ou plusieurs électrons non appariés (**Tableau 2**), ce qui la rend chimiquement très réactive (**Leverve, 2009**). Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule pour devenir plus stable, conduisant ainsi à une réaction en chaîne qui va produire de nouveaux radicaux libres car la molécule agressée devienne à son tour radicalaire (**Afonso et *al.*, 2007**). Ces espèces radicalaires sont de plus en plus impliquées dans les différentes maladies humaines (**Rao et *al.*, 2011**).

2.2.2. Les espèces non radicalaires

Ce sont des espèces non radicalaires qui acceptent deux électrons pour donner des produits non radicalaires (**Tableau 2**). Ils peuvent être convertis en radicaux libres par réaction avec un métal de transition (**Winterbourn, 2016**).

Tableau 2. *Différents types des espèces réactives* ***(Gutowski et Kowalczyk, 2013).***

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	**Symbole**	**Nom**	**Symbole**
Anion superoxyde	$O2^{\bullet -}$	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	$NO^{\bullet}$	Oxygène singulet	$^{1}O_2$
Radical alkoxyle	$RO^{\bullet}$	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	$OH^{\bullet}$	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyle	$ROO^{\bullet}$	Peroxynitrite	$ONOO^{-}$

2.3. La source de production des radicaux libres

2.3.1. Les sources endogènes

Les sources endogènes sont intracellulaires, la production des ROS dans les cellules mammifères découle de plusieurs sources possibles (**Figure 2**) dont la plus importante est la mitochondrie qui est responsable de la production de 90% des ROS cellulaires **(Assis de Silva et Mela, 2014).** De même, les radicaux libres sont produits *in vivo* sous l'action de plusieurs systèmes

biochimiques tel que, les cellules neuronales, endothéliales et phagocytaires (macrophages) **(Ansari, 1997 ; Valko et *al*., 2006).**

Au niveau des mitochondries, au cours du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire, l'$O_2^{\bullet-}$, est produit par réaction de l'O_2 avec un radical semi-ubiquinone (**Lagourge et Lorsson, 2013**). Les complexes, nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH)-ubiquinone oxydoréductase et l'ubiquinone-cytochrome c réductase, sont alors d'importants complexes membranaires mitochondriales qui peuvent générer d'$O_2^{\bullet-}$ et d'H_2O_2 (**Zhang et Gutterman, 2007 ; Grivennikova et Vinogradov, 2013**).

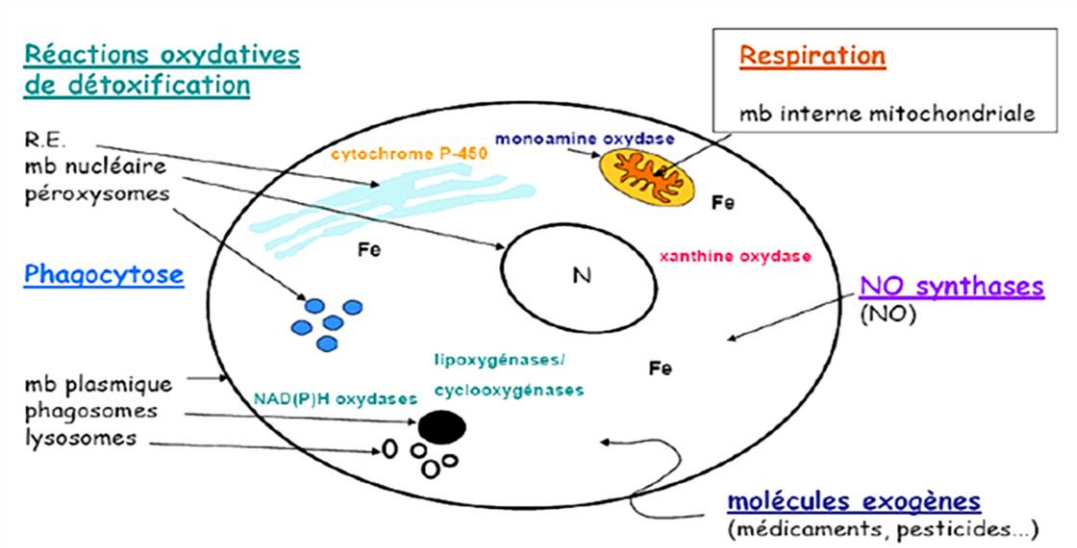


Figure 2. *Les sites de production intracellulaire des radicaux libres* ***(Serteyn et al., 2003).***

Le peroxysome est aussi une source importante dans la production cellulaire d'H_2O_2, cet organite contient de nombreuses enzymes générant d'H_2O_2 **(Sandalio et *al*., 2013).** La catalase peroxysomale utilise l'H_2O_2, généré par les enzymes de peroxysome, comme substrat pour réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats, ces enzymes sont importantes dans les processus de détoxification présents dans le foie **(Wages et *al*., 2014).**

Le réticulum endoplasmique est considéré aussi comme une autre importante source de la production des ROS. En effet, le métabolisme oxydatif des molécules liposolubles est catalysé par le système cytochrome P450 responsable de l'oxydation des composés endogènes et des xénobiotiques contribuent donc à l'augmentation de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène **(Figure 3) (Zangar et *al*., 2004).**

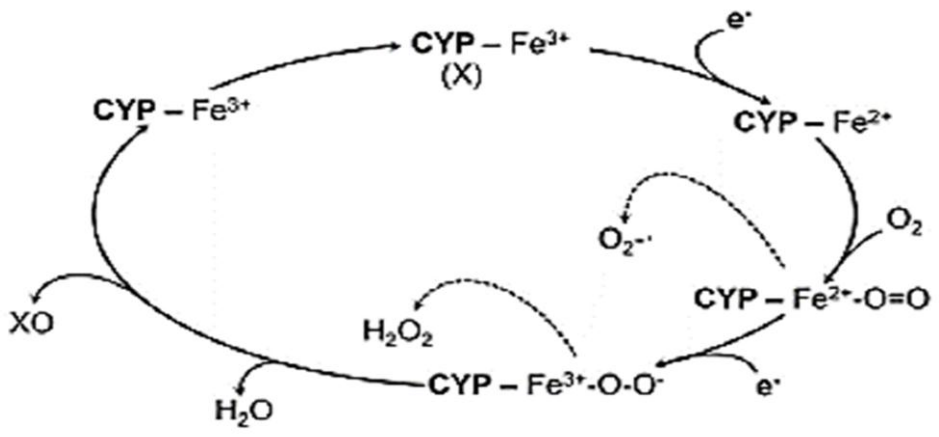


Figure 3. *La génération des ROS par le Cytochrome P450 (CYP)* (***Boelsterli, 2007).***

L'oxyde nitrique synthase (NOS) est un générateur important du NO•, à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Le NO• permet la production des autres RNS tel que le peroxynitrite $ONOO^-$ **(Rahal et *al*., 2014).**

2.3.2. Les sources exogènes

Les sources exogènes sont extracellulaires, l'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme (**figure 4**). Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérogènes non-génotoxiques peuvent directement ou indirectement être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes). L'exposition prolongée au soleil, ainsi les rayonnements UV induisent la synthèse de $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$,$^1O_2$ et d'H_2O_2 l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants **(Martinèz-Cayuela, 1995 ; Chen et *al*., 2012).**

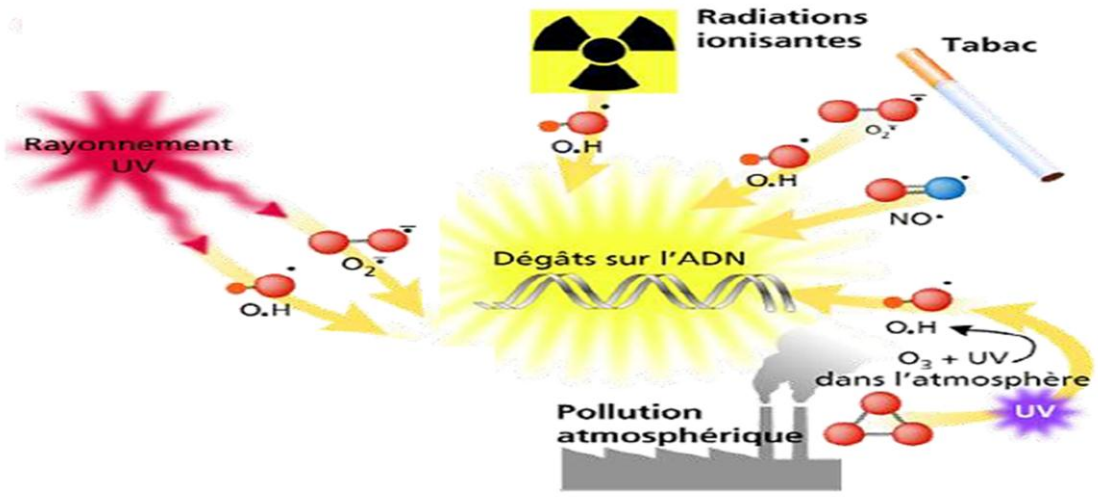


Figure 4. *Les sites de production extracellulaire des radicaux libres* (**Durackova, 2008**).

- **La génération des ROS par les éléments traces métalliques**

Les éléments traces métalliques sont considérés parmi les différentes classes des polluants de l'environnement responsables des effets nocifs sur les organismes à travers la génération des espèces réactives de l'oxygène, à cause de leur capacité à perdre des électrons **(Radwan et *al.*, 2010 ; Oliva et *al.*, 2012).** En effet, les métaux de transition tels que le Fe, le Cu, le Cr, le Cd et le Pb peuvent catalyser la réaction Fenton **(Jomova et Valko, 2011),** dans laquelle un ion métallique peut réagir avec le pyroxide d'hydrogène H_2O_2 selon la réaction suivante **(Lackner, 1998) :**

$$\textbf{Métal}^{+} + H_2O_2 \longrightarrow \textbf{Métal}^{+} + \bullet OH + OH^{-}$$

Les métaux lourds peuvent aussi générer les espèces réactives de l'oxygène par le biais de la réaction d'Haber-Weiss. Ainsi, un métal oxydé est réduit par l'O_2 puis réagit avec H_2O_2 pour produire le radical • OH selon les réactions suivantes :

$$\textbf{Métal}^{+1} + O_2^{-} \longrightarrow \textbf{Métal}^{+} + O_2$$

$$\textbf{Métal}^{+} + H_2O_2 \longrightarrow \textbf{Métal}^{n+1} + \bullet OH + OH^{-}$$

$$O_2 + H_2O_2 \longrightarrow {}^{+}O_2 + \bullet OH + OH^{-}$$

En plus des réactions de fenton et de Haber-Weiss, certains métaux lourds comme le Cadmium (Cd), l'arsenic (As) et le plomb (Pb) peuvent contribuer indirectement à la production des ROS en réagissant avec les groupes SH du glutathion et les défenses antioxydantes enzymatiques **(Gavrić et *al.*, 2017).**

- **La génération des ROS par le plomb**

L'activité pro-oxydante du plomb a été étudiée et démontrée dans de nombreuses études. Les effets toxiques du plomb sur la cellule sont attribués à sa capacité de produire les espèces réactives d'oxygène responsables d'un stress oxydatif et à son affinité pour le groupe sulfhydrile dans le glutathion réduit, ce qui peut avoir des implications pour le maintien de l'équilibre des thiol-disulfures dans la cellule. **(Shafiqur-Rehman et *al.*, 1995 ; Dragun et *al.*, 2012 ; Tchounwou et *al.*, 2012)**.

Les dommages oxydatifs induits par le plomb pourraient également résulter de l'accumulation d'acide aminolévulinique, qui est une source endogène latente de radicaux libres. De plus, le plomb pourrait interagir avec les membranes biologiques pour conduire à la peroxydation lipidique, un autre mécanisme est que le plomb pourrait réduire la production de plusieurs enzymes piégeant les radicaux libres, comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la et de glutathion peroxydase **(Howard, 1974 ; Sugawara et *al.*, 1991 ; Costa et *al.*, 1997).**

2.4. Le rôle biologique des radicaux libres

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. En effet, ils ont des rôles physiologiques très importants au sein des cellules en agissant sur le fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, et sur la régulation des gènes **(Favier, 2003),** à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire (**Ardestani et Yazdanparast, 2007 ; Alexandrova et Bochev, 2007).**

2.5. Les implications pathologiques des radicaux libres (RLs)

Lors d'un stress oxydant, les RLs non détoxiquées par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines et l'acide désoxyribonucléique (ADN) **(Menon, 2014).**

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les RLs. L'attaque radicalaire peut entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées, mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaine simple brin **(Burton et Jauniaux, 2011 ; Charbon et *al*., 2014).**

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par l'$OH^{\bullet -}$ qui est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. Cette réaction est appelée peroxydation lipidique qui aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques. Parmi ces dérivés, le Malon dialdéhyde qui a une demi-vie plus longue que celle des RLs et qui diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN, et il provoque aussi une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète **(Miwa et *al*., 2008 ; Cotticelli et *al*., 2013).**

Les protéines sont aussi sensibles aux attaques radicalaires. Les RLs sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine et l'histidine, sur lesquels l'OH• s'additionne. L'oxydation par les RLs conduit à la formation des ponts disulfures, sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, en modifiant la conformation de la protéine. De nombreux enzymes cellulaires et protéines de transport vont ainsi

être oxydées et inactivées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques, et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases **(Dŭračková, 2008 ; Rahal et *al*., 2014).**

Un stress oxydatif est souvent associé à toutes sortes de maladies, mais il n'est pas toujours facile de déterminer s'il s'agit d'une cause ou une conséquence de l'état observé. Une sélection de pathologies pour lesquelles le mécanisme de stress oxydatif est bien documenté, est décrite dans le **tableau 3.**

Tableau 3 : *Certaines pathologies résultent de stress oxydatif.*

Pathologie	Référence
Cancer	**(Goetz et Luch, 2008)**
Diabète	**(Asmat et *al*., 2016)**
Obésité	**(Ruiz-Ojeda et *al*., 2018)**
Maladies neurodégénératives	**(Bhat et *al*., 2015)**
Schizophrénie	**(Yao et Keshavan, 2011)**
Inflammation	**(Libetta et *al*., 2011)**

2.6. Les antioxydants et la protection cellulaire

Notre organisme est capable, dans une certaine mesure, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense enzymatiques et chimiques développés au cours de l'évolution **(figure 5),** les molécules ou micro constituants capables d'interférer avec les radicaux libres sont appelées antioxydants**,** défini comme une substance capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation une fois est ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air. **(Matés *et al*., 1999 ; Rahman, 2007).** Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive **(Park et *al.* 2001 ; Valdo et *al.* 2006).**

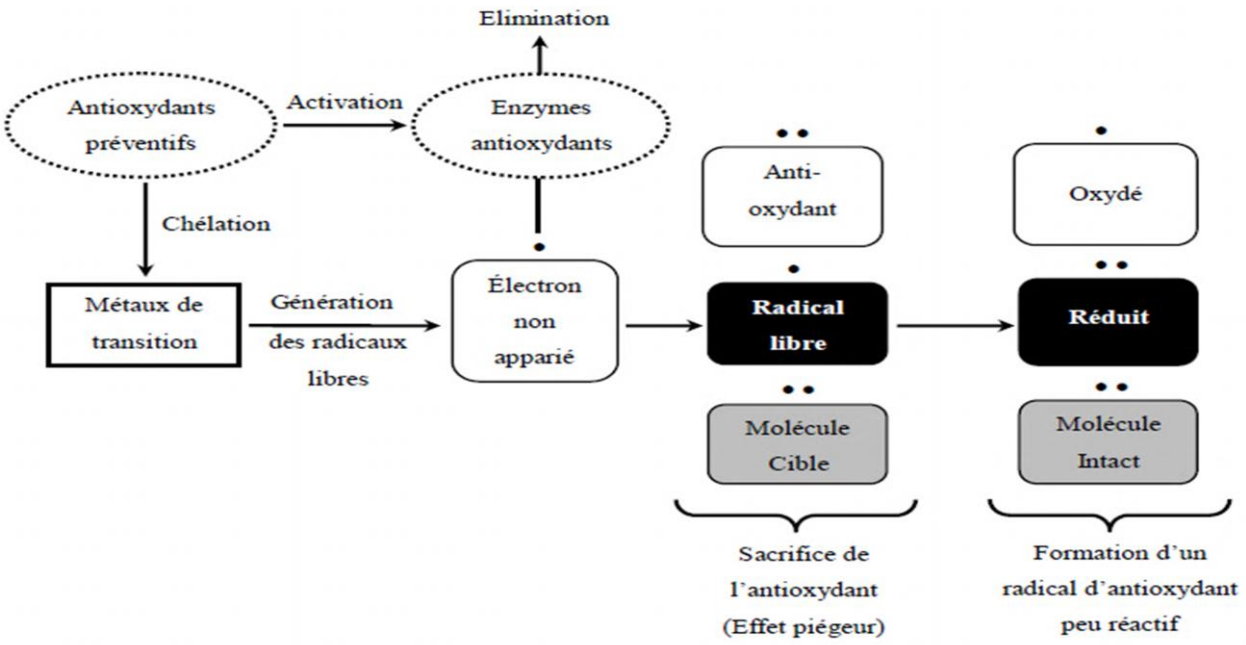


Figure 5**. Le mécanismes d'action des antioxydants* ***(Kalam et al., 2012).

