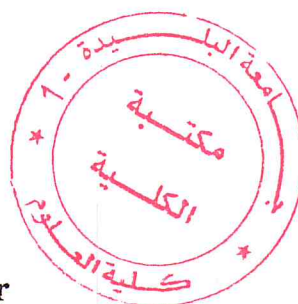


République Algérienne Démocratique et Populaire  
 Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
 Université BLIDA 1  
 Faculté des Sciences  
 Département de Chimie



Mémoire présenté par  
**BENREKA Sofiane**



En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Synthèse d'analogues de la Curcumine. Etude  
 de l' activité antimicrobienne**

Soutenu publiquement le 30 septembre 2014 devant le jury composé de :

M. El Hattab	Pr	Président	Université de Blida 1
H. Boutoumi	MCA	Examineur	Université de Blida 1
S. Kasmi	MCA	Promotrice	Université de Blida 1
Z. Bouabdallah	MCB	Co-promotrice	Université de Blida 1

Promotion 2013-2014

## Remerciements

*Ce travail a été réalisé principalement entre le laboratoire de Chimie des Substances Naturelles à l'université de Blida1, l'unité bactériologique du laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de Blida. Je saisis cette occasion pour adresser mes sincères remerciements et ma gratitude à :*

Tout d'abord à Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Je tiens à remercier d'abord Mme Kasmi S, maitre de Conférences A à l'université de Blida1 et responsable de master option Chimie des Substances Naturelles pour son encadrement, ses conseils, ses commentaires et sa bienveillance. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude pour m'avoir guidé et aidé tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur EL HATTAB Mohamed professeur à l'Université Saad Dahlab de Blida1, initiateur du master, qui m'a honoré en acceptant de présider ce jury .et surtout pour ses précieux conseils.

Je remercie Dr Y. BOUTOUMI qui m'a fait l'honneur de juger ce travail en tant qu'examinateur.

Mes remerciements vont aussi à toute l'équipe pédagogique du master option « Chimie des Substances Naturelles » Pr Y.D aghbouche, Pr. A.Badis, Dr Toufak, Dr. N.Ayachi et Dr. N. BOUZIDI pour tout leur soutien et conseils pendant ces deux années d'études.

Je souhaiterai également remercier Dr F.Z Zradni de l'université d'Oran(USTO) pour m'avoir aidé à réaliser les spectres IR et RMN<sup>1</sup>H.

Je remercie de tout mon cœur tous ceux qui, de loin ou de près, m'ont aidé dans ce travail. Je leur exprime ma profonde gratitude, plus particulièrement à mes camarades Dahmani Siham et Hamiche Sonia.

*Merci à tous*

## Dédicaces

*Avec une immense joie, je dédie ce modeste travail à :*

*A très chers mes parents*

*Mon père,*

*Ce travail est ce fruit de tes prières, de tes sages conseils et sacrifices*

*Ma mère,*

*Tes prières et tes bénédictions m'ont accompagnée tous les jours dans mes études*

*A mes frères*

*« Mohamed, Mustapha, Ibrahim »*

*A mes sœurs*

*« Zola, Meriem, Baya »*

*A mes amis*

*« Dahmani Siham, Alaouche Islem, Hamiche Sonia, Abd-elkader Touati, Aicha Si-Mohamed, Elbey Imen, Errebai Hocine, Kritli Nabil, Oukil Wissam et Bounaass Karima »*

*Pour le soutien moral qu'ils m'ont apporté,*

## ملخص

الكركم عامل مضاد للالتهابات القوية و مضاد للسرطان و مكافحة فيروس نقص المناعة العامل الرئيسي للأكسدة هو تشكيل الأوكسجين النشطة مثل الهيدروكسيل.

يتم الحصول على نظائر الكركمين من (DBC) مرورا على (DBC<sub>T</sub>) وصولا إلى (DBC<sub>SEL</sub>) وتم تأييد من قبل الطرق الطيفية التالية (RMN<sup>1</sup>H ,FTIR).

أجريت دراسة بيولوجية لمختلف النظائر مع بعض البكتريا في المستشفى المركزي بالبلدية وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة أن مركبات لها أنشطة مضادة للجراثيم والفطريات. منتجات B و المنتج C النهائي تمارس النشاط المضاد للبكتريا ومضاد للفطريات كبير مقارنة بالمنتجات الأخرى . وأظهر تقييم النشاط المضاد للأكسدة في طريقة DPPH فقط أن يضاعف A و B لا تحتوي على الكبريت في بنيتها

**الكلمات المفتاحية:** الكركمين، ثيازول، سايكلو هيكسنون، ، اختبارات بيولوجية

## Résumé

Ce manuscrit décrit la synthèse et les applications pharmacologiques potentielles d'analogues à la curcumine possédant un motif thiazole. La curcumine est un constituant majoritaire de la déméthoxycurcumine et de la bis-déméthoxycurcumine de la curcumine naturelle isolée des rhizomes de *Curcuma longa* L.

La curcumine est douée d'activités pharmacologiques remarquables : c'est un puissant agent anti-inflammatoire sans effet toxique ; anti-HIV et anticancéreux. La principale action de la curcumine est son pouvoir antioxydant vis-à-vis de la formation d'espèces oxygénées actives comme le radical hydroxyle et l'anion superoxyde.

Les analogues à la curcumine sont obtenus à partir de la dibenzylidénecyclohexanone(DBC) comme molécule chef de file. La DBC est ensuite engagée dans une série de réaction à multi étapes selon la réaction de Michael pour l'obtention d'une thiourée cyclique , puis selon la cyclisation de Hantzsch pour conduire au méthylène actif . La condensation du sel thiazolium greffé sur le méthylène actif conduit aux analogues attendus. Tous les produits synthétisés ont été caractérisés par les différentes méthodes spectroscopiques tels que : IRTF, RMN<sup>1</sup>H.

Une étude biologique a été réalisée sur le produit final ainsi que sur ses précurseurs vis-à-vis de quelques bactéries : *Escherichia coli* (Gram<sup>-</sup>), *Salmonella. tify* (Gram<sup>-</sup>), *Staphylococcus aureus* (Gram<sup>+</sup>), *Bacillus subtilis* (Gram<sup>+</sup>) pour l'activité antibactérienne, et *Candida albicans* *Mucor ram annianus* pour l'activité antifongique. Ces tests ont été effectués au niveau de l'unité de bactériologie clinique de laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de Blida.

Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé que les composés synthétisés présentaient des activités antibactériennes et antifongiques. Les produits B (thiourée cyclique) et C (produit final) exercent une activité antibactérienne et antifongique importantes par rapport aux autres produits A et D.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante par la méthode du DPPH a montré que seuls les composés A et B ne comportant pas de soufre dans leur structure présentent une activité antioxydante appréciable par rapport au contrôle positif de la vitamine E.

**Mots clés** : Curcumine, thiazole, Dibenzylidénecyclohexane, RMN, tests biologiques

## Abstract

This manuscript describes the synthesis and potential pharmacological applications of curcumin analogues possessing a thiazole motif. Curcumin is a major constituent of demethoxy curcumin and bis-demethoxy curcumin isolated natural rhizomes of *Curcuma longa* L.

Curcumin is endowed with remarkable pharmacological activities: it is a powerful anti-inflammatory agent without toxicity; anticancer and anti-HIV. The main action of curcumin is its antioxidant power vis-à-vis the formation of active oxygen species such as hydroxyl radical and superoxide anion.

Curcumin analogs are obtained from the dibenzylidénecyclohexanone (DBC) molecule as leader. The CBD is then engaged in a series of reaction steps according to the multi Michael reaction to obtain a cyclic thiourea and then by Hantzsch cyclization to yield the active methylene. The condensation of thiazolium salt grafted onto the active methylene led to expected similar. All synthesized products were characterized by various spectroscopic methods such as FT-IR,  $^1\text{H}$  NMR.

A biological study was carried out on the final product as well as precursors thereof vis-à-vis some bacteria: *Escherichia coli* (Gram-) *Salmonella typhi* (Gram) *Staphylococcus aureus* (Gram +), *Bacillus subtilis* (Gram +) for antibacterial activity, and *Candida albicans* *Mucor ram Annianus* for antifungal activity. These tests were performed at the Clinical Bacteriology Laboratory of the Central Public Hospital Establishment of Blida.

The results obtained in this study showed that the synthesized compounds have antibacterial and antifungal activities. B products (cyclic thiourea) and C (final product) exert significant antibacterial activity and antifungal compared to other products A and D.

Evaluation of antioxidant activity in the DPPH method showed that only compounds A and B not containing sulfur in their structure have a significant antioxidant activity compared to the positive control of vitamin E.

**Keywords:** Curcumin, thiazole, dibenzylidenesorbitol Cyclohexanone, NMR, bioassays

## Liste des abréviations

- APG** : Angiospermes Phylogénie Groupe
- CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- DBC** : DiBenzylideneCyclohexanone
- DBC<sub>t</sub>** : 8E)-8-Benzylidene-3,4,5,6,7,8-hexahydro-4-phenylquinazoline-2(1H)-Thione
- DBC<sub>Cl</sub>** : (9E)-9-benzylidene-6,7,8,9-tetrahydro-5-phenyl-2H-thiazolo[2,3-b]quinazolin-3(5H)-one
- DBC<sub>SeI</sub>** : 2Z,9E)-9-benzylidene-6,7,8,9-tetrahydro-2-(3,4-dimethylthiazol-2(3H)-ylidene)-5-phenyl-2H-thiazolo[2,3-b]quinazolin-3(5H)-one
- DMSO** : Dimethylsulfoxyde
- DPPH** : 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl
- C** : Concentration
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** : Dichlorométhane
- EtOH** : Ethanol
- KBr** : Bromure de potassium
- HETE** : Hydroxyeicosatétraénoïque
- VIH** : Virus De l'Immunodéficience Humaine
- IRTF** : Infrarouge à Transformer de Fourier
- ppm** : Partie Par Million
- pH** : Potentiel d'Hydrogène
- m** : Multiplet
- nm** : Nanomètre

<b>Rdt</b>	: Rendement
<b>R<sub>f</sub></b>	: Rapport Frontal
<b>RMN</b>	: Résonance Magnétique Nucléaire
<b>t</b>	: Triplet
<b>T<sub>a</sub></b>	: Temperature Ambiante
<b>T<sub>f</sub></b>	: Température de Fusion
<b>s</b>	: Singulet
<b>SM</b>	: Spectrométrie de Masse
<b>ST</b>	: Sel Thiazolum
<b>UV- Vis</b>	: Ultra - Violet- Visible
<b>µm</b>	: Micromètre
<b>%</b>	: Pourcentage
<b>°C</b>	: Degrés Celsius



## Liste des figures

<b>Figure 01 : <i>Curcuma longa</i> .....</b>	<b>03</b>
<b>Figure 02 : Sources de curcumine.....</b>	<b>04</b>
<b>Figure 03 : Structure des conformations de la curcumine.....</b>	<b>05</b>
<b>Figure 04 : Curcuminoïdes naturels isolés de <i>Curcuma longa L.</i> .....</b>	<b>07</b>
<b>Figure 05 : Formes mésomère du radical central.....</b>	<b>08</b>
<b>Figure 06 : Structure générale des curcuminoïdes.....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 07 : Equilibre céto-énolique.....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 08 : Simulation des spectres RMN<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de la curcumine par le Chem Draw ....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 09 : Analogues naturels à la curcumine .....</b>	<b>13</b>
<b>Figure 10 : Autres analogues naturels à la curcumine.....</b>	<b>13</b>
<b>Figure 11 : La cassumunine.....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 12 : Les analogues synthétiques de la curcumine.....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 13 : Spectre IR du DBC.....</b>	<b>28</b>
<b>Figure 14 : Chromatogramme de DBC<sub>t</sub> ainsi que de réactif de départ DBC.....</b>	<b>30</b>

<b>Figure 15</b> : Spectre IR du DBC <sub>t</sub> .....	<b>31</b>
<b>Figure 16</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H du DBC <sub>t</sub> (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ ppm.....	<b>32</b>
<b>Figure 17</b> : Spectre IR du DBC <sub>Cl</sub> .....	<b>35</b>
<b>Figure 18</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H du DBC <sub>Cl</sub> .....	<b>36</b>
<b>Figure 19</b> : Spectre IR du DBC <sub>Set</sub> .....	<b>40</b>
<b>Figure 20</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H du DBC <sub>scl</sub> (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ ppm.....	<b>41</b>
<b>Figure 21</b> :Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri.....	<b>43</b>
<b>Figure 22</b> : Gélose fusionnée dans des boites de pétri .....	<b>45</b>
<b>Figure 23</b> : Aromatogramme de E.coli avec les produits A, B, C, D .....	<b>47</b>
<b>Figure 24</b> : Aromatogramme de S.typhi avec les produits A, B, C, D .....	<b>47</b>
<b>Figure 25</b> : Aromatogramme de S.aureus avec les produits A, B, C, D .....	<b>47</b>
<b>Figure 26</b> : Aromatogramme de B.subtilis avec les produits A, B, C, D .....	<b>48</b>
<b>Figure 27</b> : Aromatogramme de <i>Candida Albicans</i> avec les produits A, B, C, D .....	<b>49</b>
<b>Figure 28</b> : Aromatogramme de <i>Mucor Ramannianus</i> avec les produits A, B, C, D .....	<b>51</b>

**Figure 29** : Histogramme représentant l'étude comparative de l'activité antimicrobienne des quatre produits A.B.C.D .....51

**Figure 30** : Histogramme représentant l'étude comparative de l'activité antifongique des quatre produits A.B.C.D.....51

**Figure 31** : Forme libre et réduite du DPPH.....53

**Figure 32** : La photographie des résultats obtenus de l'activité antioxydante de Vit E testé par la méthode au DPPH.....55

**Figure 33** : Variation du taux de piégeage du DPPH par la vitamine E, les produits : A, B, C, D en fonction des différentes concentrations.....57