2.6.1. Les systèmes enzymatiques

La Superoxyde discutasse (SOD) réagit contre les produits toxiques de métabolisme cellulaire, et catalyse la disputation d'$O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 **(Equation 1)** (**Papa et *al.* 2014**). Cette enzyme associée à des cofacteurs métallique : ions de cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD) c'est une forme cytotoxique et nucléaire, manganèse (Mn-SOD) c'est une forme mitochondriale et une forme extracellulaire (EC-SOD) (**Peng *et al*., 2014**).

$$\mathbf{H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \Longrightarrow O_2 + OH^- + HO^{\bullet}} \qquad \textbf{(1)}$$

La Catalase (CAT) est une enzyme qui catalyse la transformation d' H_2O_2 en H_2O et oxygène moléculaire **(Equation 2)** (Bonnefon-Rousselot et Colin, 2010), et se trouve dans les hématies et dans les peroxysomes de nombreux tissus et cellules (**Tokar et *al*., 2014**).

$$\mathbf{2\ H_2O_2 \Longrightarrow 2\ H_2O + O_2} \qquad \textbf{(2)}$$

La glutathion peroxydase (Gp) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la disputation d'H_2O_2 en H_2O et O_2 et la réduction de divers hydro peroxydes lipidiques. Lors de cette réaction **(Equation 3)**, deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion disulfure (GSSG) (**Jacquot, 2013**). Le GSSG ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) utilisant le NADPH comme donneur d'électron **(Equation 4)** (**Foyer et *al*., 2008 ;**

Long et *al*., 2012). Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries (**Sorgo, 2004**).

$$\mathbf{ROOH + 2\ GSH \Longrightarrow ROH + GSSG + H_2O} \qquad \mathbf{(3)}$$

$$\mathbf{H_2O_2 + 2\ GSH \Longrightarrow H_2O + GSSG} \qquad \mathbf{(4)}$$

2.6.2. Les antioxydants non enzymatiques

La vitamine C (Vit C) empêche l'oxydation des lipoprotéine de basse densité (LDL) produites par divers systèmes générateurs des ROS (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase) **(Limbach et Guilland, 200**7). La Vit C est hydrosoluble et localisé dans le cytosol et le fluide extracellulaire, elle capte directement l'$O_2^{\bullet-}$ et l'$OH^{\bullet-}$ (**Comhair et Erzurum, 2002 ; Peng et *al*., 2014**).

Les caroténoïdes, ce sont des pigments liposolubles jaunes, orangée à rouge, synthétisés par les plantes et les microorganismes. Les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'$^1O_2$ et les RLs en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (**Tanumihardjo, 2013**).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires ont des propriétés antioxydantes, et en particulier la classe des flavonoïdes. Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des RLs, par chélation de métaux de transition comme le fer ou par inhibition de l'activité de la XO (**Li *et al*., 2014**).

2.7. Antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques, à savoir l'hydroxyanisole butylé (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT), le gallate de propyle (PG) et la tert-butylhydroquinone (TBHQ) **(Shahidi et Naczk 2004 ; Shahidi 2015)** sont plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire, leur utilisation est strictement réglementée par les gouvernements en raison de leur toxicité potentielle et leur risques sur la santé **(Ambigaipalan et Shahidi, 2015).**

Les antioxydants synthétiques sont généralement préparés en laboratoire, et principalement à partir de composants chimiques**,** sont généralement utilisés dans les huiles végétales, comme par exemple le BHT qui contrôle l'oxydation des acides gras dans les huiles de noix de coco et de palmiste qui sont généralement utilisées dans les céréales et les confiseries **(Shahidi et Wanasundara, 1992)**. La combinaison aussi de BHT et de 3-BHA présente une activité antioxydante plus élevée dans l'huile de soja, le lard et l'oléate de méthyle **(Nanditha et Prabhasankar**, **2009)**. Pour le TBHQ a été démontré qu'il présente une plus grande activité

antioxydante dans les huiles marines raffinées, blanchies et désodorisées que le BHA, le BHT (**Shahidi et Wanasundara, 1995**). La PG inhibe la xanthine oxydase et supprime les ROS intracellulaires dans une lignée cellulaire humaine de leucémie (HL-60) **(Lin et *al.*, 2000)**

Ces antioxydants synthétiques sont utilisés par l'industrie alimentaire depuis plus de 60 ans. Néanmoins, certaines études **(Rodil et *al.*, 2010 ; Biparva et *al.*, 2012),** ont montré que le BHA et le BHT peuvent avoir de faibles effets cancérogènes chez certains animaux à des concentrations élevées, **Dolatabadi et Kashanian, (2010)** ont signalés que le PG et le BHA ont le potentiel de former des complexes moléculaires avec les acides nucléiques et de causer des dommages à la structure double hélice de l'ADN, le BHT a la capacité de réduire les facteurs de coagulation sanguine dépendants de la vitamine K et peut donc causer des hémorragies internes et externes suffisamment graves pour causer la mort chez certaines souches de souris et de cobayes **(Ito et *al.*, 1986).**

En sus de ces antioxydants synthétiques, nous nous sommes intéressés à une nouvelle série d'antioxydants récemment synthétisés, ce sont des dérivés de la 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones (DHPM) qui ont fait l'objet d'une attention considérable dans le domaine de la chimie médicinale en raison de leurs activités biologiques importantes.

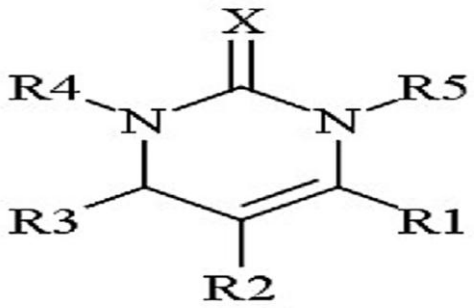
2.7.1. Les dihydropyrimidinones

Les dihydropyrimidinones, connues sous le nom de composés Biginelli **(Biginelli, 1893)**, sont des unités hétérocycliques **(Figure 6)** dotant d'un fragment pyrimidine dans le noyau, qui joue un rôle important dans la synthèse de l' ADN et l' ARN, le noyau dihydropyrimidinone est un pharmacophore important en chimie médicinale.(**Barbosa et *al.*, 2016).**

Des structures dérivées du DHPM sont également présentés dans le squelette de plusieurs alcaloïdes marins polycycliques naturels de guanidine tels que la crambine, la batzelladine B (puissants inhibiteurs du VIH gp-120CD4) et les alcaloïdes de ptilomycaline, les DHPM peuvent donc être considérés comme des structures précieuses pour la recherche et la synthèse de leurs dérivés reste un axe majeur de la découverte de médicaments modernes **(Beena et *al.*, 2017).**

Les composés contenant l'unité pyrimidine/DHPM ont diverses propriétés biologiques, ils jouent un rôle très important dans le domaine de la chimie organique naturelle et synthétique qui possèdent diverses propriétés thérapeutiques et pharmacologiques, notamment des activités antioxydantes **(Stefani et *al.*, 2006 ; Barbosa et *al.*, 2016),** anticancéreuses **(Holla et *al.*, 2004** ; **Da Silva et *al.*, 2012)**, anti-inflammatoires **(Bahekar et Shinde, 2004 ; Tale et *al.*, 2011),** antibactériennes **(Akhaja et Raval, 2011** ; **Attri et *al.*, 2017)**, antidiabétiques (**Dhumaskar et *al.*, 2014**). Ils possèdent également des propriétés antagoniste/inhibitrice de l'acétylcholinestérase

(Ahmad et *al*., 2016), et ils sont considérés comme des modulateurs des canaux calciques (**Habila et *al*., 2018**).



X= O, NH or S
R1-5 = H, alkyl, aryl, ester, amide, acyl, (thio)urea or an heterocycke

Figure 6. *La structure basique des dihydropyrimidinones* ***(Matos* et *al., 2018).***

2.7.2. L'activité antioxydant des dihydoropyrimidinones

Les dihydropyrimidinones (DHPM), s'obtiennent facilement via la réaction multi-composante de Biginelli et sont signalés comme étant de bons antioxydants agissant contre la peroxydation des lipides **(Gangwar et Kasana, 2012 ; Attri et *al*., 2017),** certains dérivés de DHPM, ont montré une forte activité contre la peroxydation lipidique induite par le Fe-EDTA **(Borges et *al*., 2016 ; de Vasconcelos et *al*., 2012**), tandis que d'autres étaient plus puissants pour réduire les ROS, avec une activité dépendante du glutathion **(Stefani et *al*., 2006)**.). Ils sont également considérés comme chélateurs du fer (II) un puissant prooxydant métallique catalyseur de la réaction de fenton (**Gangwar et Kasana, 2012**).

Ce travail est réalisé au niveau du laboratoire de Pharmacologie et Phytochimie à la Faculté des sciences exactes et d'informatique de l'Université de Jijel. Au cours de ce travail, nous avons évaluée l'activité antioxydante de dix molécules qui dérivent de 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones portant des restes d'urée, thiourée et sulfonylurée par l'utilisation des méthodes suivantes : réduction du fer (FRAP), test de Piégeage du radical libre $DPPH^{\bullet}$ (2,2-diphényl-1picrylhydrazyl), le test de piégeage du radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ [acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)], ainsi que les paramètres du stress oxydant hépatique GSH et MDA.

1. Généralités sur les composés étudiés

Ces dérivés ont été synthétisés par **Habila et *al*., (2018).** Ils possèdent comme squelette de base la dihydroprimidinone qui est un isostère de la dihydropyridine qui constitue le cycle de base de certains médicaments notamment la nifèdipine, un inhibiteur calcique très puissant utilisé dans le traitement de certaines maladies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, l'arythmie cardiaque et l'angine de poitrine (**Habila et *al.*, 2018**).

La synthèse des nouveaux dérivés de 3,4-dihidroprymidinone portant des restes d'urée, thio-urée et sylfonyl-urée peut être réalisée en trois étapes (**Figure 7**). En effet la première étape consiste à la préparation des intermédiaires clé (**4a et 4b**) suivant la réaction de Biginelli lors de laquelle deux catalyseurs ont été utilisés.

- Le premier catalyseur est le nitrate de zinc alors que le deuxième est un aluminate de zinc dopé par le nickel ($Zn0.9Ni0.1Al_2O_4$).
- La deuxième étape est la réduction du groupe nitro portée par le groupe aryle en position 4 de l'hétérocycle pour obtenir les produits (**5a et 5b**).
- Enfin, la réaction de condensation du produit **5a** (et **5b**) avec un isocyanate, un thioisocyante ou sulfonylisocyanate d'aryles.

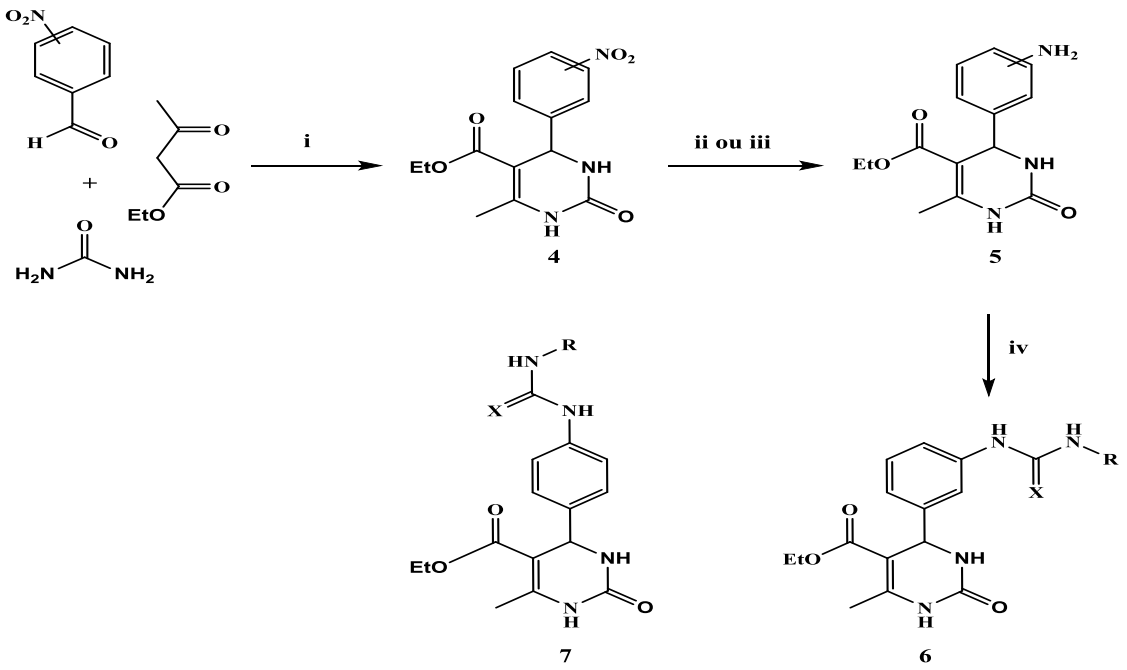
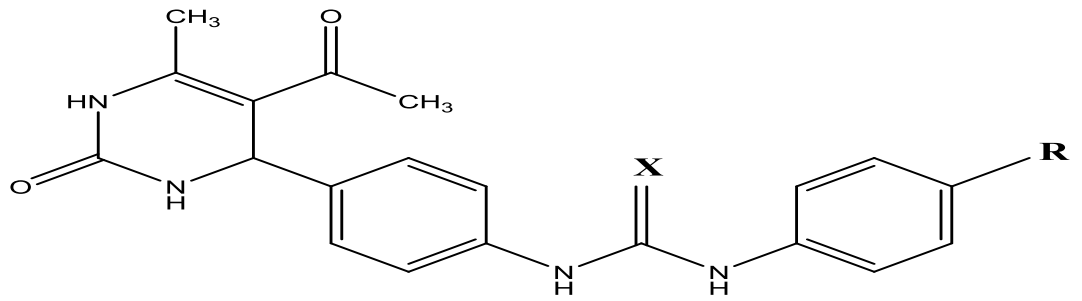
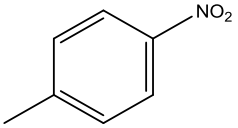


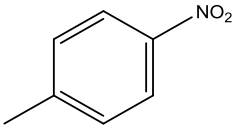
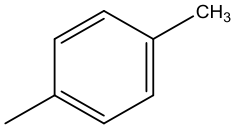
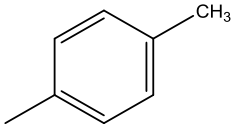
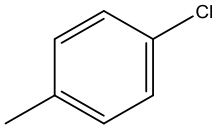
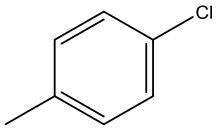
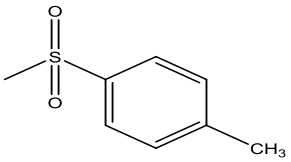
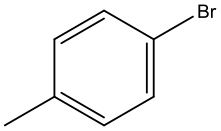
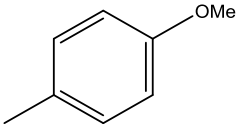
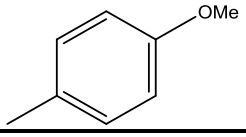
Figure 7. *Voie de Synthèse des dérivés des 3,4-dihydriroprimidinone portant des restes urée, thiourée et sulfonylurée (6a-q et 7a-n). (i): ($Zn(NO_3)2.6H_2O$/acétonitrile ou $Zn0.9Ni0.1Al_2O_4$/éthanol. (ii) : H2/Pd,C 5% ou (iii) HCOONH4/ Pd,C 5%. (iv) : RNCS ou RNCO ou RSO_2NCO/THF anhydre ou R=Ar ou $ArSO_2$.* **(Habila et *al*., 2018).**

Les 10 molécules sur lesquelles on a réalisé l'étude de l'activité antioxydante sont représentées dans le **Tableau 4** ci-dessous.

Tableau 4 : *les Molécules testés avec la structure chimique de la molécule mère.*



Molécule		X	-R	
6a	$HTNO_2S$	S		4-NO_2-Ph-

6b	$HTNO_2$	O		4-NO_2-Ph-
6c	$HTCH_3S$	S		4-Me-Ph-
6d	$HTCH_3$	O		4-Me-Ph-
6e	HTClS	S		4-Cl-Ph-
6f	HTCl	O		4-Cl-Ph-
6g	38	S		4-Me-Ph-SO_2-
6h	114	O		4-Br-Ph-
6i	HTOMLS	S		4-OMe-Ph-
6j	HTOML	O		4-OMe-Ph-

2. L'évaluation de l'activité antioxydante

2.1. L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

Les composés à tester, sous forme de poudre, ont été solubilisées dans le DMSO. Dans une première étape, une solution mère de concentration de 1mg/ml a été préparée. Toutes les molécules ont été testées à cette concentration (1 mg/ml) sur les trois essais choisis. Des solutions diluées ont été préparées par la suite à partir de la solution mère pour les composés montrant une activité à la

concentration de 1mg/ml afin de déterminer les concentrations à 50% de l'effet maximal (EC_{50}). Les solutions diluées ainsi préparées allant de 1000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, 100µg/ml et 50µg/ml, 25µg/ml, 10µg/ml, 5µg/ml jusqu'au 1µg/ml suivant l'effet observé. Les molécules ayant une EC_{50} la plus faible ont été choisies pour mesurer les paramètres du stress oxydant hépatique, notons aussi que tous les tests réalisés ont été répétés deux fois dans deux indépendantes expériences.

2.1.1. Le pouvoir réducteur (FRAP)

La méthode décrite par **Chew et *al*., (2009)** a été adoptée, avec de légères modifications, pour déterminer le pouvoir réducteur du fer de notre série de molécule. Ce test est basé sur la réduction directe du fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure (Fe^{3+} $(CN^{-})_6$) en fer ferreux (Fe^{2+}) (Fe^{2+} $(CN^{-})_6$), dans un milieu acidifié par l'acide trichloracétique et qui est déterminée par la détection spectrophotométrique du complexe $(Fe^{3+})_4[Fe^{2}+(CN-)_6]3$ ayant une forte absorption à 700nm **(Le et *al*., 2007).** Cette réaction se traduit par le virage de la couleur jaune du ferricyanure de potassium vers la couleur bleu verte avec une augmentation de l'absorbance indiquant une augmentation de la puissance réductrice de l'échantillon étudié **(Zou et *al*., 2004).**

Brièvement, 100µl de chaque composé, d'acide ascorbique choisi comme control positif à différentes concentrations (1000µg/ml à 1µg/ml) (avec des concentrations finales comprises entre 0.05 et 53.5µg/ml), ont été ajoutés à 250 µl du tampon phosphate (0.2M ; pH = 6.6), 250 µl d'une solution de ferricyanure de potassium à 1%. Le mélange a été agité ensuite incubé à 50°C pendant 20 min. Après refroidissement, 250 µl de TCA (acide trichloracétique) à 10% ont été ajouté, la dilution s'est faite avec 850µl d'eau distillée puis 170 µl de $Fe\ Cl_3$ à 0.1% ont été ajoutés. Le tout a été incubé à 28°C pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée à 700nm. L'augmentation de l'absorbance indique l'augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés, contre un blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant les molécules testées par le DMSO.

2.1.2. Le piégeage du radical cationique ($ABTS^{+\bullet}$)

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique $ABTS^{+\bullet}$ de coloration vert bleu en le transformant en ABTS incolore. Le radical préformé $ABTS^{+\bullet}$ est généré en présence des ions persulfates (**Floegel et *al*., 2011**).

$$ABTS + \text{Ions persulfates} \rightarrow ABTS^{+\bullet}$$

En présence d'un antioxydant, le passage du radical $ABTS^{+\bullet}$ à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de la coloration vert bleu intense qui peut être suivie par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 734 nm (**Chen et *al*., 1997**). Le test ABTS des molécules des dérivés étudiées a été déterminé selon la méthode de **Re et ses collaborateurs**

(1999). Le radical cationique $ABTS^{+\bullet}$ a été produit en faisant réagir une solution mère ABTS (7 mM) avec du persulfate de potassium à 2.45 mM et en laissant le mélange reposer à la température ambiante pendant 12 à 16 heures à l'obscurité, ensuite, la solution a été diluée avec de l'éthanol et équilibrée pour donner une absorbance de 0.700 ± 0.02 à 734 nm. L'activité de piégeage a été estimée en mélangeant 100 µl de notre échantillon à différente concentration (de 1000µg/ml à 1µg/ml) (avec des concentrations finales comprises entre 0.1 et 100µg/ml), avec 900 µl de solution $ABTS^{+\bullet}$ pendant 30 minutes d'incubation à température ambiante

L'acide ascorbique a été choisi comme control positif, préparé dans les mêmes conditions à différentes concentrations allant de 1000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml et 62.5µg/ml, 31.25µg/ml, 15.62µg/ml, 7.82µg/ml, 3.90µg/ml à 1.95µg/ml (avec des concentrations finales comprises entre 0.19 et 100µg/ml). Tous les essais ont été répétés deux fois dans deux expériences indépendantes. La lecture de l'absorbance est effectuée à 734 nm, contre un blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant les molécules testées par le DMSO et l'activité antioxydant a été calculée comme suit :

$$\textbf{Activité de piégeage de l'ABTS}^{+\bullet}\ \textbf{(\%)} = [1 - (A_E - A_B)] \times 100$$

$\mathbf{A_B}$: absorbance du blanc.

$\mathbf{A_E}$: absorbance de l'échantillon.

2.1.3. Le piégeage du radical (DPPH)

La capacité de piégeage des radicaux libres de nos produits a été déterminée en utilisant la méthode de DPPH°, comme elle est décrite par **Brand et *al*. (1995)**. Le principe est basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical DPPH° en 2.2diphenyl picrylhydrazine (DPPHH) **(Figure 8**), cette réduction change la couleur du DPPH° du violet vers le jaune pâle quand il réagit avec un antioxydant, ce changement de couleur se traduit par une décroissance de l'absorbance en fonction de temps. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire du produit testé.

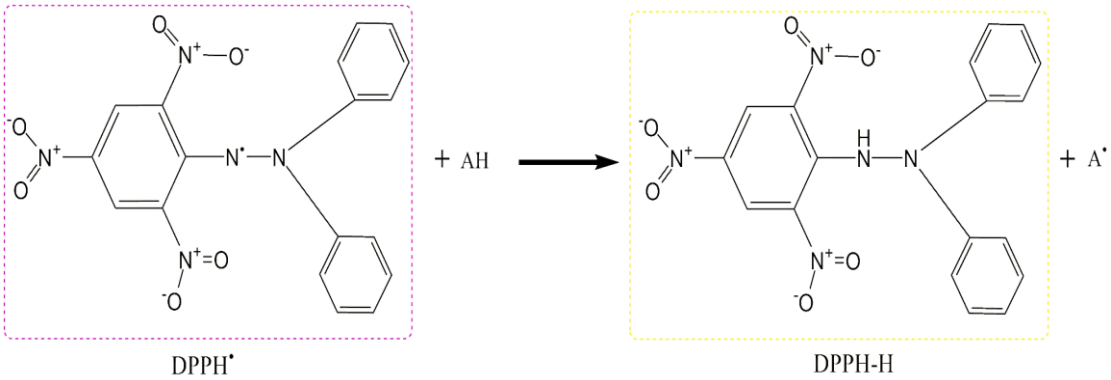


Figure 8**: Réduction du DPPH° par un antioxydant **(Talbi et al., 2015).

Brièvement, 50 µl de nos composés à différentes concentrations de 1000µg/ml à 1µg/ml, (avec des concentrations finales comprises entre 0.05 et 50µg/ml), 950 µl de la solution méthanolique de DPPH (60 µM) fraichement préparé ont été ajoutée. Après agitation, le mélange a été incubé à l'abri de la lumière pendant 30 min à température ambiante. La lecture de l'absorbance est effectuée à 515 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant les molécules testées par le DMSO.

L'activité antioxydant de l'extrait est comparée avec l'activité de l'acide ascorbique préparé dans les mêmes conditions à des concentrations de 1000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml et 62.5µg/ml, 31.25µg/ml, 15.62µg/ml, 7.82µg/ml, 3.90µg/ml, 1.95µg/ml (avec des concentrations finales comprises entre 0.095 et 50µg/ml). L'effet anti- radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres est exprimé en pourcentage selon la relation suivante :

$$\mathbf{I\% \ inhibition = [(A_B - A_E)/ A_B] \times 100}$$

Dont :

A_B : Absorbance du blanc.

A_E : Absorbance de l'échantillon.

2.2. L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* sur l'homogénat de foie des souris

2.2.1. L'entretien des animaux

L'étude a été menée sur des souris albinos *Wistar* femelles, provenant de l'institut Pasteur d'Alger, (Algérie). Les souris sont maintenues dans l'animalerie de l'Université de Jijel dans des conditions standards, une température ambiante de 22°C, une humidité relative de 60 % et à un cycle de lumière/obscurité de 12 /12 h. Les souris sont placées dans des cages en plastique. Elles ont accès libre à la nourriture et à l'eau.

2.2.2. La préparation de l'homogénat

La préparation de l'homogénat a été effectuée selon la méthode d'**Ellman (1959).** trois souris ont été sacrifiées par exposition au chloroforme dans un dessiccateur, les foies ont été immédiatement isolés et lavés par le NaCl (9%), ils sont ensuite coupés en petits morceaux et homogénéisés dans 10ml de tampon phosphate (50 mM, KCl 1,5%, pH 7,4). Le mélange a été broyé à l'aide d'un Potter manuel et centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 min. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé pour réaliser les mesures des paramètres du stress oxydant hépatique GSH et MDA.

2.2.3. L'induction du stress oxydatif

Pour l'induction du stress oxydatif nous avons utilisé deux méthodes. La première a été faite en utilisant le mélange ($FeCl_3$/ $FeSO_4$) (V/V) et le Pb à une concentration de 20 µM et 1000µg/ml respectivement. Tandis que la deuxième a été effectuée en utilisant le plomb (1mg/ml) seul comme agent prooxydant.

La première méthode consiste à ajouter 100µl des produits testés (1000µg/ml) et des produits antioxydant de référence (1000µg/ml) (quercitrine et l'acide ascorbique). Un volume de 500µl de l'homogénat a été ajouté au mélange réactionnel contenant 350µl de la solution oxydante ($FeCl_3$/ $FeSO_4$) (V/V) et 50µl du Pb (1mg/ml), le mélange est ensuite incubé au bain marie à 37°C pendant une heure.

Le contrôle positif a été préparé dans les mêmes conditions cités précédemment excepté les molécules d'intérêt, bien que le contrôle négatif a été préparé dans les mêmes conditions en absence de la solution oxydante $FeCl_3$/ $FeSO_4$, et le plomb qui ont été remplacés par un mélange contenant 350µl de l'eau distillée et 50 µl de DMSO.

Dans la deuxième méthode nous avons suivi la même procédure en remplaçant la solution oxydante ($FeCl_3$/ $FeSO_4$) par de l'eau distillée. Tous les essais ont été répétés 5 fois et les résultats sont exprimés par rapport au poids du tissue.

2.2.4. Le dosage tissulaire du Malone-dialdéhyde (MDA)

Dans notre étude, les taux du MDA tissulaire sont évalués selon la méthode d'**Okhawa et *al.*, (1979)**. Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés sous l'effet des radicaux libres au cours du stress *In vitro*. Cette peroxydation lipidique est induite par le $FeCl_3$/ $FeSO_4$ dont le principe est l'induction de la réaction de Fenton et la formation du radicale hydroxyle qui attaque les acides gras polyinsaturés. Le dosage repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100°C) entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un complexe coloré qui absorbe à 530 nm.

Pour cela. 0.5 ml du mélange préparé précédemment (avec le mélange ($FeCl_2$/ $FeSO_4$ (V/V) et le plomb), a été ajouté à 1.5 ml du milieu réactionnel contenant 5% de l'acide trichloracétique (TCA), 0.125% d'acide thiobarbiturique (TBA) et 0.52% de HCl. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 30 min. Après refroidissement, la densité optique a été mesurée à 530 nm.

Le taux du MDA est calculé en utilisant le coefficient d'extinction molaire du MDA.

$$\frac{\mathbf{AE \times 10^6 \times} \boldsymbol{Vt}}{\mathbf{1.56 \times 10^5 \times} \boldsymbol{Vt}}$$

Dont:

AE: Absorbance de l'échantillon.

Vt: Volume totale.

$\mathbf{1.56 \times 10^5}$ **:** Le coefficient d'extinction molaire du MDA.

2.2.5. Le dosage tissulaire du glutathion (GSH)

Le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode d'**Ellman (1959).** Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5.5'-dithio-bis-2-nitrobenzoique (réatif d'Ellman, DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour ce dosage, 500 µl de l'homogénat préparé précédemment, comme a été décrit dans la section (**2.6)**, a été dilué dans 500µl du tampon phosphate (50 mM, pH8). Ensuite 25 µl de DTNB (200µM) ont été ajouté. Après 15 min d'incubation, la lecture de la densité optique a été effectuée à 412nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le tampon phosphate.

Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon du glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations sont exprimés en micromoles du glutathion par gramme de tissue (**Annexe 1**).

3. Les analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyennes et barre d'erreur (M±SEM). Les valeurs EC_{50} et IC_{50} ont été calculées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 7®. Les résultats sont ajustés à une équation logistique de 5 paramètres :

- LogXb = $LogEC_{50}$ + (1/HillSlope)*Log((2^(1/S))-1)
- Denominator = (1+10^((LogXb-X)*HillSlope))^S
- Numerator = Top - Bottom
- Y = Bottom + (Numerator/Denominator)

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7®. La normalité des données a été vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnov. Dans tous les cas, les données sont normalement distribuées ce qui a permis leur comparaison en utilisant un test paramétrique ANOVA à un seul facteur suivi par le test de comparaison multiple post hoc de Tukey. Le niveau de signification a été fixé à $p < 0,05$.

Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ROS). L'accumulation de ces molécules dans l'organisme aboutit à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques **(Durackova, 2008)**. Pour cela l'organisme utilise les antioxydants pour réduire les ROS, mais, sous certaines conditions, ces systèmes antioxydants ne peuvent pas fonctionner efficacement et nécessite donc une supplémentation en antioxydants exogènes naturels et synthétique, pour équilibrer la balance entre les ROS et les antioxydants et donc essentielle pour prévenir l'apparition des différentes pathologies liées aux stress oxydant.

Les dihydropyrimidinones présentent une activité antioxydante importante selon **Stefani et *al*., (2006).** Ceci due à leur structure chimique qui leur confère la capacité de donner des ions d'hydrogènes pouvant attaquer les radicaux libres en empêchant les réactions d'oxydation dans la cellule. De ce fait, elle inhibe la formation des radicaux libres et réduit le stress oxydatif (**Mansouri et *al*., 2012**).

C'est dans ce contexte qu'on a mis en évidence l'évaluation de l'activité antioxydante de 10 molécules dérivent de 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones portant des groupements urée, thiourée et sulfonylurée par l'utilisation des méthodes suivantes : réduction de fer (FRAP), test de Piégeage du radical libre DPPH$^{\bullet}$ et le test de piégeage du radical-cation ABTS. Ces trois testes sont largement utilisés dans l'évaluation de la capacité antioxydante des produits naturelles **(Bougatef et *al*., 2009 ; Bouchouka, 2016 ; Annapandian et Rajagopal, 2017)** et des substances de synthèse (**McCarthy et *al*., 2001 ; Carocho et *al*., 2013 ; Chew et *al*., 2016**).