**Figure 34** : Comparaison des valeurs EC50 de nos produits et de la vitamine E .....57

## Liste des schémas

<i>Schéma 01</i> : Synthèse de la curcumine.....	09
<i>Schéma 02</i> : La tautomérie céto-énolique de la curcumine.....	15
<i>Schéma 03</i> : Synthèse de dibenzylideneacetones (A <sub>1</sub> -A <sub>12</sub> ) et leurs dérivés de pyrazoline (B <sub>1</sub> -B <sub>4</sub> ) .....	17
<i>Schéma 04</i> : Voies de synthèse des composés 2-5 .....	19
<i>Schéma 05</i> : Voies de synthèses des composés 6 a-d et 7 a-d .....	20
<i>Schéma 06</i> : Les méthodes générales utilisées pour la synthèse des analogues à la curcumine 1a-li .....	22
<i>Schéma 07</i> : Synthèse des Bis indoles catalysée par La zéolite. Synthèse de la N-acryloyl .....	26
<i>Schéma 08</i> : Synthèse de DiBenzylidéneaCyclohexanon (DBC) .....	27
<i>Schéma 09</i> : Mécanisme réactionnel de la préparation de DBC.....	29
<i>Schéma 10</i> : Synthèse de DBC.....	29
<i>Schéma 11</i> : Mécanisme réactionnel de la préparation de DBC <sub>t</sub> .....	33
<i>Schéma 12</i> : Synthèse de DBC <sub>Cl</sub> .....	37
<i>Schéma 13</i> : Mécanisme réactionnel de la préparation de DBC <sub>Cl</sub> .....	37

**Schéma 14 : Synthèse du Sel Thiazoluim ST .....38**

**Schéma 15 : Synthèse de DBC<sub>Sel</sub> .....39**

## Liste des tableaux

<i>Tableau 01</i> : Comparaison $\delta$ ppm thiorique / $\delta$ ppm expérimentale.....	33
<i>-Tableau 02</i> : Comparaison $\delta$ ppm thiorique / $\delta$ ppm expérimentale.....	37
<i>Tableau 03</i> : Comparaison $\delta$ ppm thiorique / $\delta$ ppm expérimentale.....	42
<i>Tableau 04</i> : Les références des souches microbiennes.....	44
<i>Tableau 05</i> : Les valeurs de diamètre des zones d'inhibition (mm) des produits aux souches bactériennes testées.....	46
<i>Tableau 06</i> : Les valeurs de diamètre des zones d'inhibition (mm) des produits aux levure et champignon.....	48
<i>Tableau 07</i> : Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches.....	49
<i>Tableau 08</i> : Variation des absorbances et du taux de piégeage du DPPH en fonction des différentes concentrations des produits et de l'étalon antioxydant.....	56
<i>Tableau 09</i> : Valeurs EC50 des produits A, B, C, D et standard Vit E antioxydante.....	58

# SOMMAIRE

Remerciements.....	i
Dédicaces .....	ii
ملخص.....	iii
Resume .....	iv
Abstract.....	v
Liste des abréviations .....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des Schémas .....	x
Liste des tableaux .....	xi
Introduction générale .....	1
Chapitre I : Mise au point bibliographique de la Curcumine	
I. 1 Curcuma longa L .....	03
I.1.1 Présentation .....	03
I. 1.2 Classification systématique .....	04
I. 2 La Curcumine .....	05
I.2.1 Propriétés chimiques .....	05
I.2.2 Propriétés biologiques .....	06
a- Activités anti-inflammatoires.....	06
b- Activités anti-oxydantes .....	06
c- Activités anti-cancérogènes .....	07
d- Activités antimicrobiennes .....	07
I.2.3 Relation structure-fonction .....	07
I.2.4 Synthèse de la curcumine .....	08
I.2.5 Caractérisation structurale de la Curcumine .....	11
I.2.5.1 Caractérisation par spectrophotométrie UV-Visible .....	11

I.2.5.2	Caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN)	11
I. 3	Classification des analogues de la Curcumine	13
I.3.1	Les analogues naturels de la curcumine	13
I.3.2	Les analogues synthétiques de la Curcumine	14
I. 4	Travaux antérieurs	15
I.4.1	Synthèse de nouveaux analogue de la Curcumine	15
I.4.2	Les analogues à la Dibenzylidèneacétone	17
I. 4.3	Synthèse de thiopyrimidine et thiazolopyrimidines	18
I. 4.4	Les Analogues de la Curcumine comme agents anti-prolifératifs potentiels	21
Chapitre II : Partie expérimentale		24
II. 1	Réactifs utilisés	24
II. 2	Techniques de caractérisation	24
II.2.1.	Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	24
II.2.2.	Caractérisation par Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)	25
II.2.3.	Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	25
II. 3	Synthèses des Analogues à la Curcumine	26
II.3.1	Synthèse de la DiBenzylidèneCyclohexanone ( DBC)	26
II.3.1.1	Mode opératoire	26
II.3.1.2	Mécanisme réactionnel	27
II.3.1.3	Description de la DiBenzylidèneCyclohexanone ( DBC)	27
II.3.2	Synthèse de la thiourée cyclique (DBC <sub>t</sub> )	28
II.3.2.1	Mode opératoire	28
II.3.2.2	Mécanisme réactionnel	29
II.3.2.3	Description de la DBC <sub>t</sub>	29
II. 3.2.4	Analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	30
II. 3.2.5	Spectre IR	30
II. 3.2.6	Spectre RMN <sup>1</sup> H	31
II. 3.3	Synthèse du méthylène actif DBC <sub>Cl</sub>	33
II.3.3.1	Mode opératoire	33
II.3.3.2	Mécanisme réactionnel	34



II.3.3.3 Description de la DBC <sub>cl</sub> .....	34
II. 3.3.4 Spectre IR.....	34
II. 3.3.5 Spectre RMN <sup>1</sup> H.....	35
II.3.4 Synthèse du sel thiazoluim ST .....	38
II.3. 4.1 Mode opératoire.....	38
II.3.4.2 Description du sel thiazoluim ST .....	38
II.3.4.1 Synthèse de la DBC <sub>sel</sub> .....	39
II.3.4.3.1 Mode opératoire.....	39
II.3.4.3.2 Mécanisme réactionnel .....	39
II.3.4.3.3 Description de la DBC <sub>sel</sub> .....	39
II.3. 4.3.4 Spectre IR.....	40
II. 3.4.3.5 Spectre RMN <sup>1</sup> H .....	40
Chapitre II : Etude des activités biologiques .....	43
II .4 .1 Etude du pouvoir antibactérien .....	43
II. 4.1.1 Matériels et méthodes.....	43
II. 4.1.2 Souches microbiennes choisies.....	44
II. 4.1.3 Protocole expérimental .....	45
II. 4.1.4 Milieu de culture .....	46
II. 4.1.5 Résultats et discussions .....	47
II.4. 2 Etude du pouvoir antioxydant .....	53
II. 4.2.1 Méthode de piégeage du radical libre DPPH.....	53
II. 4.2.2 Appareillage et réactifs.....	53
II. 4. 2.3 Mode opératoire .....	54
II. 4.2.4 Détermination du pouvoir antioxydant .....	55
II. 4.2.5 Résultats et discussions.....	56
II. 4.2.6 La détermination de la valeur EC50.....	57
II. 4.2.7 Comparaison entre les EC50.....	58
II. 4.2.8 Interprétation des résultats .....	59
Conclusion générale .....	61
Perspectives .....	61

# **INTRODUCTION**

## **GENERALE**

## Introduction générale

Dans le cadre de ce master option « Chimie des Substances Naturelles », nous nous sommes intéressés à la synthèse d'analogues de la curcumine qui est un composé majoritaire dans la curcumine naturelle. Les dérivés de la curcumine sont des molécules possédant de nombreuses propriétés biologiques et plus particulièrement un puissant pouvoir antioxydant. Leur utilisation est très prometteuse dans les différents domaines tels que l'agroalimentaire, cosmétique (crème solaire) et pharmaceutiques.

Des travaux antérieurs de certains auteurs ont porté sur la synthèse de dérivés de la pyrazoline analogues de la curcumine.

Notre objectif est de synthétiser des analogues de la curcumine d'intérêt biologiques comportant un groupe thiazolique. Les dérivés thiazoliques ont été largement décrits dans la littérature en raison des diverses applications que constitue cette classe de composé.

Des précurseurs à la curcumine tels que la dibenzylidénecyclohexanone(DBC), la thiourée cyclique(DBCT) et le méthylène actif(DBCcl) ont été synthétisés aisément et ont permis l'obtention d'un produit nouveau, analogue à la curcumine.

Nous comparerons par la suite les propriétés antibactériennes, antifongique et antioxydante du nouveau produit DBCsel avec ses précurseurs.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres :

- Chapitre I : synthèse bibliographique
- Chapitre II : Partie expérimentale
- Chapitre III : Etudes des activités biologiques
- Conclusion et perspectives.

# **Chapitre I**

***synthèse***

***bibliographique***

# Chapitre I

## Mise au point bibliographique de la curcumine

### I. 1. *Curcuma longa* L.

#### I. 1.1 Présentation

*Curcuma longa* (Figure 1), encore appelé *Turmeric* par les anglo-saxons, est une plante de la famille des *Zingiberaceae* qui pousse principalement dans les régions tropicales et subtropicales et dont la culture est très répandue en Chine et en Inde. La poudre de couleur jaune extraite de son rhizome est appelée turmeric, et est régulièrement utilisée, dans ces pays, comme épice ou colorant. Elle sert également en médecine traditionnelle [1]. La recherche de composants de cette poudre a révélé la présence d'une molécule majoritaire (50-60%) appelée curcumine et d'au moins deux autres molécules : la déméthoxy-curcumine et la bis-déméthoxy-curcumine.

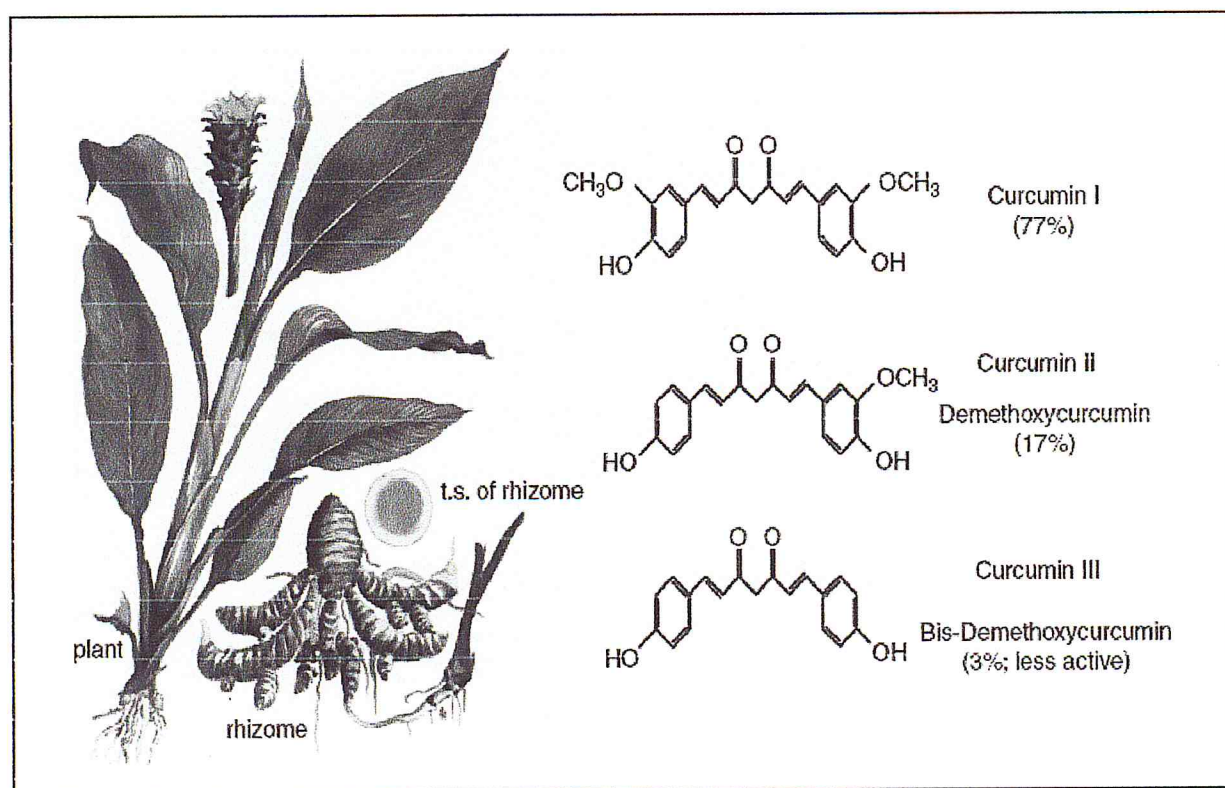


Figure 1 : *Curcuma longa* [15]

## I. 1. 2 Classification systématique

Selon la classification APG III le genre *Curcuma* a pour systématique :

- Classe** : Monocotylédone  
**Ordre** : Scitaminale ou Singibérale  
**Famille** : *Zingiberaceae*  
**Genre** : *Curcuma*

On dénombre près de 80 espèces dans ce genre [2]. Il regroupe de nombreuses espèces ornementales, tandis que d'autres se sont démarquées par l'utilisation de leur rhizome, aux propriétés culinaires et médicinales. Parmi ces espèces, *Curcuma longa* Linné est de loin le plus utilisé et par conséquent le plus étudié, mais on retrouve également le *Curcuma xanthorrhiza* Roxburgh dit *temoe lawak* et la *zédouaire*, décrite sous le nom de *Curcuma zedoaria* Roscoe ou *Curcuma zerumbet* Roxburgh (Figure 2) [3].