1. L'effet anti-radicalaire contre le radical libre DPPH°

L'activité anti-radicalaire est très importante de fait du rôle délétère des radicaux libres dans les systèmes biologiques. La méthode du radical DPPH° est employée pour le criblage des molécules douées d'activité antioxydante. Elle est souvent utilisée à cause de sa simplicité, sa grande sensibilité, sa rapidité, ainsi que sa bonne reproductibilité (**Gulçin et *al*., 2010).**

La **figure 9** montre les variations de l'effet Scavenger de nos échantillons et de l'acide ascorbique à différentes concentrations contre le radical libre DPPH°.

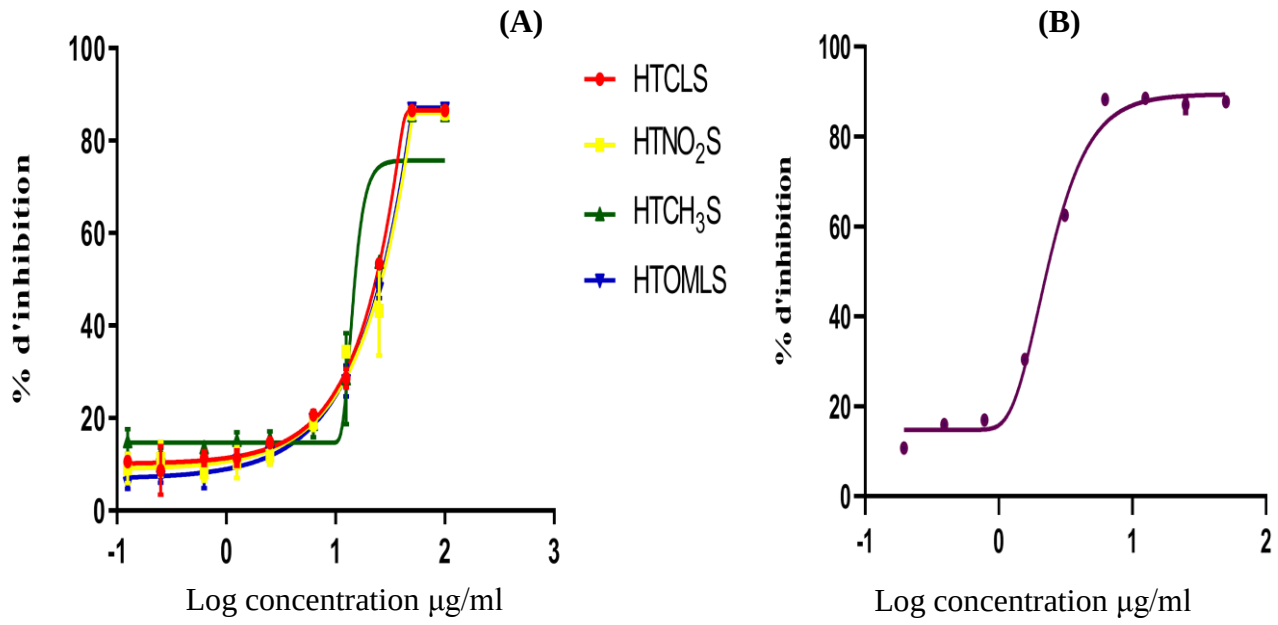


***Figure 9**. L'effet* Scavenger *des différentes concentrations des échantillons, envers le radical* DPPH$^{\bullet}$. ***(A):** Les produits testés.* ***(B):** L'acide ascorbique*

Les résultats obtenus montrent que les composés HTOML, 114, HTCl, $HTCH_3$, $HTNO_2$, portant des groupements urée et 38 portant un groupement sulfonyl-urée présentent un effet antioxydant, mais relativement faible, par rapport à celui de l'acide ascorbique seulement les substances portant des groupements thio-urée ($HTCH_3S$, HTOMLS, $HTNO_2S$ et HTCLS) présentent une activité antiradicalaire concentration-dépendante assez importante. Un effet antiradicalaire maximal de 87.11%, 86.54%, de 86.08% et 85.48% est exercé par les molécules HTOMLS, HTCLS, $HTNO_2S$ et $HTCH_3S$ respectivement à des concentrations de 50µg/ml. L'acide ascorbique, utilisé comme antioxydant standard a montré un effet maximal de 89.41% à une concentration de 15.62µg/ml.

Nous avons déterminés pour chaque échantillon, la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical libre DPPH$^{\bullet}$ ou IC_{50} en utilisant le logiciel GraphPad Prism7®. Les produits ayant présenté une IC_{50} > 50µg/ml sont considérés comme inactifs. Plus la valeur d'IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (**Hebi et Eddouks, 2016**). Les valeurs obtenues sont représentées dans la **figure 10**.

En comparant les IC_{50} de quatre composés actifs à celle de l'acide ascorbique, nous remarquons que l'activité anti-radicalaire de nos molécules d'intérêt est inférieure à celle de l'acide ascorbique. Les IC_{50} sont de l'ordre de 16.09 µg/ml, 22.51 µg/ml, 23.87 µg/ml et 24.78 µg/ml pour l'$HTCH_3S$, l'HTCLS, l'HTOMLS, et l'$HTNO_2S$ respectivement, contre 2.393 µg/ml obtenu avec l'acide ascorbique. Il est claire que $HTNO_2S$ est doté d'un pouvoir de piégeage des radicaux DPPH$^{\bullet}$ modéré avec une valeur moyenne d'IC_{50} (24.78 ± 1.05µg/ml), tandis que le composé HTClS présente l'effet scavenger le plus puissant du radical DPPH$^{\bullet}$ (IC_{50} = 22.5 ± 0.08µg/ml), une activité

qui reste toujours, significativement très inférieure à celles de standard : l'acide ascorbique (IC_{50} = 2.393 ± 0.014 µg/ml) (**figue 10**).

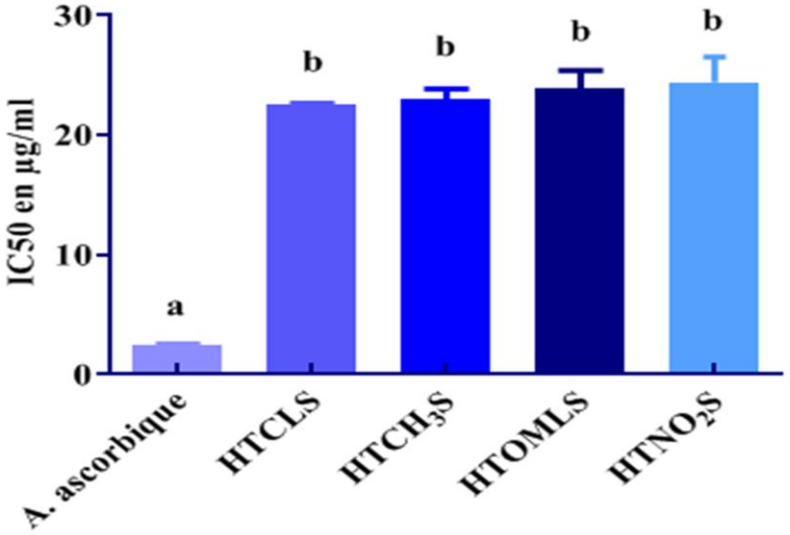


Figure 10. L'*activité antiradicalaire de molécules étudiés et de l'acide ascorbique envers le radical* DPPH•. *Les résultats sont exprimés en moyennes et barre d'erreur (M±SEM) ; les différences significatives entre les différents composés sont indiquées par des lettres minuscules*. ($p < 0.05$) (ANOVA à un seul facteur suivi par le test de comparaison multiple post hoc de Tukey).

Nos résultats suggèrent que ces composés contiennent des groupes fonctionnels piégeurs des radicaux libres responsables du pouvoir antioxydant primaire, réduisant et décolorant le radical DPPH. De nombreuses études ont démontré que les dérivés de DHPM présentent des effets antioxydants dans le test de DPPH (**Stefani et *al.*, 2006 ; Padmavathi et *al.*, 2007 ; George et *al.*, 2008**). L'action des molécules actives pourrait être due à l'existence de la fonction thione (C=S) de la thiourée qui peut se transformer en la forme thiol (-SH), grâce à l'équilibre tautomérique thione-thiol. Cette activité peut s'exercer soit par un transfert d'électron soit par un transfert d'hydrogène avec le radical DPPH°.

Il est important de signaler que le composé HTCLS qui porte un groupe chloro sur le phényle liée à la fonction thio-urée présente la capacité de piégeage du radical DPPH la plus élevée. Cela montre qu'il y a une relation entre la présence de groupe chlorophenyl et l'activité antioxydante. Des résultats similaires ont décrits par **Attri et *al.* (2017)**, qui ont démontré que des DHPMs ayant un groupement chlorophényle présentent l'activité anti-radicalaire la plus importante, de ce fait l'effet anti-radicalaire n'est pas seulement concentration-dépendant mais également structure-dépendant **(Rodriguez-Bernaldo et *al.*, 2010).**

2. La détermination du pouvoir réducteur (FRAP)

La méthode de FRAP, est une technique facile, rapide et reproductible (**Le et *al.*, 2007**). Le pouvoir réducteur est la capacité d'un extrait à donner un électron et à réduire le fer. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme indicateur significatif de son pouvoir antioxydant (**Tepe et *al.*, 2005**). Les résultats de pouvoir réducteurs de nos échantillons et de l'acide ascorbique à différente concentrations, sont représentés dans la **figure11.**

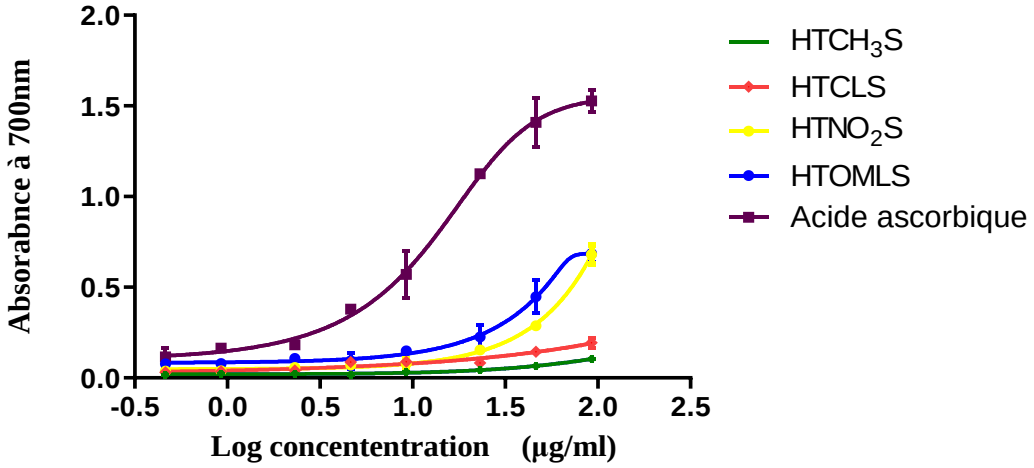


Figure 11. *Le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique et de nos molécules à différentes concentration.*

Comme pour le test de DPPH, notre étude montre que les composés HTOML, 114, HTCl, $HTCH_3$, $HTNO_2$, portant des fonctions urée et 38 portant une fonction sulfonyl-urée présentent une très faible capacité de réduction du fer. Seulement les composés portant des fonctions thio-urée à savoir $HTCH_3S$, HTCLS, $HTNO_2S$ et HTOMLS, ont pu réduire le fer d'une manière concentration-dépendante, mais pas assez élevée pour calculer les EC_{50} avec des absorbance maximales de l'ordre de 0.348 ± 0.025, de 0.33 ± 0.017, de 0.681 ± 0.024 et de 0.685 ± 0.023 contre 1.528 ± 0.03 pour l'acide ascorbique**.** Parmi ces composés, HTOMLS portant le groupement méthoxyphenyl et $HTNO_2S$ portant le groupement nitrophényl présentent les capacités à réduire le fer le plus importantes mais restent toujours inférieur à celle de la substance de référence (l'acide ascorbique).

Kumarappan et *al.*, (2012), ont signalé que les donneurs d'électrons pourraient réagir avec les radicaux libres pour les transformer en produits plus stables et arrêter les chaines des réactions radicalaires, c'est ce qu'on appelle pouvoir réducteur. Le rôle antioxydant de l'acide ascorbique découle de ses propriétés réductrices, c'est le plus puissant des antioxydants hydrosolubles (**Sekli-Belaidi, 2011**), porte plusieurs groupements hydroxyle, **Galato et *al.*, (2001)** ont démontré que l'activité anti-oxydante d'une molécule augmente avec l'augmentation des nombres de groupements hydroxyles y attachés (**Sroka et Cisowski, 2003 ; Palafox-Carlos et *al.*, 2012**). Les résultats

obtenus suggèrent que les molécules testées n'ont pas une capacité considérable de réduire le Fe^{+3} en Fe^{+2}, ceci peut être expliqué par le fait que le cycle DHPM responsable de l'activité réductrice est difficile à être oxydé, D'après la littérature le cycle DHPM s'oxyde par des oxydants très fort notamment le Ca (OCl_2) (**Tamaddon et *al*., 2011**).

3. Test de piégeage du radical-cation $ABTS^{\bullet+}$

Le test 2,20-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic (ABTS) est considéré comme le teste antioxydant le plus connu ces dernières années. C'est un test facile reproductible est très largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des produits naturelles et des substances de synthèse (**Floegel et *al*., 2011**).

La **figure 12** illustre le pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^{\bullet+}$ de différents composés et de l'acide ascorbique.

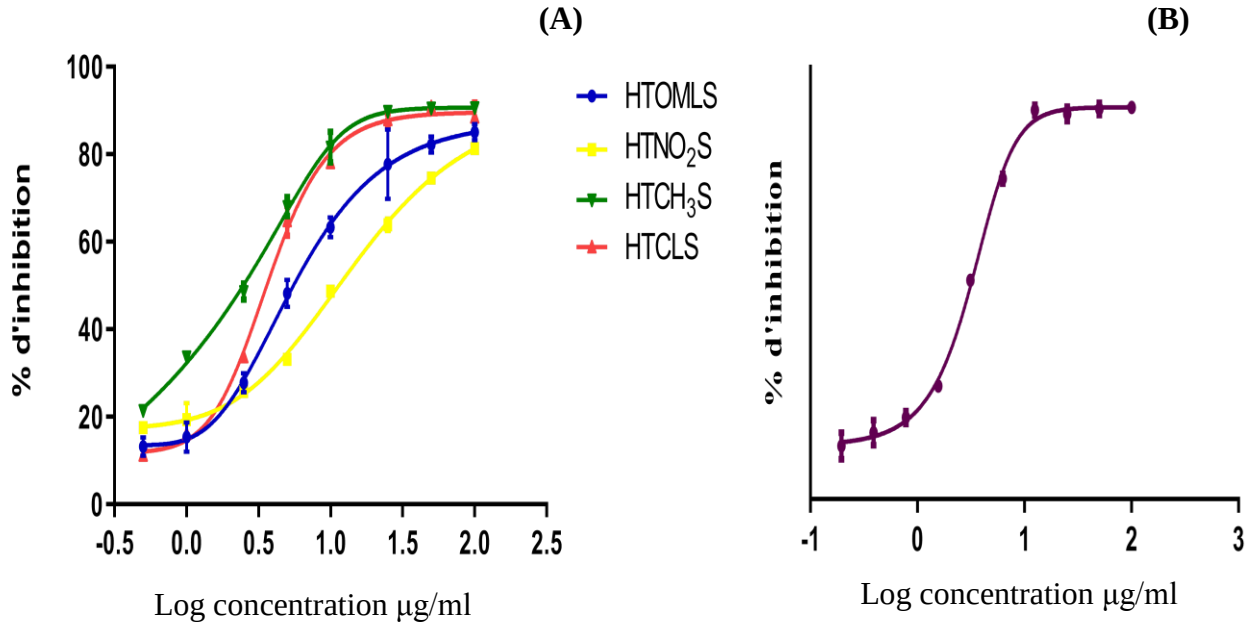


***Figure 12**. L'effet piégeur des différentes concentrations des échantillons envers le radical* $ABTS^{\bullet+}$. ***(A):** Produits testés. **(B):** L'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne de 2 essais indépendants.*

Comme pour les autres deux tests, les résultats obtenus mettent en évidence une très faible activité des composés HTOML, 114, HTCl, $HTCH_3$, $HTNO_2$, NO_2 CH_3 portant des fonctions urée et 38 portant une fonction sulfonyl-urée. Seulement les substances ($HTCH_3S$, HTOMLS, $HTNO_2S$ et HTCLS), portant des fonctions thio-urée, présentent une activité antiradicalaire concentration-dépendante très importante. Un effet antiradicalaire maximal de 91.16% et de 90.67% est exercé par les molécules $HTNO_2S$ et $HTCH_3S$ respectivement, à des concentrations de 25 µg/ml et 10 µg/ml , suivi par 87.45% et 89.61% pour les molécules HTOMLS et HTCLS, à une concentration de 100

µg/ml. L'acide ascorbique, utilisé comme antioxydant de référence a montré un effet maximal de 90.72% à une concentration de 15.62µg/ml, envers le radical-cation $ABTS^{\bullet+}$.

La concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical $ABTS^{\bullet+}$ est représentée dans la **figure 13.**

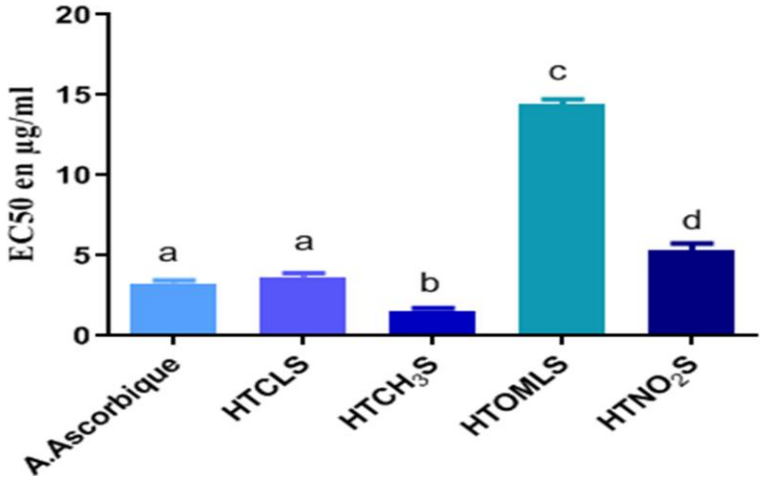


***Figure 13**. L'activité antiradicalaire de nos molécules et de l'acide ascorbique envers le radical $ABTS^{\bullet+}$. Les résultats sont exprimés en moyennes et barre d'erreur (M±SEM) ; les différences significatives entre les différents composés sont indiquées par des lettres minuscules. (p<0.05)* (ANOVA à un seul facteur suivi par le test de comparaison multiple post hoc de Tukey).

Les valeurs des IC_{50} observées durant notre étude suivent le gradient :

IC_{50} $HTCH_3S$> IC_{50} acide ascorbique> IC_{50} HTCLS> IC_{50} $HTNO_2S$ > IC_{50} HTOMLS.

Le composé $HTCH_3S$ présente la meilleure activité antioxydante de tous les produits testés y compris la substance de référence (acide ascorbique) avec une valeur moyenne d'IC_{50} de l'ordre de 1.56 ± 0.07 µg/ml. Suivi par l'acide ascorbique et le composé HTCLS qui présentent une activité antioxydante plus ou moins similaire avec des valeurs d'EC_{50} de l'ordre de (3,28±0,078 µg/ml et 3.68±0. 11µg/ml) respectivement. Quant aux deux autres produits $HTNO_2S$ et HTOMLS. Ils ont des activités plus faibles par rapport à l'acide ascorbique avec des IC_{50} de l'ordre de 5.626 ±0.21µg/ml et 14.14 ±0.14 µg/ml, respectivement. Le produit HTOMLS a montré l'activité antioxydante la plus faible.

L'importante capacité de piégeage du radical ABTS observée chez le composé $HTCH_3S$ qui est même meilleure que la substance de référence (l'acide ascorbique) est attribuée à la présence du groupement alkyle. Ce dernier joue un rôle non négligeable dans l'amélioration de l'effet antioxydant des drivées des DHMPs portant de fonctions thio-urée.

Le composé HTCLS ayant présenté le meilleur effet antiradicalaire avec le test de DPPH, a présenté également une bonne activité avec le test d'ABTS qui est comparable à celle de l'acide

ascorbique, ceci confirme la contribution du groupement chlorophenyl à l'amélioration de piégeage des radicaux libres.

Dans ce test, les composés étudiés ont présenté un effet bien remarquable en raison de leur capacité à céder l'hydrogène, cette capacité est due à la présence d'une fonction thio-urée, un groupe donneur d'hydrogéne.

4. Le stress oxydatif et le Plomb

Dans l'étiologie, le Pb est considéré toujours comme un facteur majeur déclenchant le stress oxydatif (**Patrick, 2006**). Non seulement grâce à sa capacité à perdre des électrons mais également grâce à son interaction avec les antioxydants enzymatique et non enzymatique (**Habila, 2017**), prenant en compte la composition du système antioxydant enzymatique et non enzymatique riche en métalloprotéines portant des groupes SH ; impliquées dans la détoxification de l'$O_2^{\cdot\cdot}$ et de l'H_2O_2, et la grande affinité du plomb pour ce groupe. Le plomb peut interagir avec les sites actifs des enzymes et réduire leur capacité antioxydante (**Gurer-Orhan et *al*., 2004)** . Ce qui est en accord avec plusieurs études qui ont montré une perturbation importante de la capacité antioxydante chez les organismes exposées au plomb *in vitro* et i*n vivo* (**Berrahal et *al*., 2007** ; **Upadhyay et *al*., 2009 ; Belli et *al*., 2010 ; Virgolini et *al*., 2019).** Dans cette partie, on s'est intéressés d'une part à l'évaluation des paramètres de stress oxydatif hépatique, tels que les taux du MDA et du GSH, dans les homogénats de foies des souris exposés au plomb, et d'autre part à évaluer l'effet protecteur des deux molécules jugées plus actifs par les tests antioxydant DPPH, ABTS et FRAP.

4.1. La peroxydation lipidique (MDA)

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle OH° capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires (**Ittiyavirah et Paul, 2016**). Le dimaloaldehyde malonique (MDA) est sans doute le marqueur le plus connu et le plus utilisé (**Milane, 2004**). Les variations des taux du MDA hépatique en présence du Pb seul et en présence du Pb avec la solution oxydante $FeCl_3$/ $FeSO_4$ sont illustrées dans la **figure 14** et **figure 15.**

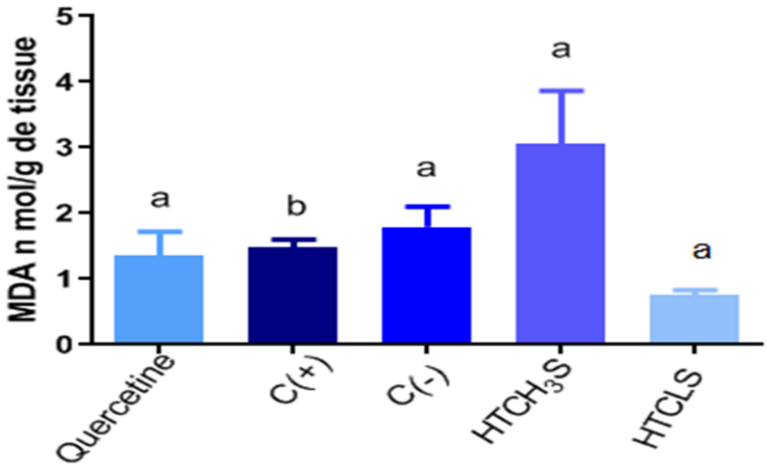


Figure 14. *La variation de taux du MDA hépatique en nmol/g de tissu en présence de Pb seul. Les résultats sont exprimés en moyennes et barre d'erreur (M±SEM) ; les différences Significatives entre les différents groupes sont indiquées par des lettres minuscules.* (p <0.05) (ANOVA à un seul facteur suivi par le test de comparaison multiple post hoc de Tukey).

On constate une augmentation hautement significative du taux de MDA chez le control positif (recevant le Pb à une concentration de 50µg/ml) et en comparant au control négatif, l'ajout des composés HTCLS, $HTCH_3S$ et de la substance de référence (la quercetine) a entrainé une diminution hautement significative de taux de MDA jusqu'à un taux similaire à celui du control négatif **figure 15**.

- **En présence du $FeCl_2$/ $FeSO_4$ et du plomb**

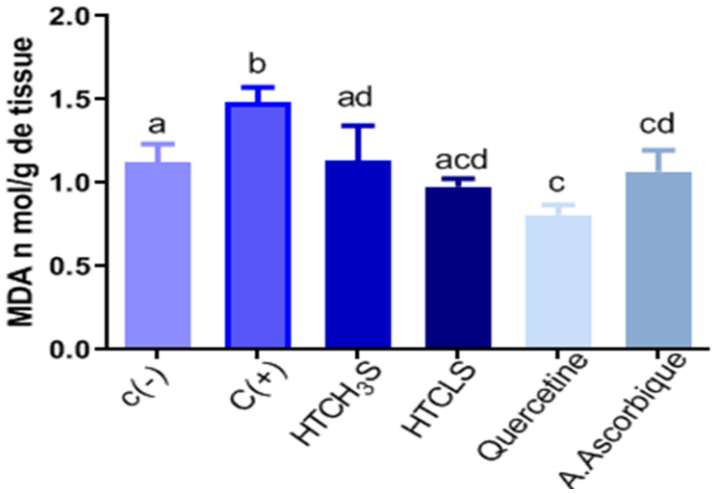


Figure 15. *La variation de taux du MDA hépatique en nmol/g de tissu en présence de Pb et de la solution oxydante* $FeCl_3$/ $FeSO_4$. *Les résultats sont exprimés en moyennes et barre d'erreur (M±SEM) ; les différences significatives entre les différents groupes sont indiquées par des lettres minuscules* (p <0,05). (ANOVA à un seul facteur suivi par le test de comparaison multiple post hoc de Tukey).

Le taux de MDA est estimé par 1.12 nmol/g chez le control négatif, ce taux a significativement augmenté chez les foies exposés au mélange ($FeCl_3$/ $FeSO_4$ et plomb) en atteignant une valeur de 1.48 nmol/g. L'ajout des produits testés et des substances de références a significativement réduit le taux du MDA à des taux plus ou moins similaires au control négatif (1.48 nmol/g) pour les produits $HTCH_3$ (1.13 nmol/g), HTCLS (0.97 nmol/g), et l'acide ascorbique (1.06 nmol/g), et à un taux significativement inférieur pour la quercitrine (0.80 nmol/g).

D'une manière générale notre étude a montré une augmentation significative du taux de MDA au niveau des tissues de foies exposés à la solution oxydante ($FeCl_3$/$FeSO_4$ / Pb) et ceux exposé au plomb seul. Ce qui est en accord avec plusieurs études montrant une forte augmentation du taux de MDA in *vitro* et in *vivo* chez les organismes exposés à ces métaux **(Sandhir et Gill, 1995 ; Lettéron et *al*., 1996 ; Wilson et *al*., 2002 ; Ibrahim, 2004 ; Sivaprasad et *al*., 2004).**

L'ajout des molécules $HTCH_3S$ portant le groupe alkyl et HTCLS portant le groupe Chloro-phényl a significativement réduit le taux de MDA jusqu'à des niveaux comparables au control négatif et aux substances de référence, ce qui confirme leur capacité antioxydante obtenue avec les tests ABTS et DPPH. Une chose importante à signaler ici, c'est que malgré leur faible capacité de réduire le fer, les molécules $HTCH_3S$ et HTCLS ont présenté une bonne activité vis-à-vis la peroxydation lipidique même chez les tissues exposés à la solution ($FeCl_3$/$FeSO_4$/ Pb). Cela montre que nos molécules n'interviennent pas par réduction de fer, mais en piégeant les radicaux libres responsables de la peroxydation lipidique tels que le radical $OH^{\bullet}$**.**

4.2. Le dosage tissulaire du glutathion (GSH)

La cellule dispose pour sa protection au glutathion, thiol intracellulaire vital qui constitue un acteur essentiel de la défense antioxydante cellulaire en se liant par son pôle SH aux métabolites toxiques. Il joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydantes telle que la Gpx et la GST (**Kebsa, 2006**). Le GSH est la première ligne des mécanismes de défense cellulaire contre les dommages oxydatifs (**El-Missiry et *al*., 2001**).

- **En présence du plomb seul**

Les variations des taux du GSH hépatiques en présence de plomb seul sont présentées dans la **figure 16**.

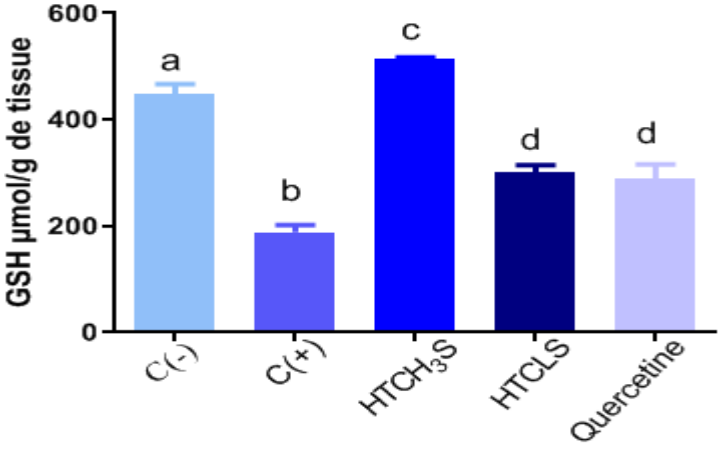


Figure 16. *La variation des taux du GSH hépatique en µmol/g de tissu en présence de Pb seul. Les résultats sont exprimés en moyennes et barre d'erreur (M±SEM) ; les différences significatives entre les différents groupes sont indiquées par des lettres minuscules.* (p <0.05). (ANOVA à un seul facteur suivi par le test de comparaison multiple post hoc de Tukey).

Le taux de GSH obtenu chez le control négatif est de l'ordre de 448.33 µmol/g. Ce dernier est significativement réduit chez le control positif recevant une concentration de 50µg/ml du plomb. L'addition des composés $HTCH_3S$, HTCLS et la quercetine a significativement amélioré le taux de GSH en atteignant un taux plus élevé que celui observé chez le control négatif chez les tissues recevant le composé $HTCH_3S$ (514.94 µmol/g) et un taux plus faible que le control négatif chez les tissus recevant le produit HTCLS (300.55 µmol/g) et la molécule de référence (quercitrine) (289.66 µmol/g).

- **En présence du $FeCl_3$/ $FeSO_4$ et du plomb**

Les variations des taux du GSH hépatiques en présence du $FeCl_3$/ $FeSO_4$ et du plomb sont présentées dans la **figure 17**.