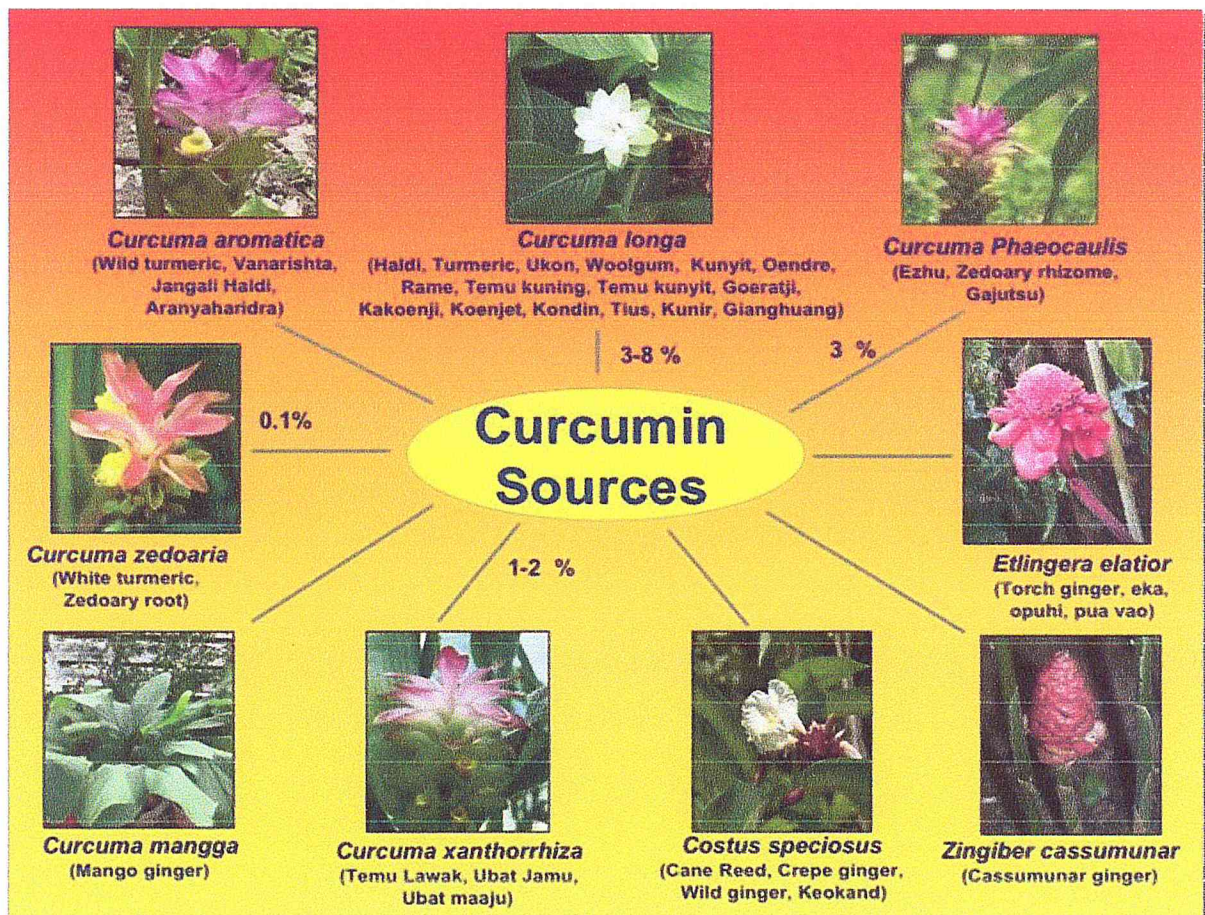


Figure 2 : Sources de curcumine [4]

L'extraction du rhizome à l'éthanol, à l'acétone ou au dichlorométhane donne 6 à 10% d'oléorésine, qui contient 35 à 45% de curcumine et de ses dérivés, la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine, connues sous le nom collectif de curcuminoïdes. Ces composés donnent au curcuma sa couleur jaune orangé si caractéristique, alors que l'huile essentielle lui confère son arôme et sa saveur typiques [5].

## I. 2 La curcumine

### I. 2.1 Propriétés chimiques

La curcumine a été isolée pour la première fois en 1815 et obtenue dans la forme cristalline en 1870 [6]. En 1910, le squelette féruloylméthane de la curcumine a été confirmé et synthétisé par Lampe [7].

La curcumine est une poudre jaune-orange qui est insoluble dans l'eau et l'éther mais soluble dans l'éthanol, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'acétone. La curcumine possède un point de fusion de 183°C, et un poids moléculaire de 368,37 g/mol. Le maximum d'absorption dans le méthanol en spectrophotométrie se situe à 430 nm et dans l'acétone à 415-420 nm [8].

La curcumine existe sous forme énolique et  $\beta$ -dicétonique (Figure 3). Le fait que la forme énolique prédomine en solution a un important rapport avec la capacité de la curcumine à capter les radicaux libres [9].

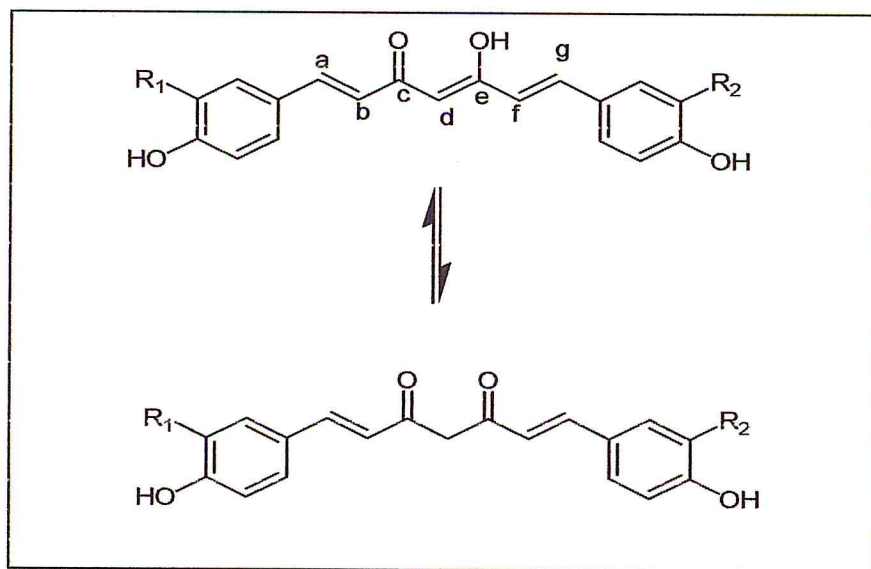


Figure 3 : Structure des conformations de la curcumine [10]

## I. 2.2 Propriétés biologiques

### a. Activités anti-inflammatoires

En médecine traditionnelle, la curcumine peut être utilisée pour le traitement des otites chroniques, contre des manifestations allergiques [11], des manifestations inflammatoires [12], ou encore en tant que cicatrisant. Le sel de sodium de la curcumine est encore plus efficace comme anti-inflammatoire [13]. Parmi les trois composés issus de la plante, la déméthoxycurcumine paraît être le composé le plus actif.

La curcumine provoque l'inhibition de la migration et de la prolifération des cellules pro-inflammatoires [14] et inhibe la lipoxigénase et la cyclooxygénase, deux enzymes impliquées dans la dégradation de l'acide arachidonique en médiateurs de l'inflammation tels les leucotriènes et les prostaglandines. Elle empêche l'activation des macrophages et donc le relargage de substances cytotoxiques ou de médiateurs de l'inflammation tels  $O^2$ .

### b. Activités antioxydantes

Les radicaux libres sont impliqués, en tant que médiateurs dans la progression de nombreuses maladies chroniques et dans le vieillissement des cellules en général. Les radicaux sont des espèces réactives vis-à-vis des constituants organiques et des structures cellulaires.

La curcumine a été testée dans différents modèles de peroxydation des lipides membranaires. Elle inhibe la lipoperoxydation dans des hépatocytes de rat traités au paracétamol et dans des microsomes de rats ayant subi un stress oxydatif généré par radiation gamma ou un excès d'ions de  $Fe^{+2}$ . L'inhibition de la lipoperoxydation par la curcumine pourrait être due en partie à capacité à maintenir l'activité des enzymes anti-oxydants.

Venkateswarlu et ses collaborateurs [32] ont comparé le pouvoir antioxydant de  $C_1$ ,  $C_2$  et  $C_3$  (Figure 4) avec leurs dérivés hydrogénés, la tétrahydrocurcumine et ainsi mis en évidence que la tétrahydrocurcumine est la molécule la plus antioxydante. Les tétrahydrocurcumines sont classés comme bioprotecteurs. Ils agissent à deux niveaux sur les radicaux libres : sur la phase d'initiation en piégeant les amorces radicalaires et sur la phase de propagation des réactions radicalaires en offrant d'autres possibilités de réactions aux intermédiaires radicalaires. La curcumine ( $C_1$ ), 1,7-bis (4-hydroxy- méthoxyphényl)-1,6-heptadiène-3,5-dione, la déméthoxycurcumine ( $C_2$ ) et la bisdéméthoxycurcumine ( $C_3$ ), de structure voisine, comme le montre la Figure 4.



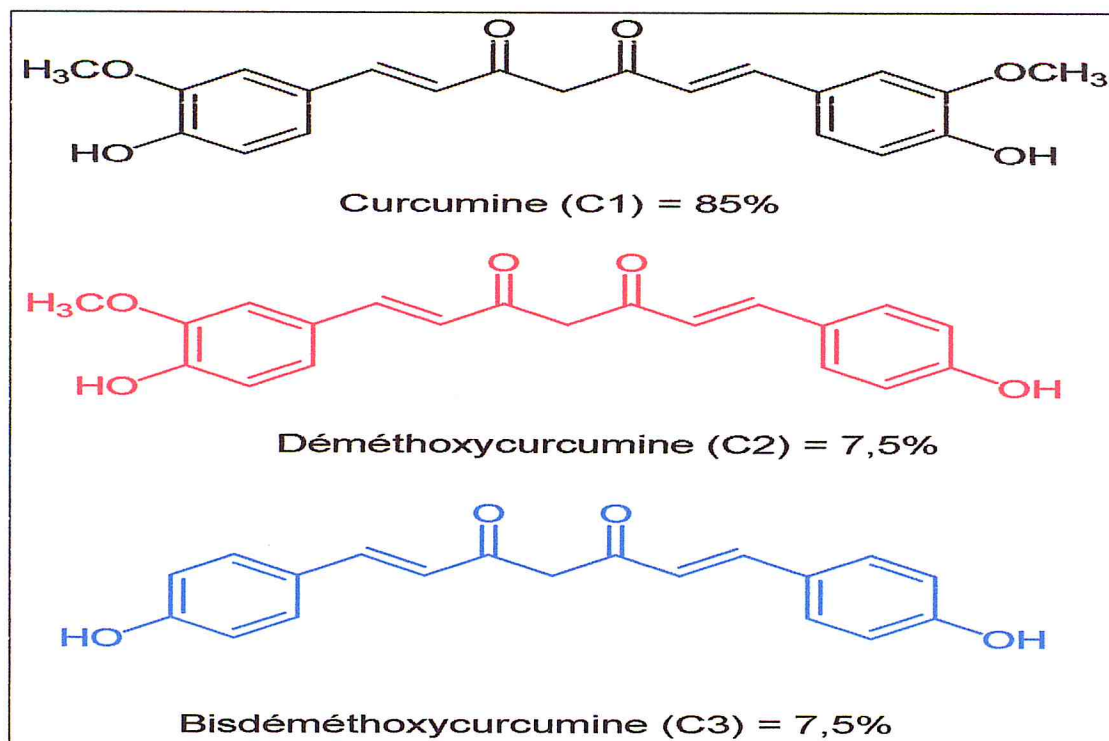


Figure 4 : Les curcuminoïdes naturels isolés de *Curcuma longa L*

### c. Anti-cancérigène et inhibiteur HIV

La curcumine semblerait assurer une activité chimio-protectrice vis-à-vis du cancer, particulièrement celui du colon. Elle doit cependant être administrée à une concentration élevée pour la réduction des tumeurs, plusieurs centaines de mg par kg de masse corporelle [16].

Plusieurs autres activités pharmacologiques ont été décrites :

- Inhibition des protéases des virus HIV-1 et HIV-2 -[17]
- Inhibition de l'oxyde d'azote (NO) pour le traitement du syndrome d'Oketsu : syndrome de stagnation du sang avec détérioration des molécules d'hémoglobine souvent accompagné de désordres cérébro-vasculaires[33]. Récemment, la curcumine apparaît aussi comme un traitement prometteur pour lutter contre la mucoviscidose ou encore la maladie d'Alzheimer [34].

### d. Activités antimicrobiennes

Le curcuma possède également des propriétés antimicrobiennes, antifongiques et antiparasitaires [35].

### I. 2.3 Relation structure-Activité

La curcumine est un composé symétrique qui possède deux motifs ferruliques et une fonction B-dicéto. De nombreuses études [19] ont été menées pour déterminer l'implication des différentes fonctions chimiques de la curcumine dans ses propriétés anti-oxydantes mais les résultats différents selon les équipes. L'activité anti-oxydante de la curcumine provient de sa capacité à réduire un radical en anion. Certains auteurs proposent que cette réaction entraîne, au niveau de la curcumine, la perte d'un atome d'hydrogène du groupe CH<sub>2</sub> placé entre les deux fonctions cétones générant le radical central alors que d'autres suggèrent que c'est la fonction phénol qui est impliquée, ce qui induit la formation du radical phénolique. En raison de la délocalisation de l'électron, les deux radicaux de la curcumine sont plus stables et moins toxiques que le radical initial (HO', O<sub>2</sub>, ROO', etc .....).

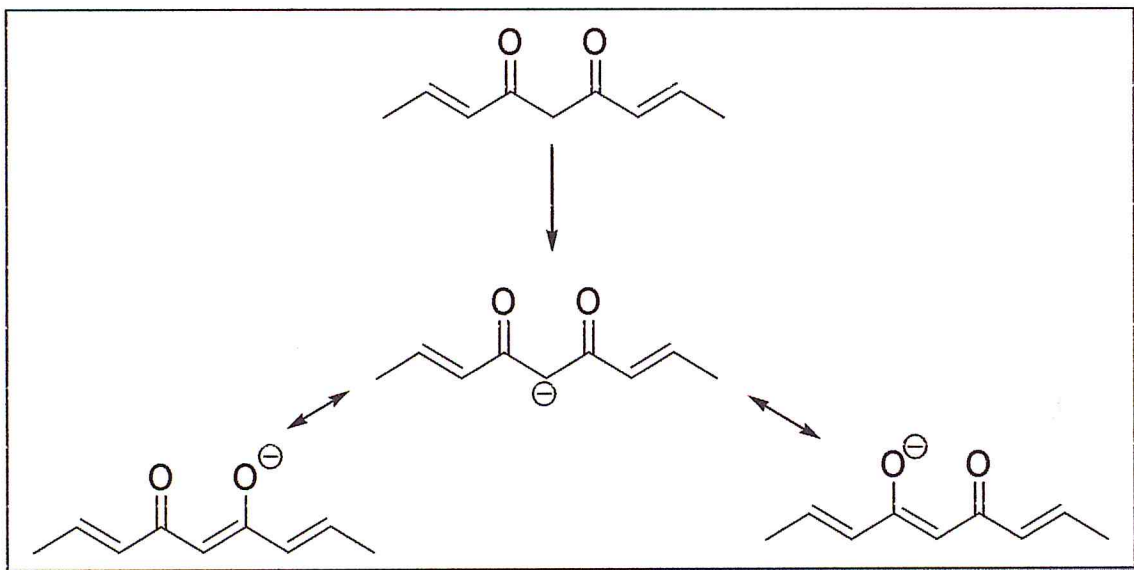


Figure 5 : Formes mésomères du radical central

### I. 2.4 Synthèse de la curcumine

Le produit dénommé "curcumine" vendu sur le marché est un mélange des trois curcuminoïdes naturels (C<sub>1</sub>), (C<sub>2</sub>) et (C<sub>3</sub>) (Figure 6). Cependant, la curcumine (C<sub>1</sub>) peut être obtenue pure par synthèse.

La première synthèse historique a été effectuée en 1918 par Lampe [36]. Puis l'équipe de Pavollini l'a réalisée par chauffage d'un mélange de vanilline, d'acétylacétone et d'anhydride borique selon le rapport : 2/1/2 [37]. Ce procédé a été considérablement amélioré ultérieurement par Pabon en 1964 [38], puis plus récemment par Krackov et Bellis en 1997 [39] (Schéma 1).

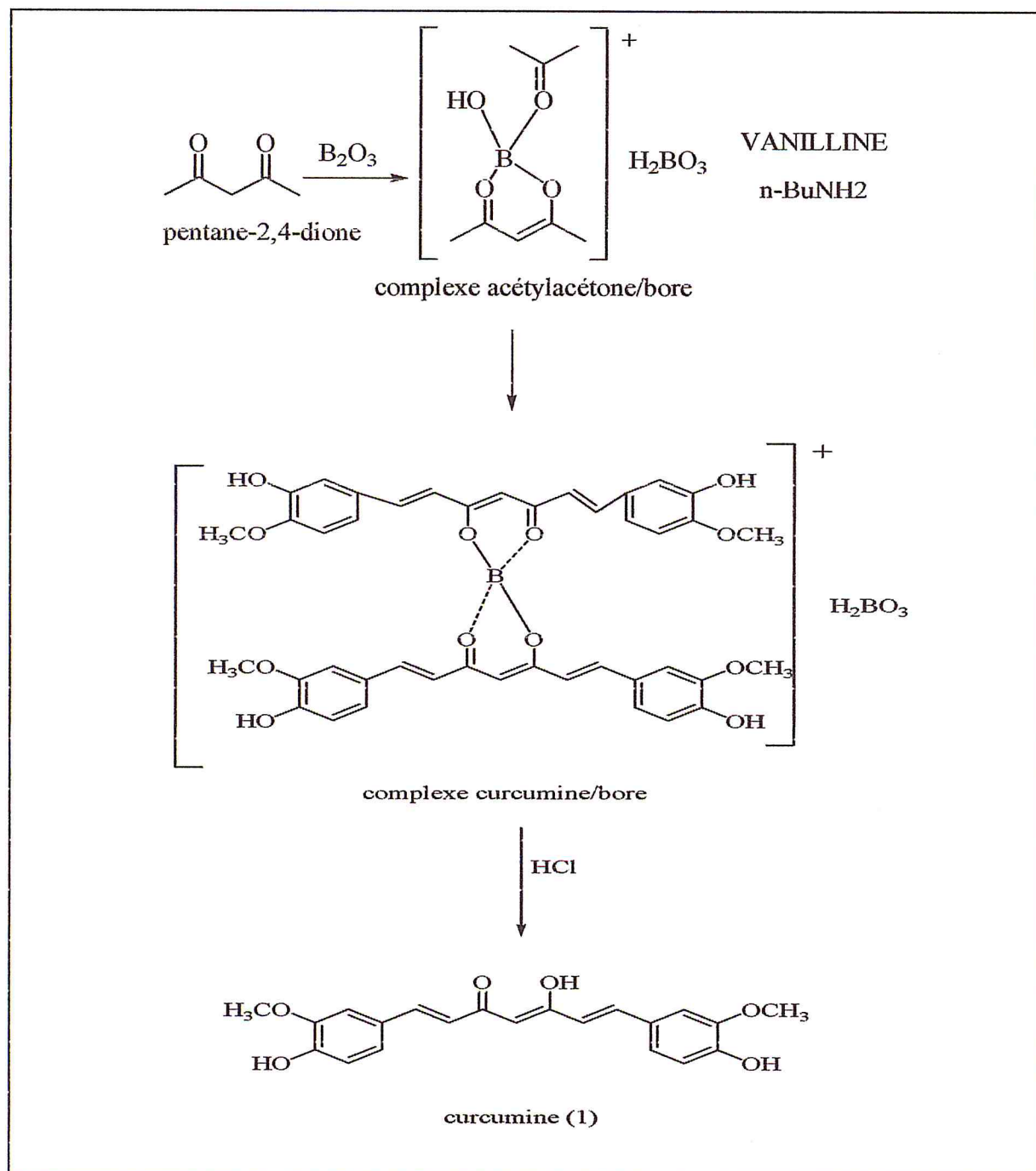
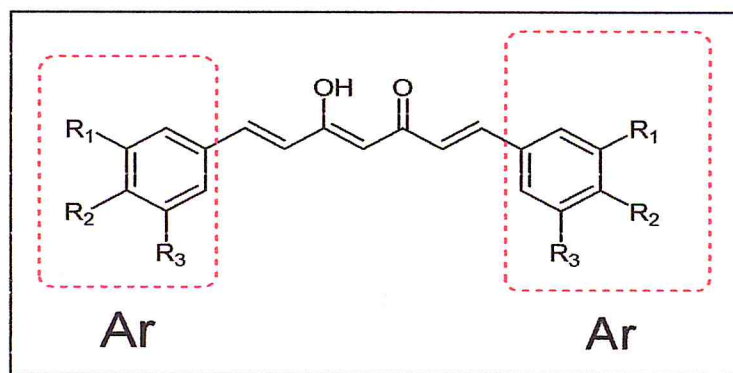


Schéma 1 : Synthèse de la curcumine [20]

Trois étapes principales caractérisent cette synthèse :

1. Protection du groupe méthylène par réaction entre l'acétylacétone et l'anhydride borique conduisant à un complexe acétylacétone/bore.
2. Réaction du groupe méthyle terminal sur le carbonyle de la vanilline pour donner un complexe curcumine/bore.
3. Décomposition du complexe précédent par hydrolyse acide conduisant à la curcumine.  
D'après Krackov, l'emploi d'acide était préférable à celui d'une base étant donnée l'instabilité de la curcumine en milieu basique.

La synthèse des curcuminoïdes symétriques est identique à celle décrite précédemment pour la curcumine, mais la vanilline est remplacée par l'aldéhyde correspondant ( $\text{Ar-CHO}$ ). La structure générale des curcuminoïdes est donnée dans la figure 7.



**Figure 6 :** Structure générale des curcuminoïdes

▪ **La méthode générale de synthèse des curcuminoïdes dissymétriques [39]**

La réaction est réalisée en deux étapes : dans un solvant polaire et aprotique, on fait réagir  $\text{B}_2\text{O}_3$  avec la pentane-2,4-dione afin d'obtenir le complexe énolique. L'aldéhyde aromatique  $\text{Ar}_1\text{CHO}$  est condensé dans un rapport stoechiométrique 1/1, en présence d'un catalyseur (amine primaire ou secondaire) de façon à réaliser une condensation aldolique de l'aldéhyde avec un seul des carbones terminaux en alpha de l'énol du dicétone complexé (réaction de Knoevenagel). L'hydrolyse acide permet d'isoler le dicétone intermédiaire. Dans une seconde étape, l'aldéhyde  $\text{Ar}_2\text{CHO}$  est condensé au complexe borique du dicétone précédent. L'hydrolyse acide permet de récupérer le curcuminoïde dissymétrique attendu. Il reste finalement à purifier le produit obtenu pour l'isoler.

## I. 2.5 Caractérisation structurale

### I. 2.5.1 Caractérisation par spectrophotométrie UV-Visible

Le spectre UV-visible d'une solution de curcumine dans l'alcool éthylique montre une absorption forte de 320 à 500 nm. En présence de base, cette bande est déplacée jusqu'à 640 nm [40]. Dans le méthanol, le coefficient d'absorption molaire ( $\epsilon$ ) est égal à 4,8.10<sup>4</sup> L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pour  $\lambda_{\max}$  = 428 nm.

Les variations de  $\lambda_{\max}$  et de  $\epsilon$  sont dues à l'aptitude de la curcumine à former des liaisons hydrogène inter- ou intramoléculaires, en fonction du solvant [41].

### I. 2.5.2 Caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Des études ont montré que la curcumine n'existe que sous forme énolique dans le méthanol deutérié et le chloroforme deutérié [42].

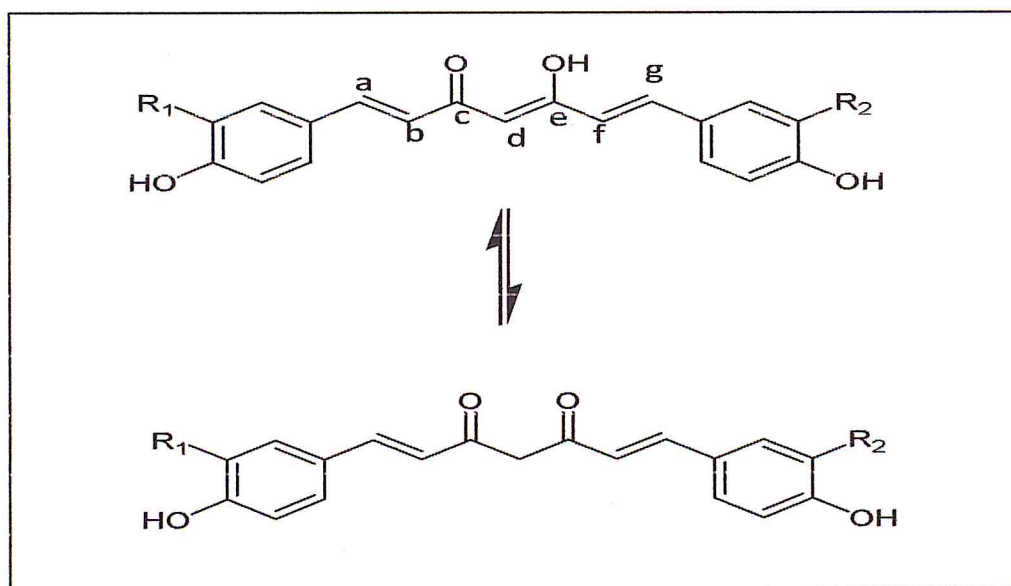
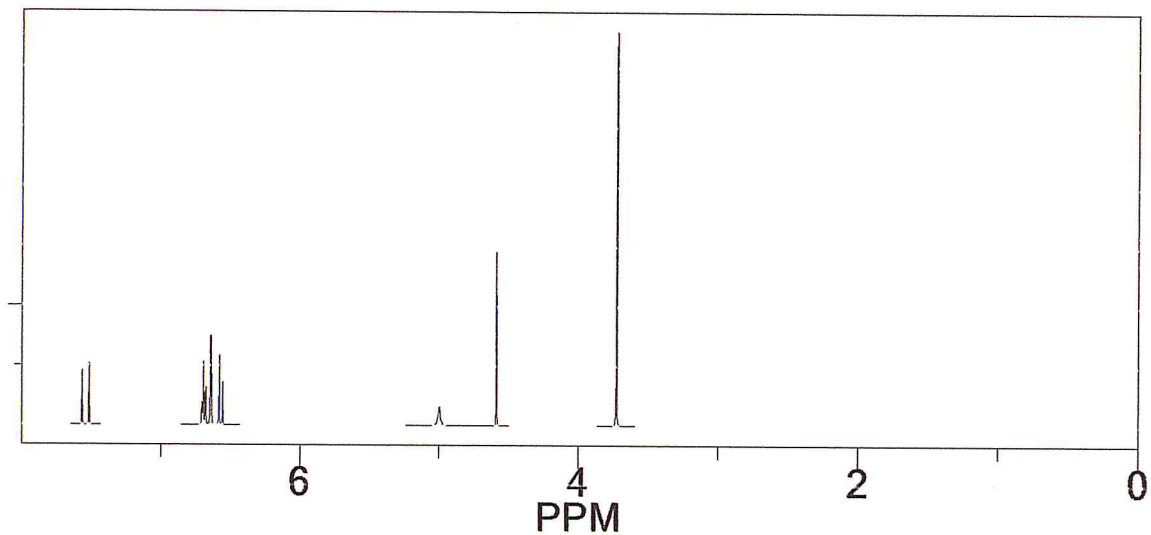
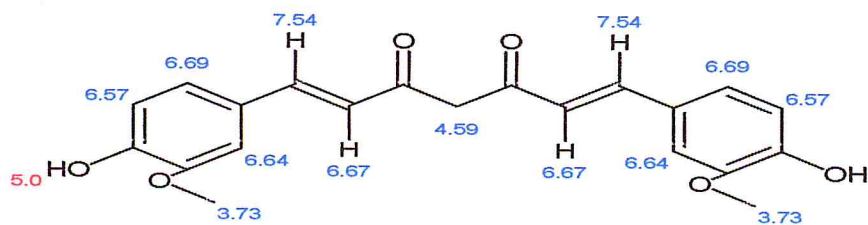


Figure 7 : *Equilibre cétone-énolique*

Les valeurs des constantes de couplage ( $J_{ab}$  et  $J_{fg}$ ) sont caractéristiques de doubles liaisons "trans" :  $J = 13-15$  Hz dans  $CDCl_3$  [43] et  $J = 16$  Hz dans  $CD_3OD$  [44].

La figure 8 montre les spectres théoriques du proton et du carbone 13 de la curcumine réalisés à l'aide du logiciel « ChemDraw »

### RMN <sup>1</sup>H



### RMN <sup>13</sup>C

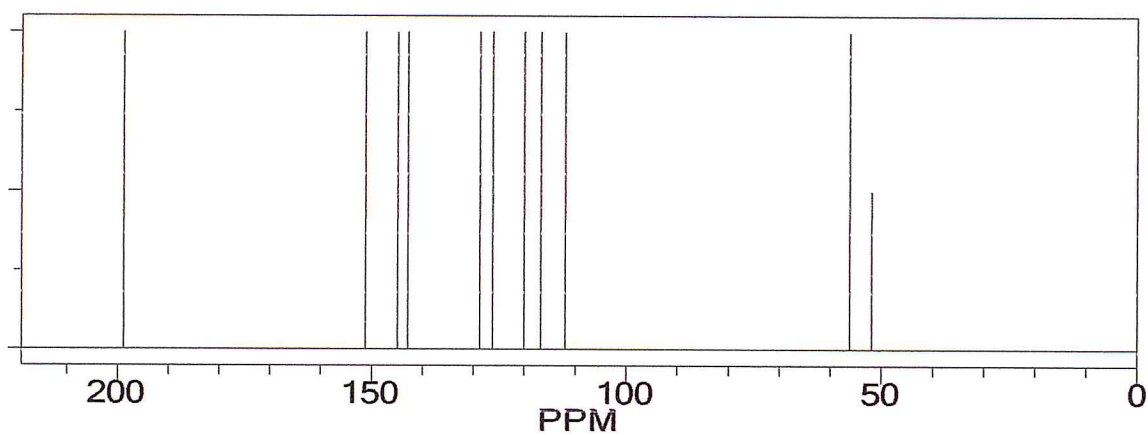
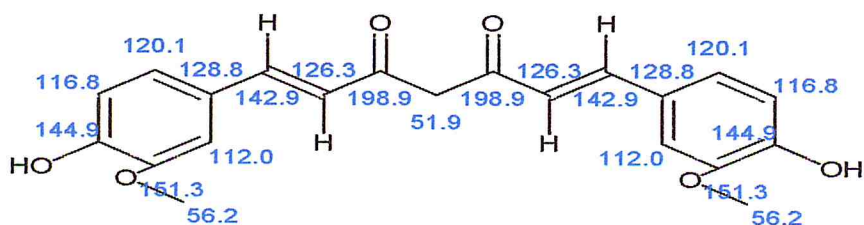


Figure 8 : Simulation des spectres RMN<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C par le Chem Draw de la curcumine

## I. 3 Classification des analogues de la curcumine

### I. 3.1 Les analogues naturels de la curcumine

Plusieurs analogues de la curcumine ont été identifiés à partir d'autres plantes. Sont inclus les 6- et 8-gingérol, le 6-paradol la cassumunine, les galangals, les diarylheptanoïdes, les yakuchinones, l'isoeugénol et le dibenzoylméthane.