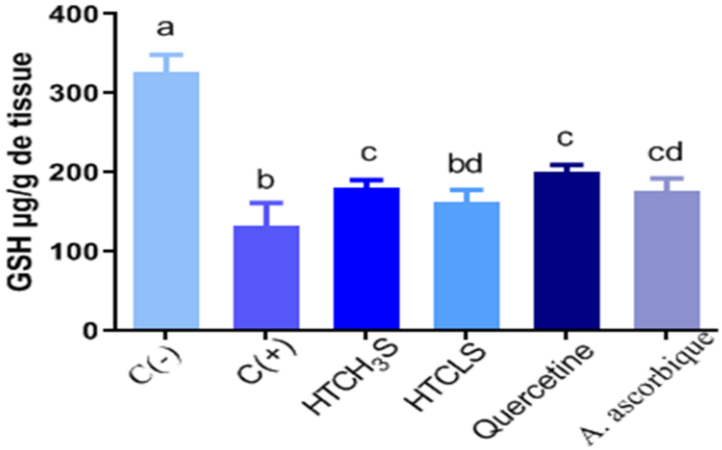


Figure 17. *La variation des taux du GSH hépatique en µmol/g de tissu en présence du Pb et de la solution oxydante $FeCl_3$/ $FeSO_4$. Les résultats sont exprimés en barre d'erreur (M±SEM) ; les différences significatives entre les différents groupes sont indiquées par des lettres minuscules. (p <0.05). (ANOVA à un seul facteur suivi par le test de comparaison multiple post hoc de Tukey).*

Le taux de GSH obtenu chez le control négatif est de l'ordre de 326.69 µ*mol/g*. Ce dernier est significativement réduit chez le control positif recevant une concentration de mélange ($FeCl_3$/ $FeSO_4$/Pb). L'ajout des composés $HTCH_3S$, la quercetine et l'acide ascorbique a significativement amélioré le profil de GSH mais à des taux significativement faibles par rapport au control négatif, les valeurs sont respectivement 180.97 µ*mol/g*, 200.83 µ*mol/g* et 176.99 µ*mol/g*. Cependant l'ajout du produit HTCLS n'a pas amélioré le taux de GSH (162.48µ *mol/g)* (les valeurs sont proches à celles observées chez le control positif 132.98 µ*mol/g)*

D'une manière générale l'exposition *in vitro* des homogénat des foies des souris au mélange ($FeCl_3$/ $FeSO_4$/Pb) et au plomb seul a considérablement réduit le taux de GSH ce qui est en accord aux étude antérieur qui ont démontré une réduction importante du taux GSH après l'exposition au métaux lourds y compris le plomb et le fer (**Wilson et *al*., 2002 ; Hunaiti et Soud, 2000 ; Liu et *al*., 2011).**

L'ajout de nos produits a significativement amélioré le taux de GSH mais d'une façon plus importante pour les homogénats du foie exposés au plomb seul, par rapport à ceux exposés au mélange. ($FeCl_3$/ $FeSO_4$/Pb). Tenant en compte ces résultats et l'incapacité de nos produits à réduire le fer, on peut donc supposer qu'ils agissent par chélation du plomb, ce qui n'est pas inattendu vu la composition chimique de nos produits qui portent des groupements thiols ayant une grande affinité vers le plomb **(Berrahal et *al*., 2007 ; Saka et *al*., 2011 ; Sangvanich et *al*., 2014).** Il est important de signaler que le composé $HTCH_3S$ portant le groupe alkyl a amélioré le taux du GSH d'une façon très remarquable qui est même supérieure à celle de la substance de référence la quercetine. Ce qui confirme le résultat obtenu avec le radical ABTS où le composé $HTCH_3S$ a exhibé une activité nettement supérieure à celle de la substance de référence (acide ascorbique).

Radicaux libres, 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 nécessaires. Ce terme est fréquemment employé dans un certain nombre de situations biochimiques, physiologiques et pathophysiologiques.

Dans la première partie de notre travail, nous nous sommes intéressés principalement à l'évaluation du pouvoir antioxydant in *vitro* de quelques composés dérivent de 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones portant des fonctions urée, thiourée ou sulfonylurée par l'utilisation des méthodes largement utilisés notamment le test de réduction de fer (FRAP), test de Piégeage du radical libre DPPH et test de piégeage du radical-cation ABTS.

Les résultats qui ont été obtenus au cours de ce travail ont montré que les composés HTOML, 114, HTCl, $HTCH_3$, $HTNO_2$, NO_2 CH_3 portant des groupements urée et 38 portant un groupement sulfonyl-urée sont très faiblement actifs -et seulement composés portant des fonctions thio-urée(tels que le produits $HTCH_3S$, HTOMLS, $HTNO_2S$ et HTCLS) présentent une activité antioxydante assez importante.

Les résultats du test FRAP ont montré que, les composés HTOMLS portant le groupement méthoxyphenyl et $HTNO_2S$ portant le groupement nitrophenyl présentent les capacités à réduire le fer les plus importantes, mais qui restent toujours inférieures à celle de la substance de référence (l'acide ascorbique).

Les résultats du test DPPH ont montré que, les composés étudiés ont des capacités à piéger le radical DPPH plus ou moins similaires mais significativement inférieures à la substance de référence. Le composé HTClS présente l'effet scavenger le plus puissant du radical $DPPH^{\bullet}$ (IC_{50} = 22.5 ± 0.08µg/ml), une activité qui reste toujours modéré par comparaison à celles de standard : l'acide ascorbique (IC_{50} = 2.393 ± 0.014 µg/ml).

Les résultats du test ABTS ont montré que, les composés $HTCH_3S$, HTOMLS, $HTNO_2S$ et HTCLS, portant des fonctions thio-urée, ont une activité antiradicalaire concentration-dépendante très importante. Dont le composé $HTCH_3S$ a présenté la meilleure activité antioxydante (IC_{50}= 1.56 ± 0.07 µg/ml) par comparaison à tous les produits testés y compris la substance de référence (3,28±0,078 µg/ml).

La deuxième partie de notre travail s'est focalisée sur la détermination de l'effet antioxydant des deux molécules jugées plus actifs ($HTCH_3S$ et HTCLS) par les tests DPPH et ABTS. dans les homogénats des foies des souris de type albinos *Wistar* exposés au plomb *in vitro*. Les paramètres mesurées sont les taux du MDA et du GSH. Les résultats obtenus ont montré que les deux

molécules ; $HTCH_3S$ (portant le groupe alkyl) et HTCLS ‘portant le groupe Chloro-phényl) ont significativement réduit le taux de MDA et amélioré le temps de GSH jusqu’à des niveaux comparables voir meilleurs (dans le cas de GSH avec le composé HTCH3S) au control négatif et aux substances de référence.

D’une manière générale, les résultats expérimentaux de notre étude montrent que les dérivés de de 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones portant des fonctions thiourée représentent un réservoir d’antioxydants susceptibles d’être utilisés dans la lutte contre les radicaux. Le présent travail détaille le large spectre de l'activité antioxydante par rapport aux substances de références. Il sera utile d'étudier l'effet de ces composés sur d'autres activités biologiques telles que l’activité antitumorale, anti-VIH, antihypertenseurs, etc. qui peuvent élargir l'utilité thérapeutique de ces composés synthétisés dans le cadre d'une étude future. Mais également la poursuite des applications biologiques *in vivo* pour valoriser leur toxicité et leur éventuelle utilisation dans le domaine de la pharmacologie.

A

- **Adriano, D. C**. (2001) Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals. 2nd,. Springer- Verlag. New York
- **Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A.** (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, *74*(7), 636-643.
- **Ahmad, S., Iftikhar, F., Ullah, F., Sadiq, A., & Rashid, U.** (2016). Rational design and synthesis of dihydropyrimidine based dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic chemistry*, *69*, 91-101.
- **Akhaja, T. N., & Raval, J. P.** (2011). 1, 3-Dihydro-2H-indol-2-ones derivatives: Design, synthesis, in vitro antibacterial, antifungal and antitubercular study. *European journal of medicinal chemistry*, *46*(11), 5573-5579.
- **Alexandrova, M. L & Bochev PG.** (2007). Oxidative Stress in Stroke. **In:** Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. **1st ed**. *Elsevier BV.* (Amesterdam), 313-368.
- **Amara, R.** (2011). Impact de la pollution sur les écosystèmes côtiers: exemple de la Manche orientale. *VertigO-la revue électronique en sciences de l'environnement*, (Hors-série 9).
- **Anastas, P. T., & Warner, J. C.** (1998). Principles of green chemistry. *Green chemistry: Theory and practice*, 29-56.
- **Ansari, K. N.** (1997) The free radicals-the hidden culprits-an update. *Indian Journal of Medical Sciences*. 51: 319-336.
- **Ardestani, A., Yazdanparast, R. (**2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina extracts. Food Chem.* 104: 21-29.
- **Armstrong, D., & Stratton, R.** (2016). Oxidative stress and antioxidant protection. *John Willy and Sons*.
- **Arockia Vasanthi, L., Revathi, P., Mini, J., & Munuswamy, N.** (2013). Integrated use of histological and ultrastructural biomarkers in Mugil cephalus for assessing heavy metal pollution inEnnore estuary, Chennai. *Chemosphere*, *91*(8), 1156‑ 1164.
- **Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K.** (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—a concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *24*(5), 547-553.
- **Assis de Silva, H. C., & Mela, M.** (2014). Fish Neurotoxic Pollutants. In E. A. de Almeida & C. A. de O. Ribeiro (Éd.), *Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems* (CRC Press, p. 51‑ 83).

- **Attri, P., Bhatia, R., Gaur, J., Arora, B., Gupta, A., Kumar, N., & Choi, E. H.** (2017). Triethylammonium acetate ionic liquid assisted one-pot synthesis of dihydropyrimidinones and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Arabian Journal of Chemistry*, *10*(2), 206-214.
- **Awad, L., Huel, G., Lazar, P., & BOudenec, C.** (1981). "Facteurs de variation interindividuelle de la plombémie". *Rev Epidem et Santé Publ*, 29 : 113-124.

B

- **Bahekar, S. S., & Shinde, D. B.** (2004). Synthesis and anti-inflammatory activity of some [4, 6-(4-substituted aryl)-2-thioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydro-pyrimidin-5-yl]-acetic acid derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *14*(7), 1733-1736.
- **Bánfalvi, G.** (2011). Heavy metals, trace elements and their cellular effects. *Cellular Effects of Heavy Metals*.
- **Barbosa, F. A., Canto, R. F., Saba, S., Rafique, J., & Braga, A. L.** (2016). Synthesis and evaluation of dihydropyrimidinone-derived selenoesters as multi-targeted directed compounds against Alzheimer's disease. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *24*(22), 5762-5770.
- **Beena, K. P., Rajasekaran, A., Manna, P. K., & Suresh, R.** (2017). design, synthesis, characterisation and invitro antioxidant evaluation of some substituted dihydropyrimidinone derivatives.
- **Bektaş, N., Ağim, B.A., & Kara, S.** (2004). Kinetic and equilibrium studies in removing lead ions from aqueous solutions by natural sepiolite. *Journal of Hazardous Materials*, *112*(1- 2), 115- 122.
- **Belli, N., Mesbah, L., Chebab, S., Tekouk, M., & Leghouchi, E. (**2010). Stress oxydant induit par la coexposition au plomb et au cadmium: deux contaminants des eaux souterraines de Oued Nil (Jijel-Algérie). *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, *23*(3), 289-301.
- **Bennett, W. M.** (1985). Lead nephropathy. *Kidney international*, *28*(2), 212-220.
- **Berrahal, A. A., Nehdi, A., Hajjaji, N., Gharbi, N., & El-Fazâa, S.** (2007). Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Comptes rendus biologies*, *330*(8), 581-588.
- **Bhat, A. H., Dar, K. B., Anees, S., Zargar, M. A., Masood, A., Sofi, M. A., & Ganie, S. A.** (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *74*, 101-110.
- **Biginelli, P., & Gazz, P.** (1893). Synthesis of 3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-ones. *Gazz. Chem. Ital*, *23*, 360-372.

- **Biparva, P., Ehsani, M., & Hadjmohammadi, M. R.** (2012). Dispersive liquid–liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. *Journal of Food Composition & Analysis*, **27**, 87–94.
- **Boelsterli, U. A.** (2007). *Mechanistic toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets*. CRC Press.12.
- **Borges, L., H.A. Stefani, C.B. Oliveira, R.B. Almeida, C.M.P. Pereira, R.C. Braga, R. Cella, V.C. Savegnago, C.W.** (2006). Nogueira, Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents, Eur J Med Chem, 41: 513-518.
- **Bouchouka, E**. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. Thèse de doctorat. Universite Badji Mokhtar Annaba.
- **Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M.** (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (Mustelus mustelus) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food chemistry*, *114*(4), 1198-1205.
- **Burton, G., & Jauniaux, E.** (2011). Oxidative stress. *Best practice and research clinical obstetrics and gynaecology*. 25: 287-299.

C

- **Carocho, M., & Ferreira, I. C.** (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, *51*, 15-25.
- **Certin, J. F., fayol, M., fauquet, A., Héry, M., langlois, E., & vincent, R**. (2007). Résultats de la campagne de contrôle 2006 “Inspection du travail-prévention des risques professionnels des CRAM”(avec le soutien de l‟INRS) sur l‟utilisation des agents cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction dans l‟industrie. *INRS, 2007, Hygiène et sécurité du travail, 207*, 77-84.
- **Cézard, C.** (1992). Toxicologie du plomb chez l'homme. *Lavoisier*
- **Charbon, G., Bjorn, L., Mendoza-Chamizo, B., Frimodt-Moller J., & Lobner-Olesen A.** (2014) Oxidative DNA damage is instrumental in hyperreplication stress-induced inviability of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 42(21); 13228-13241.
- **Charbon, G., Bjørn, L., Mendoza-Chamizo, B., Frimodt-Møller, J., & Løbner-Olesen, A**. (2014). Oxidative DNA damage is instrumental in hyperreplication stress-induced inviability of *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, *42*(21), 13228-13241.

- **Cheesman, K., & Slater, H**. (1993). An introduction to free radicals biochemistry. *British Medical Bulletin*. 49: 481-493.
- **Chen, L., Hu, J.Y., Wang, S.Q.** (2012) The rôle of antioxdants in photoprotection : a critical review. *Journal of American Academy of Dermatology*. 67(5), 1013-1024.
- **Chen, R., Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T.** (1997). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, *28*(1), 25-30.
- **Chew, Y. L., Goh, J. K., & Lim, Y. Y.** (2009). Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food chemistry*, *116*(1), 13-18.
- **Chew, Y. L., & Lim, Y. Y**. (2018). Evaluation and Comparison of Antioxidant Activity of Leaves, Pericarps and Pulps of Three Garcinia Species in Malaysia. *Free Radicals & Antioxidants*, *8*(2).
- **Chouahda, S., & Soltani, N**. (2013). Toxicité aiguë et chronique du cadmium chez un poisson culiciphage: Gambusia affinis. *Bull. Soc. zool. Fr*, *138*(1-4), 115-126..
- **Clark, M., & Macquarie, R. S**. (2002). Green chemistry by nano-catalysis. *Green Chemistry*, *12*(5), 743-754
- **Comhair, S. A., & Erzurum, S. C.** (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *283*(2), L246-L255.
- **Cossio, M. L. T., Giesen, L. F., Araya, G., Pérez-Cotapos, M. L. S., Vergara, R. L., Manca, M., & Héritier, F.** (2002). *Environmental Sampling and Analysis of metals*. *CRC Press.* (Vol. XXXIII).
- **Costa, C. A., Trivelato, G. C., Pinto, A. M. P., & Bechara, E. J. H.** (1997). Correlation between plasma O-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in leadexposed workers. Clin Chem, 43 : 1196-1202
- **Cotticelli, M. G., Crabbe, A. M., Wilson, R. B., & Shchepinov, M. S.** (2013). Insights into the role of oxidative stress in the pathology of Friedreich ataxia using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. *Redox biology*, *1*(1), 398-404.

𝒟

- **Da Silva, D. L., Reis, F. S., Muniz, D. R., Ruiz, A. L. T., de Carvalho, J. E., Sabino, A. A., ... & de Fátima, Â.** (2012). Free radical scavenging and antiproliferative properties of Biginelli adducts. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *20*(8), 2645-2650.
- **De Marco, F.** (2013) Oxidative stress and HPV Carcinogenesis. *Viruses*, *5*; 708-731.

- **De Vasconcelos, A., Oliveira, P. S., Ritter, M., Freitag, R. A., Romano, R. L., Quina, F. H., ... & Barschak, A. G.** (2012). Antioxidant capacity and environmentally friendly synthesis of dihydropyrimidin-(2H)-ones promoted by naturally occurring organic acids. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, *26*(4), 155-161.
- **Dhumaskar, K. L., Meena, S. N., Ghadi, S. C., & Tilve, S. G.** (2014). Graphite catalyzed solvent free synthesis of dihydropyrimidin-2 (1H)-ones/thiones and their antidiabetic activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *24*(13), 2897-2899.
- **Dingwall-Fordyce, I., & Lane, R. E.** (1963). A follow-up study of lead workers. *Occupational and Environmental Medicine*, *20*(4), 313-315.
- **Dolatabadi, J.E.N. & Kashanian, S.** (2010) A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. *Food Research International*, **43**, 1223–1230.
- **Dragun, Z., Krasnići, N., Strižak, Ž., & Raspor, B.** (2012). Lead concentration increase in the hepatic and gill soluble fractions of European chub (*Squalius cephalus*)-an indicator of increased Pb 141 exposure from the river water. *Environmental Science and Pollution Research*, *19*(6), 2088- 2095.
- **Ďuračková, Z., Djrolo, F., Houngbe, H., Avode, G., Attoulou, V., Addra, B., Kodjoh, N., & Avimadj M.** (2008). Oxidants, antioxidants and oxidative stress. **In**: Mitochondrial medicine. 1ère ed. Gvozdjakova A. pp: 19-4.