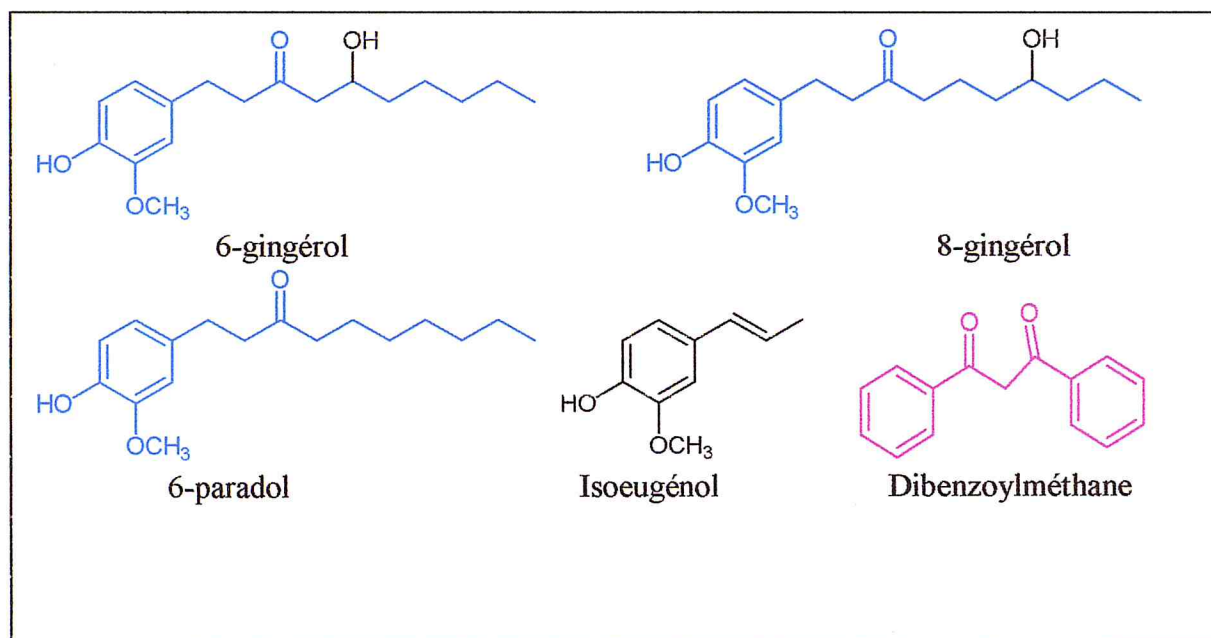


Figure 9 : Analogues naturels de la curcumine

Bien que ces analogues manifestent des activités similaires à la curcumine, il n'a pas été établi s'ils sont plus ou moins puissants que la curcumine. Les yakuchinones sont des inhibiteurs plus puissants de la production de l'acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque (5-HETE) que la curcumine.

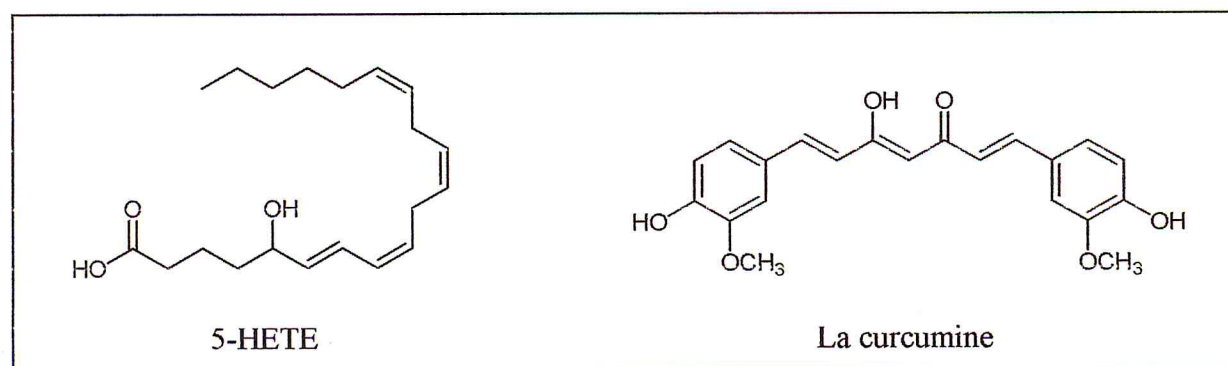
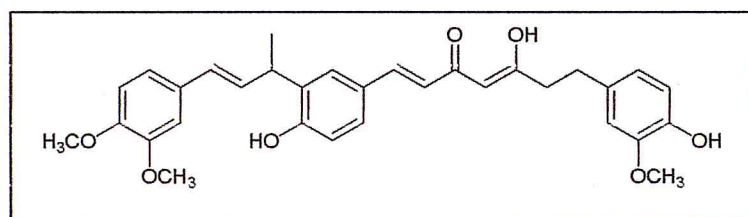


Figure 10 : Autres Analogues naturels de la curcumine

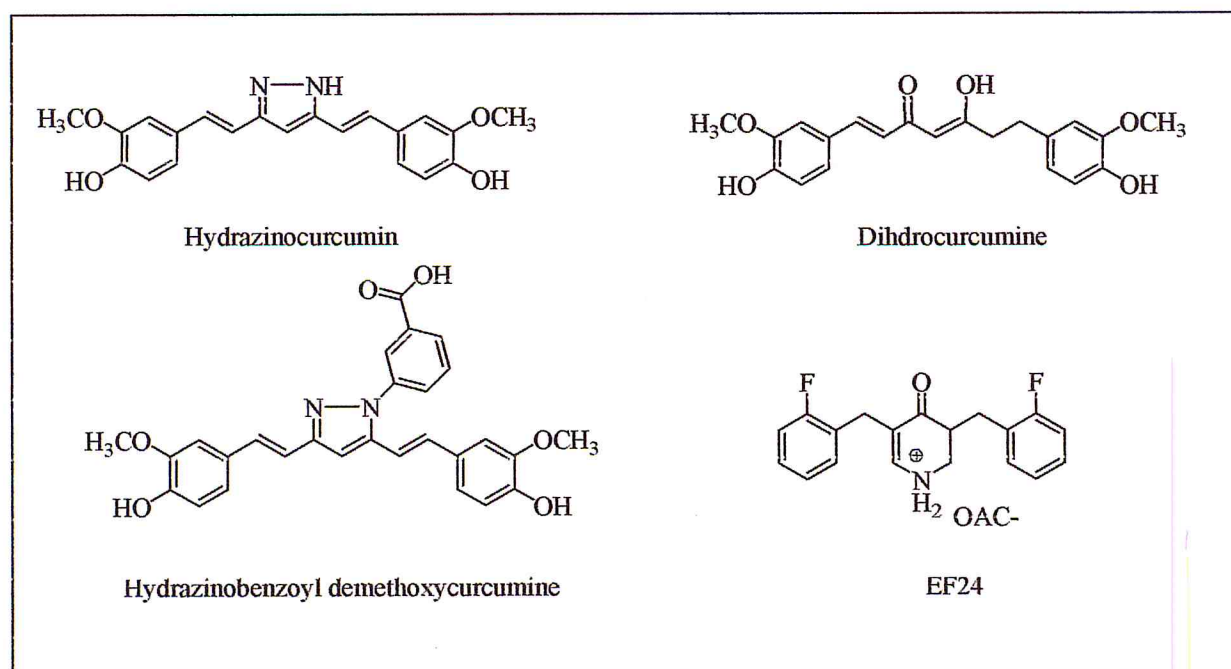
Les cassumunines synthétiques montrent une plus forte activité protectrice contre la mort cellulaire oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène. Le garcinol est plus puissant que la curcumine pour inhiber les cellules tumorales. Le potentiel anti-cancer des galangals est comparable à celui de la curcumine. Enfin, la curcumine est plus cytotoxique que l'isoeugénol, le bis-eugénol et l'eugénol [18].



**Figure 11 : La cassumunine**

### I. 3.2 Les analogues synthétiques de la curcumine

A côté de la curcumine plusieurs analogues ont été synthétisés et testés. La tétrahydrocurcumine une substance antioxydante, qui est une dérivée de la curcumine par hydrogénation, possède un effet protecteur sur le stress oxydatif chez les lapins recevant un régime riche en cholestérol.



**Figure 12 : Les analogues synthétiques de la curcumine**



## I. 4 Travaux antérieurs

### I.4.1 Synthèse d'analogue de la curcumine par la réaction de condensation Claisen-Schmidt

Une série d'analogues à la curcumine a été obtenue par N. Ziani et ses collaborateurs [45], selon la réaction de condensation Claisen-Schmidt de benzaldéhydes substitués avec des dérivés cyclohexanone en présence d'hydroxyde de sodium à la température ambiante.

#### ▪ Protocole opératoire

Un mélange d'aldéhyde aromatique (20 mmol, 2 éq.) et de dérivé de cyclohexanone approprié (10 mmol, 1 éq.) ont été dissous dans 15 mL d'éthanol. Le mélange a été agité pendant quelques minutes à 0 ° C (bain de glace sale). 10 mL d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 40% a été ensuite ajoutée goutte à goutte. Le mélange est ensuite laissé sous agitation à température ambiante pendant environ 4 h. Le solide a été séparé et lavé avec de l'eau froide et séché. Le produit, ainsi obtenu, a été cristallisé dans l'éthanol pour obtenir les produits purs 3a et 6a-c (Schéma 2).

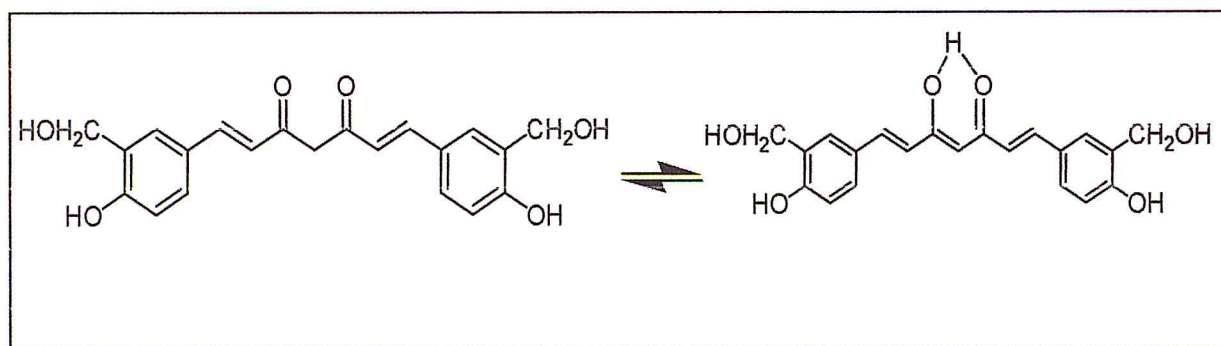
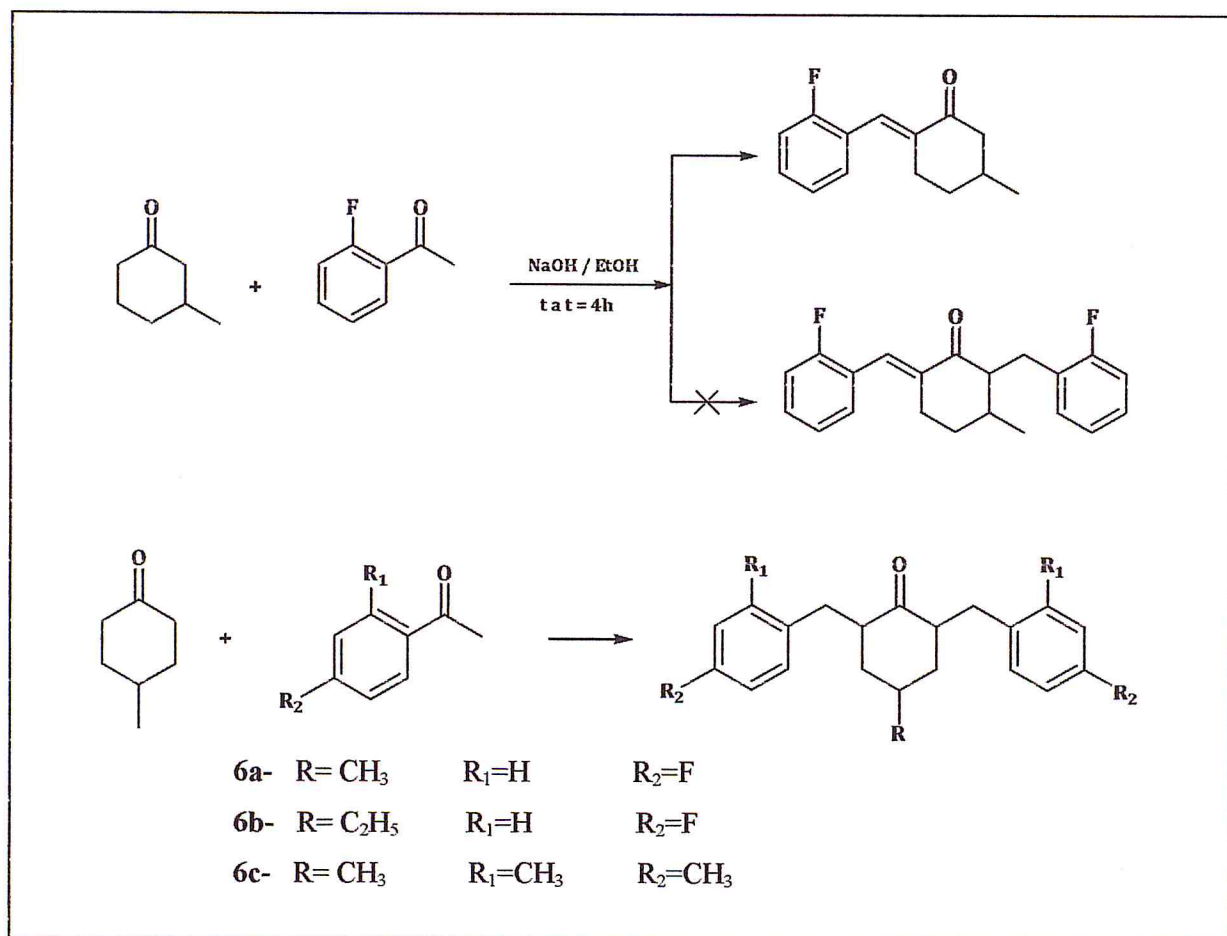


Schéma 2 : La tautomérie céto-énolique de la curcumine



### ▪ Caractérisation

Les analogues à la curcumine synthétisés ont été caractérisés par leur point de fusion, l'infrarouge et la RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C. Leurs spectres IR ont montré une forte bande pour le carbonyle conjugué à (1678-1600 cm<sup>-1</sup>) [20], et une bande à (1610-1508 cm<sup>-1</sup>) pour le groupe C = C. Dans les spectres de RMN <sup>1</sup>H de nouveau α, β-insaturé cétones, le proton oléfinique ont donné un signal de singulet à (7,89 à 7,46 ppm), <sup>13</sup>C RMN déplacements chimiques du C = O groupe ont été affectés à (190,2 à 189,6ppm).

### ▪ Conclusion

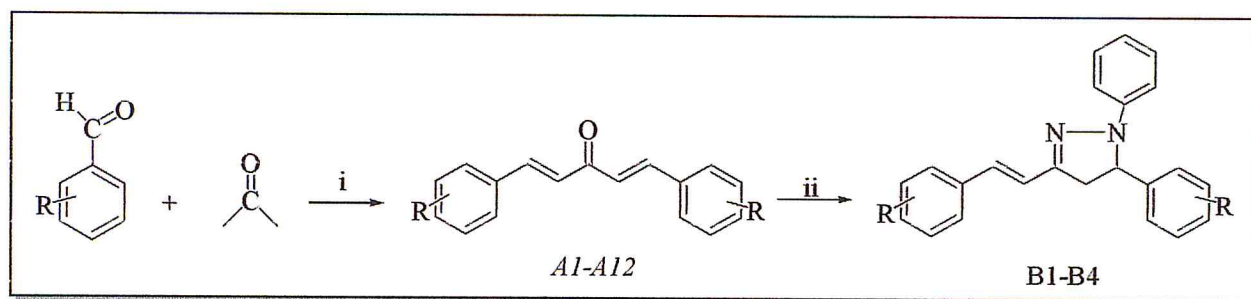
En raison de l'importance des analogues à la curcumine, leur large éventail d'activités biologiques, et leurs applications en synthèse de pyrazolines, une série de nouveaux analogues à la curcumine a été synthétisé. Ces composés peuvent être des précurseurs pour préparer une série de dérivés de la pyrazoline.

## I.4.2 Synthèse de DiBenzylideneAcetone

Une série de dibenzylideneacetones ( $A_1$ - $A_{12}$ ) et certains de leurs dérivés pyrazolines ( $B_1$ - $B_4$ ) ont été synthétisés et évalués *in vitro* par le groupe de R. Balasaheb Aher [46].

### ▪ Principe

Les composés  $A_1$ - $A_{12}$  ont été préparés à partir de benzaldéhydes substitués et de l'acétone, par une réaction d'aldolisation catalysée par une base (Schéma 3). En outre, certains des dérivés de dibenzylidèneacétone ont été convertis à l'aide d'un procédé pyrazoline. Les méthodes de synthèses utilisées ont été choisies en fonction de leurs procédures simples avec de meilleurs rendements de produits ainsi que leur rentabilité.



**Schéma 3 :** Synthèse de dibenzylideneacetones ( $A_1$ - $A_{12}$ ) et leurs dérivés de pyrazoline ( $B_1$ - $B_4$ ).

Réactifs et conditions : (i) 10% de NaOH, EtOH,  $H_2O$ , (ii) Phénylhydrazine,  $CH_3COOH$ , 8 h à reflux.

### ▪ Purification et caractérisation

La pureté et la structure de tous les composés synthétisés ont été confirmées par chromatographie sur couche mince (CCM), et par des techniques spectroscopiques.

L'ensemble des spectres infrarouges de dibenzylideneacetones montrent des bandes d'absorption caractéristiques des  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturés cétones ( $1650$ - $1680\text{ cm}^{-1}$ ) et de ( $970$  à  $990\text{ cm}^{-1}$ ) caractéristiques du noyau aromatiques en position trans.

Les bandes d'absorption caractéristiques de tous les pyrazolines ( $B_1$ -  $B_4$ ) sont dues à des fonctions  $C = N$  et  $C - N$ , correspondent respectivement à des régions de ( $1590$ - $1600$ ) et ( $1310$  - $1330$ )  $\text{cm}^{-1}$ . L'absence d'une bande d'absorption à ( $1650$ - $1680\text{ cm}^{-1}$ ) des  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturés cétones et de la bande caractéristique de N-H dans les composés de pyrazoline ( $B_1$ - $B_4$ ) confirme la cyclisation du noyau pyrazoline.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  de tous les dérivés ont présenté un multiplet caractéristique des protons aromatiques et des deux protons  $\text{CH}=\text{CH}$  à 6,49 à 8,05 ppm. Les constantes de couplage ( $J = 16 \text{ Hz}$ ) pour les deux protons liés à des doubles liaisons confirment la stéréochimie des composés synthétisés en tant que forme E (trans).

Les spectres de masse des composés synthétisés ont présenté des ions moléculaires qui ont confirmé leur poids moléculaire.

#### ▪ **Activité biologique**

Les composés synthétisés ont été testés pour l'activité antipaludique in vitro contre la souche **3D7** sensible à la chloroquine, et la chloroquine résistante **RKL9** isolé de *P. falciparum* en utilisant la fluorescence SYBR-vert-I. Le diphosphate de chloroquine et l'artémisinine ont été utilisés comme contrôles positifs.

#### ▪ **Conclusion**

Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé que les composés synthétisés présentaient des activités antiplasmodiales prometteuses qui peuvent encore être explorées comme des agents potentiels pour le développement de médicaments, sûrs, efficaces et puissants, moins chers, contre les parasites du paludisme résistant à la chloroquine.

### **1.4.3 Synthèse de thiopyrimidine et thiazolopyrimidine**

U. W. Hawas et ses collaborateurs [47], ont synthétisé une série de nouveaux arylidène N-substitué, pyrazole, thioxopyrimidine et des dérivés de thiazolopyrimidine 2-7, par des réactions à partir de 2-méthyl cyclohexanone avec des aldéhydes aromatiques pour donner le 2,6-dibenzylidène-3-méthylcyclohexanone 2.

#### ▪ **Principe**

Une réaction de la 3-méthylcyclohexanone 1 avec des aldéhydes aromatiques, à savoir, le 3,4-diméthoxy-, 3,4,5-triméthoxy-, le p-chloro-, p-fluoro-, ou p-N,N-diméthylamino benzaldéhyde dans de l'hydroxyde de potassium éthanolique a donné les dérivés bis-aryl méthylène 2a-e correspondant respectivement.

Les dérivés de thioxopyrimidine 5a-d ont été obtenus à partir de la réaction des dérivés de l'arylméthylène 2a-d avec chauffage au reflux de la thiourée dans de l'hydroxyde de potassium éthanolique.

La condensation des composés 2a, b avec l'hydrate d'hydrazine dans de l'acide acétique glacial ou avec un groupe phényle hydrazine dans l'éthanol absolu en présence de triéthylamine comme catalyseur a donné les dérivés de pyrazole correspondants 3a, b et 4a, b, respectivement (Schéma 4)

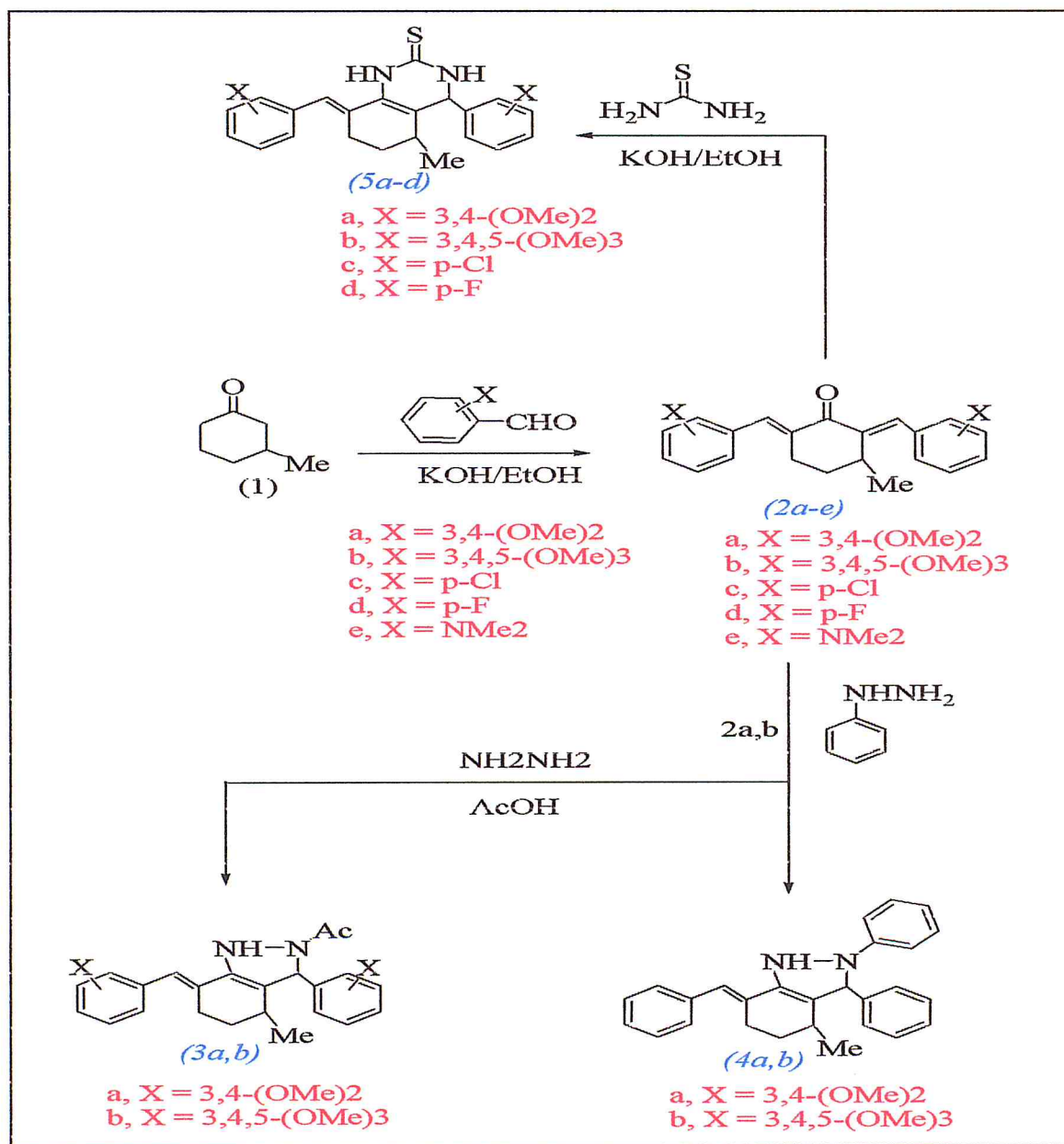
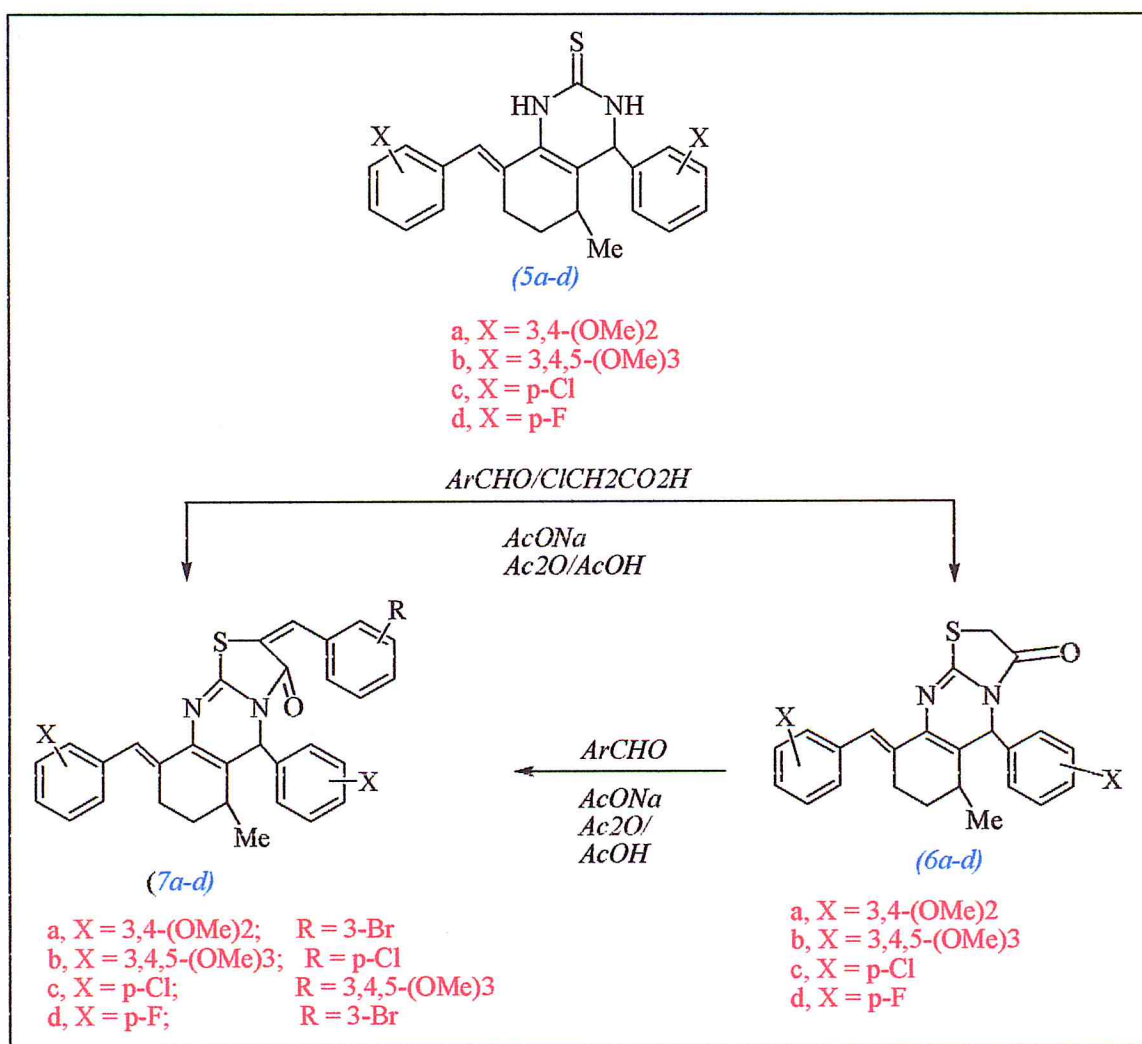


Schéma 4 : Voies de synthèse des composés 2-5

Les thioxopyrimidines **5a-d** ont été condensé avec de l'acide chloroacétique dans un mélange d'acide acétique / anhydride acétique en présence d'acétate de sodium anhydre pour obtenir les thiazolopyrimidines **6a-d**. Ces derniers ont réagi avec des aldéhydes aromatiques correspondants, à savoir, le 3-bromo- ou p-chloro- ou 3,4,5-triméthoxy ou le 3-bromobenzaldéhyde en présence d'acétate de sodium anhydre et de l'acide acétique / anhydride acétique glacial pour donner respectivement les dérivés de l'arylméthylène thiazolopyrimidine **7a-d**. Toutefois, ces derniers composés ont été également préparés directement à partir de **5a-d** par l'action de l'acide chloroacétique et des aldéhydes aromatiques, par mode « one pot » en présence d'un acide acétique / anhydride acétique (Schéma 5).