E

- **El-Missiry, M. A., El-Sayed, I. H., & Othman, A. I.** (2001). Protection by metal complexes with SOD-mimetic activity against oxidative gastric injury induced by indometacin and ethanol in rats. *Annals of clinical biochemistry*, *38*(6), 694-700. Habila, T., Belghobsi, M., Stiti, M. Z., Goffin, E., de Tullio, P., Faury, G., ... & Khelili, S. (2018). Synthesis and vasodilator activity of 3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-ones bearing urea, thiourea, and sulfonylurea moieties. *Canadian Journal of Chemistry*, *97*(1), 20-28.
- **Ercal, N., Treeratphan, P., Hammond, T. C., Matthews, R. H., Grannemann, N. H., & Spitz, D. R.** (1996). In vivo indices of oxidative stress in lead-exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid or N-acetylcysteine. *Free Radical Biology and Medicine*, *21*(2), 157-161.
- **Etchevers, A., Glorennec, P., Lucas, J. P., Le Bot, B., Lecoffre, C., & Le Tertre, A.** (2017). Blood lead levels and risk factors in young children in France [Exposition au plomb des enfants en France: niveaux d'imprégnation et déterminants].

F

- **Favier, A.** (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- **Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K.** (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, *24*(7), 1043-1048.
- **Foyer, C. H., Trebst, A., & Noctor, G.** (2008). Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate and glutathione. In *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment* (pp. 241-268). Springer, Dordrecht.

G

- **Galato, D., Ckless, K., Susin, M. F., Giacomelli, C., Ribeiro-do-Valle, R. M., & Spinelli, A.** (2001). Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure–antioxidant activity. *Redox Report*, *6*(4), 243-250.
- **Gangwar, N., & Kasana, V. K.** (2012). 3, 4-Dihydropyrimidin-2 (1H)-one derivatives: Organocatalysed microwave assisted synthesis and evaluation of their antioxidant activity. *Medicinal Chemistry Research*, *21*(12), 4506-4511.
- **Gavrić, J., Anđelković, M., Tomović, L., Prokić, M., Despotović, S., & Gavrilović Bet Saičić, Z.** (2017). Oxidative stress biomarkers, cholinesterase activity and biotransformation enzymes in the liver of dice snake (*Natrix tessellata Laurenti*) during pre-hibernation and post-hibernation: A possible correlation with heavy metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 138: 154-162
- **George, S., Parameswaran, M. K., Chakraborty, R., & Ravi, T. K.** (2008). Synthesis and evaluation of the biological activities of some 3-{[5-(6-methyl-4-aryl-2-oxo-1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-1, 3, 4-oxadiazol-2-yl]-imino}-1, 3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives. *Acta Pharmaceutica*, *58*(1), 119-129.
- **Goetz, M. E., & Luch, A**. (2008). Reactive species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer letters*, *266*(1), 73-83.
- **Goullé, J. P., & Guerbet, M**. (2016). Recensement des niveaux d'intoxications mortelles par l'arsenic, le chrome, le mercure, le plomb, le thallium. *Toxicologie Analytique et Clinique*, *28*(1), 16-27.

- **Govindarajan, M.** (2011). Larvicidal and repellent properties of some essential oils against Culex tritaeniorhynchus Giles and Anopheles subpictus Grassi (Diptera: Culicidae). Asian Pac. J. Trop. Med. 4, 106–111. doi:10.1016/S1995-7645(11)60047-3
- **Goyer, R. A, Clarkson T.W**. (2001). **In**: Klaassen CD, editor. Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons, 6th ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division. p. 811-68.
- **Grivennikova, V.G., & Vinogradov, A.D**. (2013) Mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 78(13); 1490-1511.
- **Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (**2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, *3*(1), 43-53.
- **Gurer-Orhan, H., Sabır, H. U., & Özgüneş, H.** (2004). Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*, *195*(2-3), 147-154.
- **Gutowski M., & Kowalczyk S.** (2013) A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *ACTA biochimica polonica*, 60(1), 1-16.

$\mathcal{H}$

- **Habila, S.** (2017). *Evaluation du risque écologique et sanitaire de la contamination des eaux et des sédiments du barrage Beni Haroun (Wilaya de Mila)* (Doctoral dissertation).
- **Habila, T., Belghobsi, M., Stiti, M. Z., Goffin, E., de Tullio, P., Faury, G., ... & Khelili, S.** (2018). Synthesis and vasodilator activity of 3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-ones bearing urea, thiourea, and sulfonylurea moieties. *Canadian Journal of Chemistry*, *97*(1), 20-28.
- **Hammond, P. B., Succop, P., Dietrich, K. N., Clark, C. S., Hee, S. Q., & Bornschein, R. L**. (1985). The influence of social and environmental factors on dust lead, hand lead, and blood lead levels in young children. *Environmental Research*, *38*(1), 108-118.
- **Hebi, M., & Eddouks, M.** (2016). Évaluation de l'activité antioxydante de Stevia rebaudiana. *Phytothérapie*, *14*(1), 17-22.Hunaiti, A. A., & Soud, M. (2000). Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood. *Science of the total environment*, *248*(1), 45-50.
- **Holla, B. S., Rao B. S., Sarojini, B. K. Akberali, P. M.** (2004). One pot synthesis of thiazolodihydropyrimidinones and evaluation of their anticancer activity, Eur J Med Chem, 39 777-783.
- **Howard, J.K.** (1974). Human erythrocyte glutathione reductase and glucose 6-phosphate dehydrogenase activities in normal subjects and in persons exposed to lead ?Clin Sei Mol Med, 47 : 515-520

I

- **IARC.** (2006). Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, & International Agency for Research on Cancer. (2006). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* (Vol. 86). World Health Organization.
- **Ibrahim, W., Lee, U. S., & Chow, C. K.** (2004). Endotoxin increases hepatic susceptibility to lipid peroxidation: A possible role of iron. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, *18*(1), 23-29.
- **Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T. & Tatematsu, M.** (1986) Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food & Chemical Toxicology*, 24, 1071–1082.
- **Ittiyavirah, S. P., & Paul, A. S.** (2016). Gastroprotective effect of plumbagin and ethanolic extract of plumbaginales in experimentally-induced ulcer. *Journal of HerbMed Pharmacology*, *5*(3).

J

- **Jacquot, J. P., Dietz, K. J., Rouhier, N., Meux, E., Lallement, P. A., Selles, B., & Hecker, A.** (2013). Redox regulation in plants: glutathione and "redoxin" related families. In *Oxidative Stress and Redox Regulation* (pp. 213-231). Springer, Dordrecht.
- **Jamesdaniel, S., Rosati, R., Westrick, J., & Ruden, D. M.** (2018). Chronic lead exposure induces cochlear oxidative stress and potentiates noise-induced hearing loss. *Toxicology letters*, *292*, 175-180.
- **Jomova, K., & Valko, M.** (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease *Toxicology*, *283*(2‑3), 65‑87.
- **Juste, C.** (1988) - Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol. *Sci. Sol*, 26 (2): 103-112

K

- **Kalam, S., Singh, R., Mani, A., Patel, J., Khan, F. N., & Pandey, A**. (2012). Antioxidants: elixir of life. *International Multidisciplinary Research Journal*, *2*(1).
- **Kappe, C**. (2000). One-pot synthesis of dihydropyrimidinones catalysed by lithium bromide: an improved procedure for the Biginelli reaction. *Tetrahedron Letters*, *44*(13), 2757-2758.
- **Kaur, R., Chaudhary, S., Kumar, K., Gupta, M. K., & Rawal, R. K**. (2017). Recent synthetic and medicinal perspectives of dihydropyrimidinones: A review. *European journal of medicinal chemistry*, *132*, 108-134.

- **Kebsa, W.** (2006). Effet de la propolis Algérienne sur le stress oxydatif mitochondrial. Thèse de magister. Mohamed Sedik Ben Yahia-Jijel. pp.128-132.
- **Kehoe, R. A.** (1987). Studies of lead administration and elimination in adult volunteers under natural and experimentally induced conditions over extended periods of time. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *25*(6), i-iv.
- **Kumar, B. P., Sankar, G., Baig, R. N., & Chandrashekaran, S.** (2009). Novel Biginelli dihydropyrimidines with potential anticancer activity: a parallel synthesis and CoMSIA study. *European journal of medicinal chemistry*, *44*(10), 4192-4198.
- **Kumarappan, C. T., Thilagam, E., & Mandal, S. C.** (2012). Antioxidant activity of polyphenolic extracts of Ichnocarpus frutescens. *Saudi journal of biological sciences*, *19*(3), 349-355.

L

- **Lackner, R.** (1998). « Oxidative stress » in fish by environmental pollutants. **In**: Braunbeck T., Hinton DE et Streit B. (Eds.)). *Fish ecotoxicology* (Vol. 86). Springer Science & Business
- **Lagouge, M., & Larsson, N.G.** (2013) The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of internal medicine*, 273; 529-543.
- **Landrans, M., & Paclot, C.** (1994). "Le saturnisme infantile".change santé sociale. 74 :23- 28.
- **Landrans, M., Le goaster, c., Bouy p., Debaisieux f., & Roussel C.** (1999). Evaluation de l'exposition des enfants aux polluants émis par l'usine métal blanc à Bourg- Fidèle, St-Maurice, RNSP et DDASS des Ardennes, 47, p. et annexes.
- **Le K, Chiu F, & Ng K.** (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food chemistry*, 105, 353-363.
- **Lenntech,** (2007) - Plomb (Pb). Propriétés chimiques-Effets du plomb sur la santé- Effets du plomb sur l'environnement. http//www.lennetch.com/français/data-perio/Pb.htm
- **Lettéron, P., Fromenty, B., Benoît, T., Degott, C., & Pessayre, D**. (1996). Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *Journal of hepatology*, *24*(2), 200-208.
- **Leverve, X.** (2009). Stress oxydant et antioxydants. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 44(5): 219-224.
- **Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu X. R., Chen, Y. M., & Li, H. B.** (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6; 6020-6047.

- **Libetta, C., Sepe, V., Esposito, P., Galli, F., & Dal Canton, A.** (2011). Oxidative stress and inflammation: implications in uremia and hemodialysis. *Clinical biochemistry*, *44*(14-15), 1189-1198.
- **Limbach, S. & Guilland, J. C.** (2007). Vitamines. *Dans*: Traité de nutrition artificielle de l'adulte. *2eme éd*, *France*, *Springer- Verlag*, pp; 127-143.
- **Lin, J. K., Chen, P. C., Ho, C. T. & Lin-Shiau, S.Y.** (2000). Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3, 3'-digallate, (−)-epigallocatechin-3- gallate, and propyl gallate. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 48, 2736–2743.
- **Liu, C. M., Ma, J. Q., & Sun, Y. Z.** (2011). Protective role of puerarin on lead-induced alterations of the hepatic glutathione antioxidant system and hyperlipidemia in rats. *Food and chemical toxicology*, *49*(12), 3119-3127.

M

- **Mager, E. M.** (2011). *Lead, Fish Physiology*, *31*(11), 185‑ 236
- **Malcom, R., & Dascher, P. E.** (1970). A note on income smoothing in the chemical industry. *Journal of Accounting Research*, *8*(2), 253-259
- **Martínez-Cayuela, M.** (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 77: 147-161.
- **Matés, J. M.** (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, **38:** 595-603.
- **Matos, L. H. S., Masson, F. T., Simeoni, L. A., & Homem-de-Mello, M.** (2018). Biological activity of dihydropyrimidinone (DHPM) derivatives: A systematic review. *European journal of medicinal chemistry*, *143*, 1779-1789.
- **McCarthy, T. L., Kerry, J. P., Kerry, J. F., Lynch, P. B., & Buckley, D. J.** (2001). Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties. *Meat Science*, *58*(1), 45-52.
- **Menon R.** (2014) Oxidative stress damage as a detrimental factor in preterm birth pathology. *Frontiers in Immunology*, 5(567); 1-14.
- **Merksamer, P.I., Liu, Y., He, W., Hirschey, M.D., Chen, D., & Verdin, E.** (2013) The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging*, 5 (3); 144-150.
- **Milane, H.** (2004). *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications* (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur (Strasbourg). Spécialité Pharmacologie, pp: 13).

- **Miwa, S., Beckman, K. B., & Muller, F. (Eds.).** (2008). *Oxidative stress in aging: from model systems to human diseases*. Springer Science & Business Media.
- **Moon, J. K., & Shibamoto, T.** (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*, *57*(5), 1655-1666.

N

- **Nanditha, B., & Prabhasankar, P.** (2009). Antioxidants in bakery products: a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 49, 1–27.
- **Nuyts, G. D., Daelemans, R. A., Jorens, P. G., Elseviers, M. M., Van de Vyver, F. L., & De Broe, M. E.** (1991). Does lead play a role in the development of chronic renal disease?. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *6*(5), 307-315.

O

- **Oliva, M., Vicente, J. J., Gravato, C., Guilhermino, L., & Dolores Galindo- Galindo-Riaño, M. D.** (2012). Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): Seasonal and spatial variation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *75*(1), 151‑ 162.

P

- **Palafox-Carlos, H., Gil-Chávez, J., Sotelo-Mundo, R., Namiesnik, J., Gorinstein, S., & González-Aguilar, G.** (2012). Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in 'Ataulfo'mango pulp: chlorogenic, gallic, protocatechuic and vanillic acids. *Molecules*, *17*(11), 12657-12664
- **Papa, L., Manfredi, G., & Germain, D.** (2014). SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy. *Genes and Cancer*, 5 (1-2); 15-21.
- **Park, P. J., Jung, W. K., Nam, K. S., Shahidi, F & Kim, S. K.** (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from proteinhydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American oil Chemists Society*. 78 (6): 651-656.
- **Parkinson, D. K., RYAN, C., Bromet, E. J., & Connell, M. M.** (1986). A psychiatric epidemiologic study of occupational lead exposure. *American journal of epidemiology*, *123*(2), 261-269.
- **Patrick, L.** (2006). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative medicine review*, *11*(2). Padmavathi, V., Subbaiah, D. R. C. V., Mahesh, K., & Lakshmi, T. R. (2007). Synthesis and Bioassay of Amino-pyrazolone, Amino-isoxazolone and Amino-pyrimidinone Derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *55*(12), 1704-1709.

- **Peng, C., Wang, X., Chen, J., Jiao, R., Wang, L., Li, Y. M., Zuo, Y., Liu, Y., Lei, L., Ma, K.Y., Huang, Y., & Chen Z.Y.** (2014) Antioxidants biology of ageing and role of dietary. *BioMed Research International*, ID 831841; 1-13.

ℛ

- **Radwan, M. A., El-Gendy, K. S., & Gad, A. F.** (2010). Biomarkers of oxidative stress in the landsnail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere*, *79*(1), 40‑46.
- **Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K.** (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, *2014*.
- **Rahman, K.** (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, **2:** 219-236.
- **Rao, S. P., Kalva, S., Yerramilli, A., & Mamidi, S.** (2011). Free radicals and tissue damage: role of antioxidants. *Free radicals and antioxidants*, 1: 2-7.
- **Ravindra Kumar Gautam, S. K. S., & M. C. C.** (2014). unctionalized Magnetic Nanoparticles for Heavy Metals Removal from Aqueous Solutions. In E. S. Sharma (Éd.), *Heavy Metals In Water : Presence, Removal and Safety* Royal Society, 91‑135.
- **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C.** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.
- **Ríos-Arrabal, S., Artacho-Cordón, F., León, J., Román-Marinetto, E., Salinas-Asensio, M.M., Calvente, I., & Núñez, M.I.** (2013) Involvement of free radicals. **In** : breast cancer. *Springerplus*, 2(404); Salido M. and Rosado J.A. (2009) Apoptosis: involvement of oxidative stress and intracellular ca2+ homeostasis gines. *Springer Science and Business Media*, pp: 1-17.
- **Rochette, L.** (2008). Stress oxydant et sepsis. *Réanimation*, *17*(6), 1-4.
- **Rodil, R., Quintana, J.B., Basaglia, G., Pietrogrande, M.C. & Cela, R**. (2010). Determination of synthetic phenolic antioxidants and their metabolites in water samples by downscaled solid-phase extraction, silylation and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6428–6435.
- **Ruiz-Ojeda, F. J., Olza, J., Gil, Á., & Aguilera, C. M.** (2018). Oxidative Stress and Inflammation in Obesity and Metabolic Syndrome. In *Obesity* (pp. 1-15). Academic Press.