**Schéma 5:** Voies de synthèses des composés 6 a-d et 7 a-d

#### ▪ Purification et caractérisation

Le suivi des réactions et la vérification de la pureté des composés ont été faits par chromatographie sur couche mince. La caractérisation structurale a été réalisée grâce aux techniques spectroscopiques : infrarouge, spectroscopie de masse et résonance magnétique nucléaire.

#### ▪ Activité biologique

Un criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des composés synthétisés a été effectuée contre des micro-organismes représentant des bactéries Gram-positif (*Bacillus subtilis*, *Bacillus aureus* et *Staphylococcus aureus*), des bactéries Gram-négatif (*Escherichia coli*), une levure (*Candida albicans*) et un champignon (*Aspergillus Niger*), en utilisant la technique de la bio-essai d'antibiotiques spécifiée dans la pharmacopée des États-Unis à 50 µg / ml. Ce criblage a révélé que les composés les plus actifs contre *Bacillus subtilis* sont 3b, 4b, 5c, 6a, 7a et 7d, 2e, 3a, 4a, 5b, 6c, et le composé 7b contre *Bacillus aureus*, et les composés 2b, 2e, 4b, 5d, 6d et 7c contre *Staphylococcus aureus*, et les composés 2d, 3b, 6b et 7b contre *Escherichia coli* et les composés 2c, 3a, 6a, 7a et 7c contre *Candida albicans*, et enfin les composés 2c, 4a, 5a, 5d, 6c et 7b contre *Aspergillus Niger*. L'ampicilline et le chloramphénicol ont été utilisés comme étalons.

#### **I.4.4 Synthèse d'analogues de la curcumine en tant qu'agents antiprolifératives et anti-inflammatoires**

Une série de nouveaux analogues à la curcumine a été conçue, synthétisée et testée in vitro / vivo comme agents potentiels multi-cibles par A.-M. Katsori et ses collaborateurs [48]. Ces analogues ont été synthétisés et testés en tant que potentiels agents multi-cibles. Leurs activités anti-prolifératives et anti-inflammatoires ont été étudiées. Les tests ont révélé que les composés 1b et 2b sont des inhibiteurs plus puissants vis-à-vis de la lipoxigénase de Soja que la curcumine. Les composés 1a, 1b, 1d et 2b ont montré une forte inhibition par rapport à la curcumine, contre les trois lignées cellulaires du cancer.

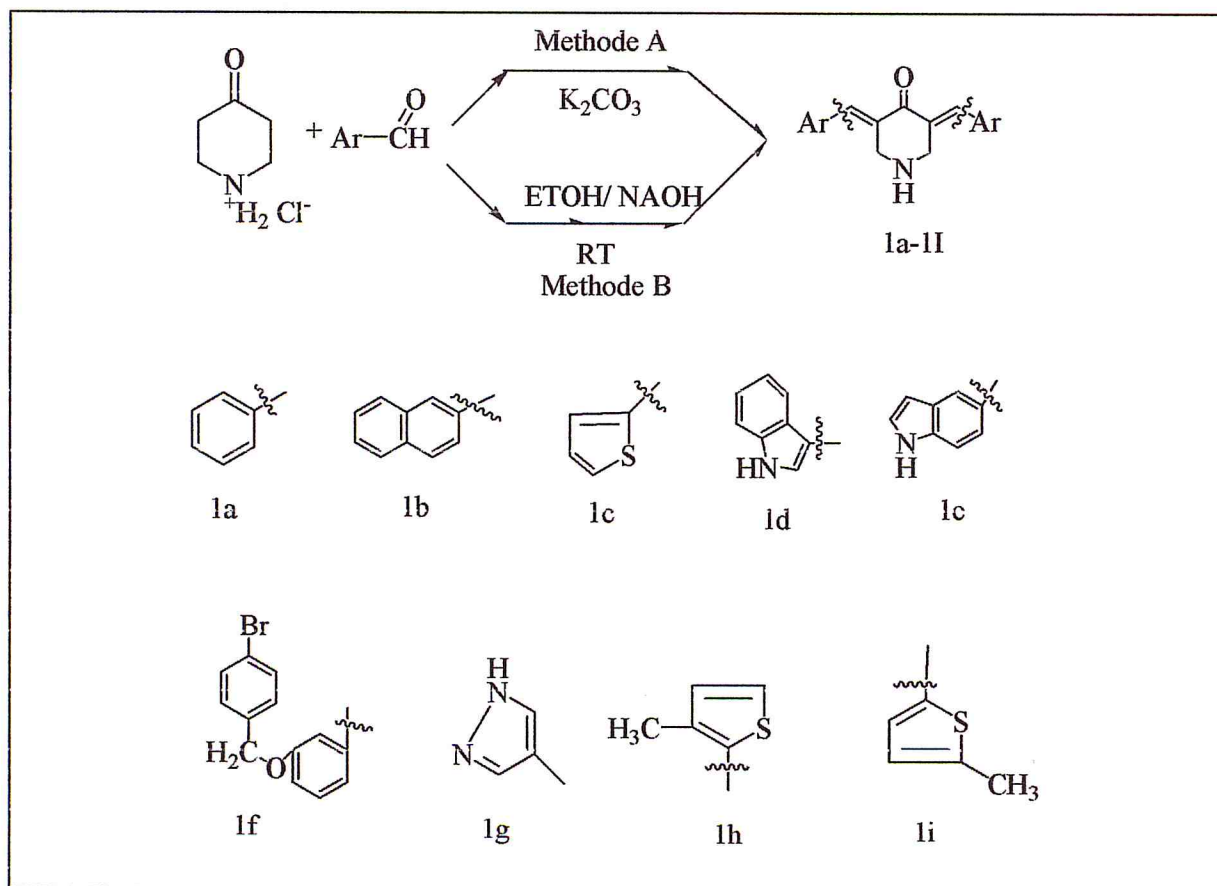
▪ **Principe**

Deux différentes méthodes synthétiques ont été utilisées dans de la synthèse des analogues à la curcumine :

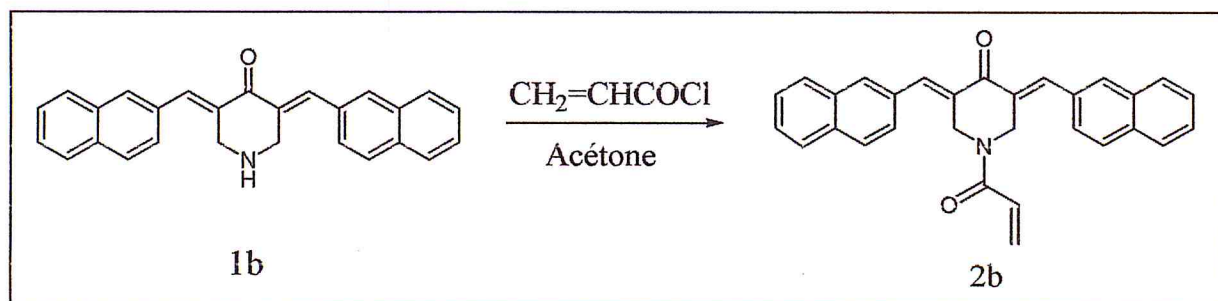
**Méthode A:** Dans cette méthode une condensation selon Claisene Schmidt a été utilisée, entre le 4 -pipéridine monohydraté et l'aldéhyde approprié, à un rapport molaire de 1/2, dans de l'acide acétique par passage.

**Méthode B:** une condensation d'aldol utilisée.

Les deux méthodes ont été appliquées pour la synthèse des composés 1a, 1c, 1d, 1h et 1i.



**Schéma 6 :** Les méthodes générales utilisées pour la synthèse des analogues à la curcumine 1a-1i



**Schéma 7:** Synthèse de la N-acryloyl



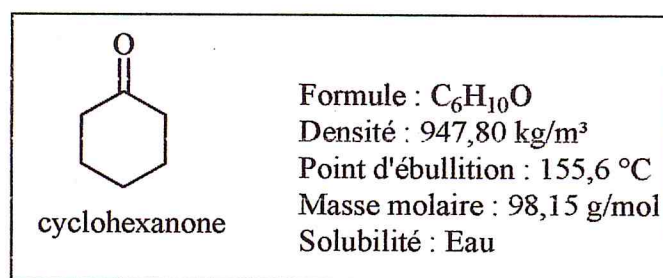
# **Chapitre II**

## ***Etude expérimentale***

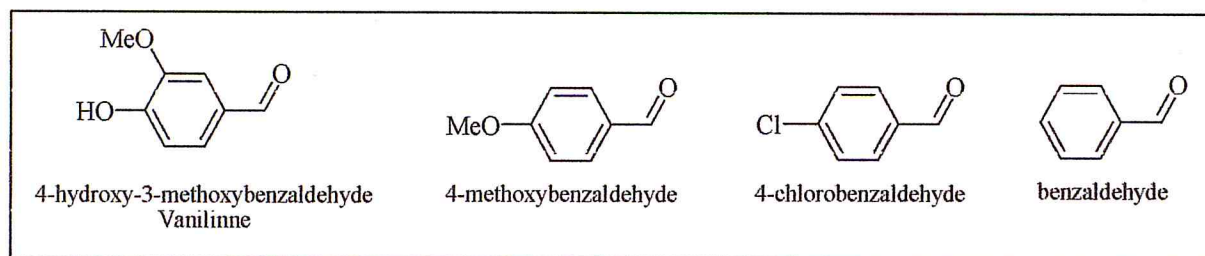
# Partie 1. Synthèse et Caractérisation des Analogues à la Curcumine

## II.1 Réactifs utilisés

Les réactifs utilisés sont : la cyclohexanone et les aldéhydes aromatiques diversement substitués



Les Aldéhydes aromatiques substitués :



Les solvants utilisés sont : L'acétone, l'éthanol, absolu, l'éther, Acide acétique glacial, dichlorométhane et méthanol.

## II.2 Techniques de caractérisation

### II.2.1 Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple dont le principe est basé sur le phénomène d'adsorption. Elle est extrêmement utile, on l'utilise en générale pour suivre l'avancement des réactions, connaître la composition des fractions séparées sur colonne ou contrôler la pureté des produits [49]. Nous avons utilisé la chromatographie pour suivre les réactions et pour vérifier la pureté des produits synthétisés. Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées, en utilisant des feuilles d'aluminium  $Al_2O_3$ . Les révélations ont été effectuées dans un bain de sable iodé. La caractérisation structurale sera réalisée grâce aux techniques spectroscopiques classiques (IRTF et RMN).

## II.2.2 Caractérisation par Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTf)

La spectrophotométrie infrarouge, est l'un des outils les plus puissants dont dispose tout scientifique, qu'il soit chimiste, biologiste, médecin ou autre, dans l'analyse structurale et qualitative [26].

Les radiations infrarouges constituent la partie du spectre électromagnétique dont les longueurs d'ondes sont supérieures à celle du visible et inférieure à celle des ondes radio ultracourte (entre 1 et 100 $\mu\text{m}$ ) [27]. La région infrarouge peut être divisée en trois domaines principaux : le proche infrarouge (région des harmoniques), de 0,8 à 2,5  $\mu\text{m}$ , le proche infrarouge (région des vibrations-rotations), de 2,5 à 50  $\mu\text{m}$  et l'infrarouge lointain (région des rotations), de 50 à 100  $\mu\text{m}$  [28]. Le domaine du moyen infrarouge est plus riche en informations sur les structures des composés examinés. De ce fait, il est très utilisé comme procédé non destructif pour identifier les composés moléculaires organiques dont il permet de garder une sorte d'empreinte .

## II.2.3 Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est une technique très polyvalente. Dans des conditions appropriées, sous un champ magnétique, un échantillon peut absorber une radiation électromagnétique dans la gamme des radiofréquences (rf) à des fréquences régies par les caractéristiques de l'échantillon. L'absorption est fonction de certains des noyaux présents dans la molécule [29]. En effet, pour qu'un noyau soit étudiable en RMN, il faut que son spin nucléaire, noté I ou S, soit différent de 0, sans quoi il ne peut s'orienter dans un champ magnétique (c'est le cas du  $^{12}\text{C}$  et de l' $^{16}\text{O}$  dont les spins nuls rendent l'observation de ces noyaux impossible) [30]. En pratique, les atomes les plus faciles à étudier sont ceux possédant un moment de spin  $I = 1/2$ , or la plupart des atomes couramment retrouvés dans des molécules, qu'elles soient d'origine chimique ou naturelle ont au moins un isotope qui se trouve dans ce cas ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , ...) [31]. En synthèse organique, les deux atomes les plus étudiés sont l'hydrogène et le carbone 13.