S

- **Saenger, P., Markowitz, M. E., & Rosen, J. F.** (1984). Depressed Excretion of 6²-Hydroxycortisol in Lead-Toxic Children. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *58*(2), 363-367.
- **Saka, S., Bahi, A., & Aouacheri, W.** (2011). L'effet du stress oxydant induit par l'acétate de plomb sur le système enzymatique du glutathion chez les rats. In *Annales de Toxicologie Analytique*, 23(3), 139-145.
- **Sandalio, L.M., Rodriguez-serrano, M., Romero-puertas, M., & Ddel rio, L**. (2013). Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. **In**: peroxisomes and their key role in cellular signaling and metabolism, subcellular biochemistry. *Springer Sciencec Business Media Dordrecht*. pp. 233-249.
- **Sandhir, R., & Gill, K. D.** (1995). Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biological trace element research*, *48*(1), 91.
- **Sangvanich, T., Morry, J., Fox, C., Ngamcherdtrakul, W., Goodyear, S., Castro, D., ... & Yantasee, W.** (2014). Novel oral detoxification of mercury, cadmium, and lead with thiol-modified nanoporous silica. *ACS applied materials & interfaces*, *6*(8), 5483-549
- **Schweitzer, E. J., Matas, A. J., Gillingham, K. J., Payne, W. D., Gores, P. F., Dunn, D. L., ... & Najarian, J. S**. (1991). Causes of renal allograft loss. Progress in the 1980s, challenges for the 1990s. *Annals of surgery*, *214*(6), 679.
- **Sekli-Belaidi, F.** (2011). *Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly (3, 4-éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique: application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- **Serteyn, D., Grulke, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., & Deby-Dupont G.** (2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Annal de Médecine Vétérinaire*. 147: 79-93.
- **Sfakianakis, D. G., Renieri, E., Kentouri, M., & Tsatsakis, A. M.** (2015). Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. *Environmental research*, *137*, 246-255.
- **Shafiqur-Rehman, S., Chandra, O., & Abdulla, M. (**1995). Evaluation of malondialdehyde as an index oflead damage in rat brain homogenates. Biometals, 8: 275-279
- **Shahidi, F. & Wanasundara, P. D.** (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 32, 67–103.

- **Shahidi, F., Wanasundara, U., Amarowicz, R. & Naczk, M.** (1995). Natural antioxidants from canola meal. **In**: *Proceedings of 8th Rapeseed International Congress*, Saskatoon, Canada, pp. 873–875.
- **Shahidi, F. & Naczk, M**. (2004). *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. Boca Raton: CRC Press.
- **Shahidi, F.** (2015). Antioxidants: principles and applications. **In**: F. Shahidi (ed.) *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Cambridge: Woodhead Publishing, pp. 1–14.
- **Shahidi, F. & Ambigaipalan, P.** (2016). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – a review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897.
- **Sivaprasad, R., Nagaraj, M., & Varalakshmi, P.** (2004). Combined efficacies of lipoic acid and 2, 3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *The Journal of nutritional biochemistry*, *15*(1), 18-23.
- **Sroka, Z., & Cisowski, W.** (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, *41*(6), 753-758.
- **Stefani, H. A., Oliveira, C. B., Almeida, R. B., Pereira, C. M., Braga, R. C., Cella, R., ... & Nogueira, C. W.** (2006). Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents. *European journal of medicinal chemistry*, *41*(4), 513-518.
- **Stouthart, A. J. H ., Spanings, F. A., Lock R. A., Bonga, S. E. W.** (1995). Effects of water pH on chromium toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, *32*(1), 31- 42.
- **Subhashini, S. S., Velan, M., Kaliappan, S**. (2013). Biosorption of lead by Kluyveromyces marxianus immobilized in alginate beads. *Journal of environmental biology*, *34*(5), 831
- **Sugawara, E., Nakamura, K., Mikaye, T., Fukumura, A., & Seki, Y.** (1991). Lipid peroxydation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. Br] Ind Med, 48 : 239-242

$\mathcal{T}$

- **Talbi, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Talbi, J., & Hilali, A.** (2015). Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la Nigella satival. *J.M.E.S.C.N*, 6 (4):1111-1117.
- **Tale, R. H., Rodge, A. H., Hatnapure, G. D., & Keche, A. P.** (2011). The novel 3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-one urea derivatives of N-aryl urea: synthesis, anti-inflammatory, antibacterial and antifungal activity evaluation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *21*(15), 4648-4651.

- **Tamaddon, F., & Razmi, Z.** (2011). Oxidation of 1, 4-Dihydropyridines and 3, 4-Dihydropyrimidin-2 (1 H)-ones to Substituted Pyridines and Pyrimidinones Using Ca (OCl) 2 in Aqueous Media. *Synthetic Communications*, *41*(4), 485-492.
- **Tanumihardjo, S. A.** (Ed.). (2012). *Carotenoids and human health*. Springer Science & Business Media.
- **Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., & Sutto, D.J.** (2012). Heavy metal toxicity andthe environment. In *Molecular, clinical and environmental toxicology.*Springer Basel. 133-164.
- **Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M.** (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae). *Food chemistry*, *90*(3), 333-340.
- **Tokarz, P., Kaarniranta, K., & Blasiak, J.** (2013). Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Biogerontology*, *14*(5), 461-482.

U

- **Upadhyay, A. K., Mathur, R., Bhadauria, M., & Nirala, S. K.** (2009). Therapeutic influence of zinc and ascorbic acid against lead induced biochemical alterations. *Therapie*, *64*(6), 383-388.

V

- **Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser J.** (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of biochemistry and cell biology*. 39: 44-84.
- **Virgolini, M. B., Mattalloni, M. S., Deza-Ponzio, R., Albrecht, P. A., & Cancela, L. M.** (2019). Lead Exposure and Ethanol Intake: Oxidative Stress as a Converging Mechanism of Action. In : *Neuroscience of Alcohol*, Academic Press. pp. 515-525.

W

- **Wages, P. A., Silbajoris, R., Speen, A., Brighton, L., Henriquez, A., Tong, H., Bromberg, P. A., Simmons, S.O., & Samet J. M.** (2014). Role of H2O2 in the oxidative effects of zinc exposure in human airway epithelial cells. *Redox Biology*. 3: 47–55.
- **Wilson, M. R., Lightbody, J. H., Donaldson, K., Sales, J., & Stone, V.** (2002). Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and in vitro. *Toxicology and applied pharmacology*, *184*(3), 172-179

- **Winterbourn, C. C., Kettle, A. J., & Hampton, M. B. (2016)**. Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annual review of biochemistry*, *85*, 765-792.

X

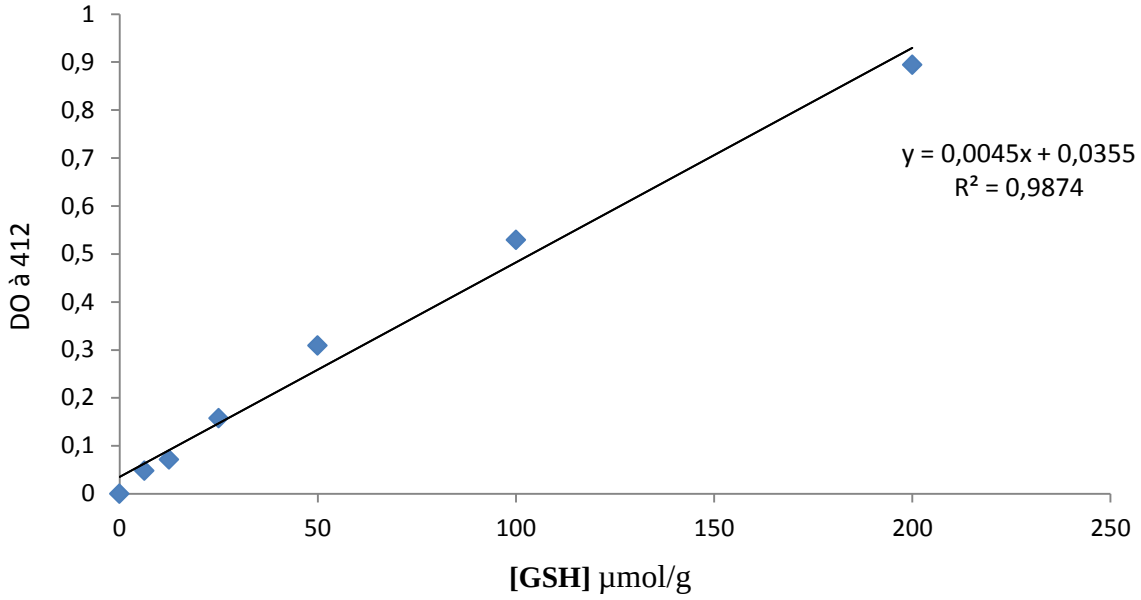
- **Xu, F., Liu, Z., Cao, Y., Qiu, L., Feng, J., Xu, F., & Tian, X**. (2017). Assessment of heavy metal contamination in urban river sediments in the Jiaozhou Bay catchment, Qingdao, China. *Catena*, *150*, 9‑ 16.

Y

- **Yan, L. J.** (2014). Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerances. *Redox Biology*. 2: 165-169.
- **Yao, J. K., & Keshavan, M. S.** (2011). Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. *Antioxidants & redox signaling*, *15*(7), 2011-2035.

Z

- **Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S.** (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*. *199*(3): 316- 331.
- **Zhang, A., Zhu, Q. Y., Luk, Y. S., Ho, K. Y., Fung, K. P., & Chen Z**. (1997) Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life sciencs*, 61(4); 383-394.
- **Zhou, Y., Yan, H., Guo, M., Zhu, J., Xiao, Q. & Zhang L**. (2013) Reactive oxygen species in vascular formation and development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013V; 1-14.
- **Zhuang, W., Liu, Y., Chen, Q., Wang, Q., & Zhou, F.** (2016). A new index for assessing heavy metal contamination in sediments of the Beijing-Hangzhou Grand Canal (*Zaozhuang Segment*): A case study. *Ecological Indicators*, *69*(November), 252‑ 260.
- **Zou, Y., Lu, Y., & Wei, D.** (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of Hypericum perforatum L. in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(16), 5032-5039.



Annexe 1. *Courbe d'étalonnage de glutathion.*

Réalisée par :

Abdi Selma

Encadré par :

Dr Habila S.

Evaluation de l'activité antioxydante des substances nouvellement synthétisées (3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones) contre un stress oxydatif induit par le Plomb

Résumé

La présente étude a été entreprise afin d'évaluer l'activité antioxydante *in vitro* de nouveaux dérivés de 3,4-dihydropyrimidine-2(1H)-on portant des groupes sulfonylurée, urée et thio-urée en utilisant le test $DPPH^{\bullet}$ le test de piégeage du radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ et le test de réduction de fer (FRAP) , et à tester les produits les plus actifs comme des agents antioxydants contre un stress oxydatif induit par le plomb *in vitro* au niveau des homogénats de foie des souris albinos *Wistar*, les résultats obtenus montrent que nos composés sont dotés d'un pouvoir antioxydant important. Le composé HTClS présente l'effet scavenger le plus puissant du radical $DPPH^{\bullet}$ (IC_{50} = 22.5 ± 0.08µg/ml) tandis que le composé $HTCH_3S$ a présenté la meilleure activité anti-radicalaire contre le radical libre ABTS (IC_{50}= 1.56 ± 0.07 µg/ml) par comparaison à tous les produits testés y compris la substance de référence (3,28±0,078 µg/ml). Or, les résultats du test FRAP ont montré que, les composés HTOMLS portant les groupements méthoxyphenyl et $HTNO_2S$ portant le groupement nitrophenyl ont exhibé un pouvoir réducteur remarquable mais reste toujours inférieur à celui de la substance de référence. Par ailleurs, les deux molécules HTClS portant les groupements Chloro-phényl et $HTCH_3S$ et le groupement alkyl jugées plus actifs par les tests antioxydants DPPH, ABTS et FRAP ont significativement réduit le taux de MDA et de GSH.

Mots clés : stress oxydatif, activité antioxydante, 3,4-dihydropyrimidine-2(1H)-on, Plomb.

Abstract

The present study was undertaken to evaluate the antioxidant activity *in vitro* of new derivatives of 3,4-dihydropyrimidine-2 (1H) -on bearing sulfonylurea, urea and thiourea groups using DPPH● test, the radical-cation trapping test ABTS ● + and the iron reduction test (FRAP), and to test the most active products as antioxidants against lead-induced oxidative stress *in vitro* at liver homogenates of albino Wistar mice. The results show that our compounds have an important antioxidant power. The compound HTClS has the strongest scavenger effect of the radical DPPH • (IC50 = 22.5 ± 0.08µg / ml) while the compound HTCH3S exhibited the best anti-free radical activity against the free radical ABTS (IC50 = 1.56 ± 0.07 µg /ml) compared to all products tested including the reference substance (3.28 ± 0.078 µg / ml). The results of the FRAP test have shown that the HTOMLS compounds carrying the methoxyphenyl and $HTNO_2S$ group bearing the nitrophenyl group exhibited a remarkable reducing power but which remains lower than that of the reference substance. Moreover, the two HTClS molecules carrying the chlorophenyl group and $HTCH_3S$ carrying the alkyl group considered more active by the antioxidant tests DPPH, ABTS and FRAP have significantly reduced MDA and GSH levels.

Key words : oxidative stress, antioxidant activity, 3,4-dihydropyrimidine-2(1H)-on, Plomb.

الملخص

أجريت الدراسة الحالية لتقييم النشاط المضاد للأكسدة لمشتقات جديدة من 3،4 dihydropyrimidine-2(1H)-on حاملة لمجموعات سلفونيل يوريا ,اليوريا وثيوريا باستخدام اختبار $DPPH^{\bullet}$ اختبار إزاحة الجذور الحرة $ABTS^{+\bullet}$ واختبار طريقة ارجاع الحديد (FRAP), واختبار الجزيئات الأكثر نشاطًا ضد الإجهاد التأكسدي الناجم عن الرصاص على مستوى متجانسة من كبد الفئران ألبينو ويستار. أظهرت النتائج أن مركباتنا لديها قدرة مضادة للأكسدة. يمتلك المركب HTClS تأثيرا تاثير قوي في إزاحة جدر الـ DPPH (IC50 = 22.5 ± 0.08 ميكروغرام / مل) بينما أظهرالمركب $HTCH_3S$ أفضل نشاط قوي في إزاحة جذر الـ ABTS (IC50 = 1.56 ± 0.07 ميكروغرام / مل) مقارنة بجميع المركبات التي تم اختبارها بما في ذلك حمض الأسكوربيك (3.28 ± 0.078 ميكروغرام / مل). ومع ذلك ، فقد أظهرت نتائج اختبار FRAP أن مركبات HTOMLS التي تحمل مجموعة الميثوكسي فينيل و $HTNO_2S$ الحاملة لمجموعة النيتروفنيل قد أبدت قدرة ارجاع ملحوظة لكنها أقل من تلك الخاصة بحمض الأسكوربيك. بالاضافة الى ان مركب HTClS الذي يحمل مجموعة الكلوروفينيل و $HTCH_3S$ اللذي يحمل مجموعة الألكيل واللذان يعتبران أكثر نشاطًا من خلال اختبارات مضادات الأكسدة DPPH و ABTS و FRAP قد خفضان بشكل كبير من مستوى MDA و GSH .

الكلمات المفتاحية: الاجهاد التأكسدي، نشاط مضادات الأكسدة، 3،4 dihydropyrimidine-2(1H)-on، Plomb.