## II.3 Synthèses des Analogues de la Curcumine

### II.3.1 Synthèse de DiBenzylidèneCyclohexanone (DBC)

#### II.3.1.1 Mode opératoire

Dans un erlenmeyer, on dissout 5g de la potasse KOH( 0.1 mol) dans 50ml d'eau du distillée qu'on refroidit dans un bain de glace et on rajoute 40ml d'éthanol à 95% .Ce mélange est mis sous agitation magnétique à température ambiante jusqu'à obtention d'une solution transparente ,on rajoute à ce mélange 0.985g (10mmol,1eq) de cyclohexanone et 2,12g (20mmol,2eq) de benzaldéhyde .

Après 30 min d'agitation , un solide jaune se forme.

#### ➤ Filtration

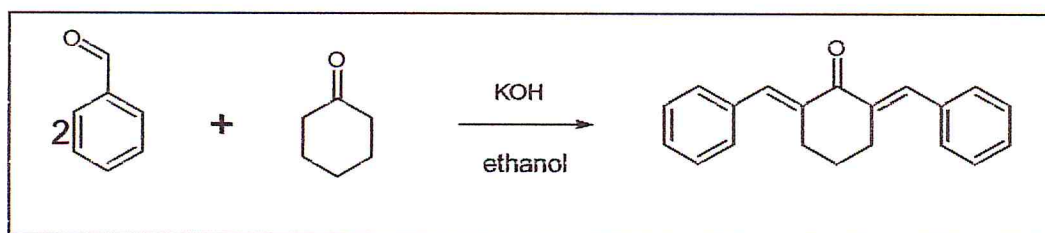
On filtre le mélange obtenu à l'aide d'un entonnoir de Büchner qui contient du papier filtre.

On lave avec abondamment avec de l'eau froide

#### ➤ Séchage

On met le papier filtre contenant le produit final dans un endroit sec pendant quelques jours.

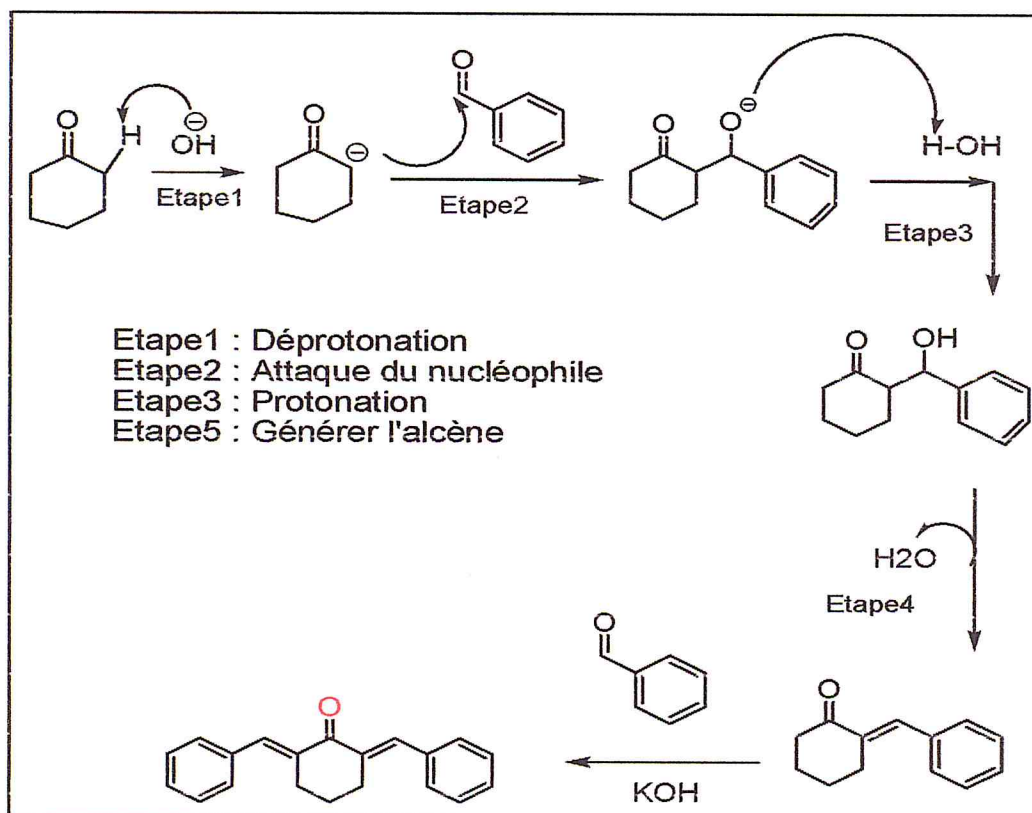
Après le séchage on obtient notre produit qui est la dibenzylidénecyclohexanone sous forme de cristaux de couleur jaune citron



*Schéma 8* : Synthèse de DiBenzylidèneCyclohexanone (DBC)

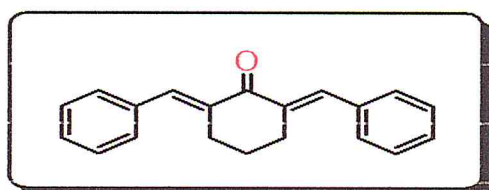
### II.3.1.2 Mécanisme réactionnel

Le mécanisme réactionnel proposé est :



*Schéma 9* : Mécanisme réactionnel de la préparation de DBC

### II. 3.1.3 Description de la DiBenzylidèneCyclohexanone ( DBC)



**Formule brute** :  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}$

**Masse moléculaire**:  $274 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Aspect** = cristaux jaunes

**Tf** =  $154 \text{ }^\circ\text{C}$  [54]

**Rf**( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) = 0.72

**Rdt** = 85%

La structure de DiBenzylidèneCyclohexanone ( DBC ) est confirmée par IR

➤ IR(KBr ,  $\text{cm}^{-1}$ ) ;

1668 (C=O) ; 1271 (C=C) aromatique ; 769 (CH=CH)

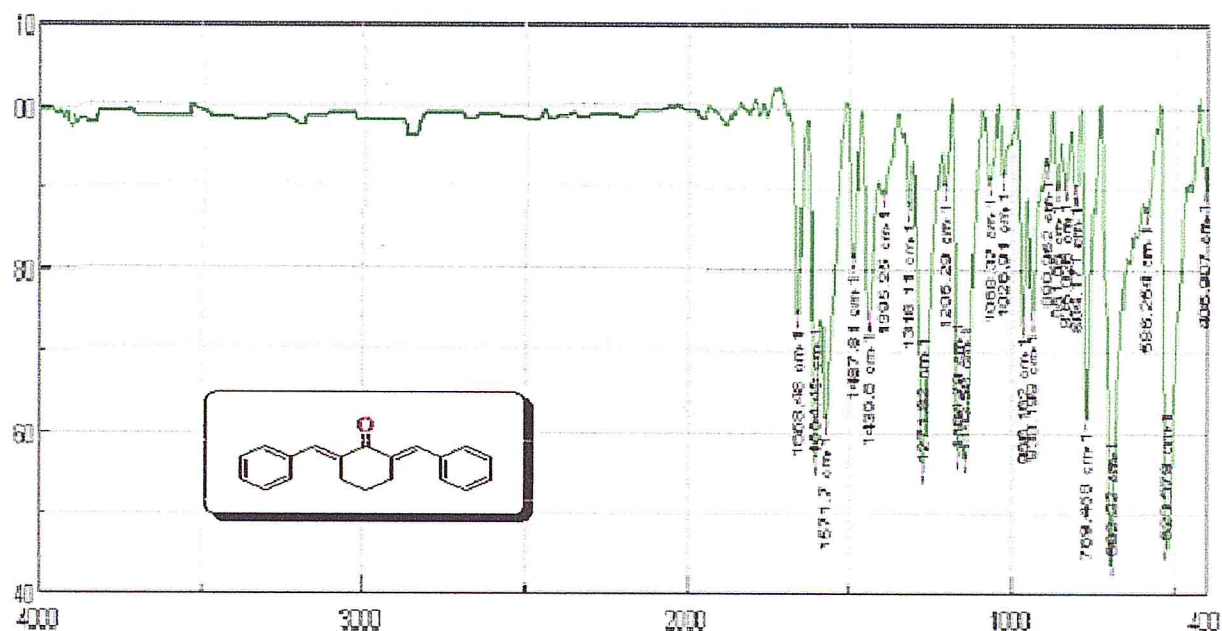


Figure 13: spectre IR du DBC

## II. 3.2 Synthèse de DBC substituée par thiourée (DBC<sub>t</sub>)

### II. 3.2.1 Mode opératoire

Dans un erlenmeyer de 100 ml, on introduit 1,37 g de DiBenzylidèneCyclohexanone (DBC) (5 mmole) et 0,76 g de thiourea (10 mmole) et (3g de KOH dans 100ml de éthanol), Le mélange est porté au reflux sous agitation magnétique pendant 3h -5h, La réaction est suivie par CCM.

On laisse refroidir à température ambiante. La précipitation du DBC thiou-urée est provoquée par l'ajout de HCL ( neutralise le milieu PH = 7 ) . Le précipité obtenu est filtré puis séché, a l fin recristallise avec éthanol

Le schéma 10 représente la synthèse générale de DBC thiou-urée

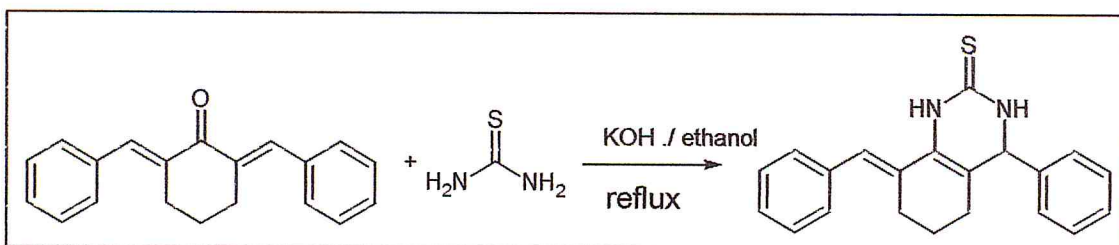


Schéma 10 : Synthèse de DBC<sub>t</sub>

### II. 3.2.2 Mécanisme réactionnel

Le mécanisme réactionnel proposé est :

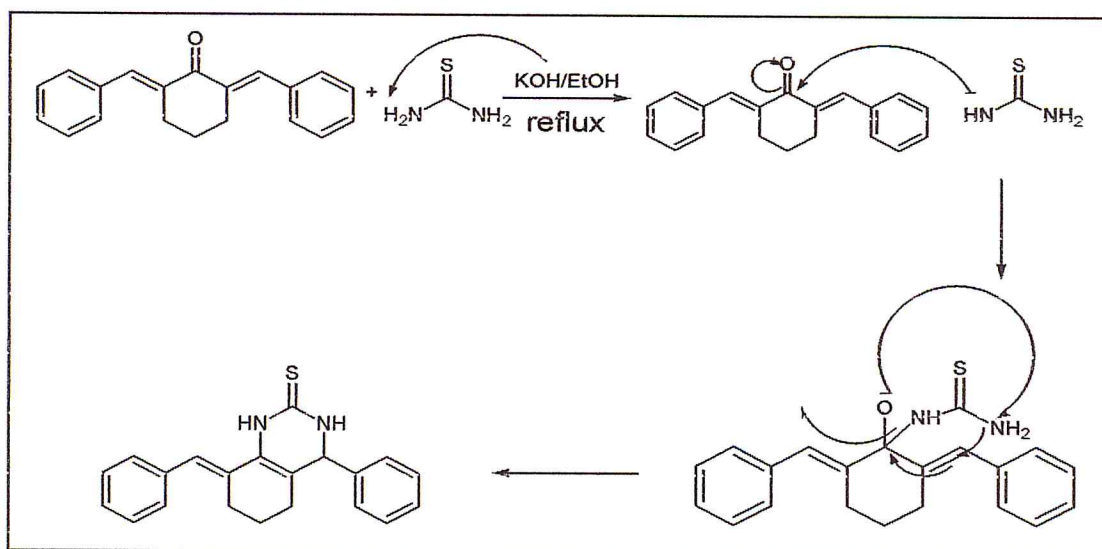
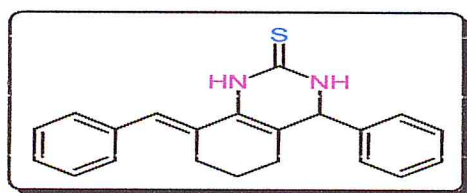


Schéma 11 : Mécanisme réactionnel de la préparation de DBC<sub>t</sub>

### II. 3.2.3 Description de la DBC<sub>t</sub>



(8E)-8-benzylidene-3,4,5,6,7,8-hexahydro-4-phenylquinazoline-2(1H)-thione

Formule brute : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>S

Masse moléculaire: 332 g.mol<sup>-1</sup>

Aspect = cristaux orange

Tf= 194 °C

Rf(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)= 0.72

Rdt = 60%

### II. 3.2.4 Analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Nous avons soumis les produits à une analyse chromatographique sur couche mince, en utilisant le dichlorométhane comme éluant. Après le développement du chromatogramme et lorsque le front du solvant d'éluion a atteint la ligne supérieure, la plaque a été retirée, séchée et révélée par l'iode afin d'avoir la séparation chromatographique du produit présent Figure 14

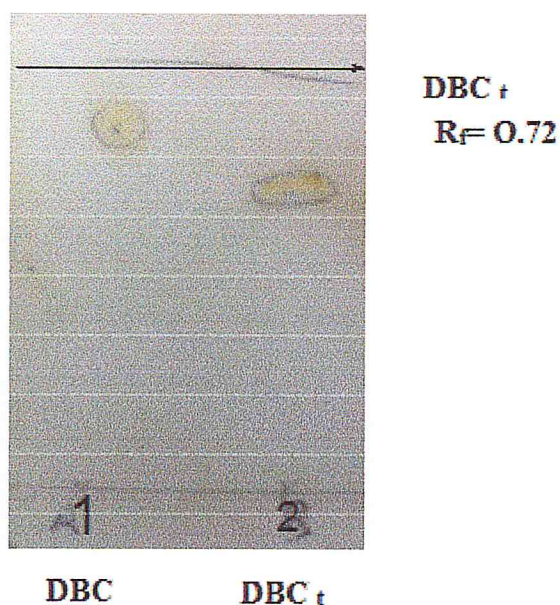


Figure 14 : Chromatogramme de DBC<sub>t</sub> ainsi que de réactif de départ DBC

La structure de DBC<sub>t</sub> est confirmée par IR et RMN <sup>1</sup>H

### II. 3.2.5 Spectre IR

➤ IR(KBr, cm<sup>-1</sup>);

3449 (N-H) ; 1216 (C=C) aromatique ; 1280 (C-S) ; 764 (CH=CH) ; 682 (CH) aromatique



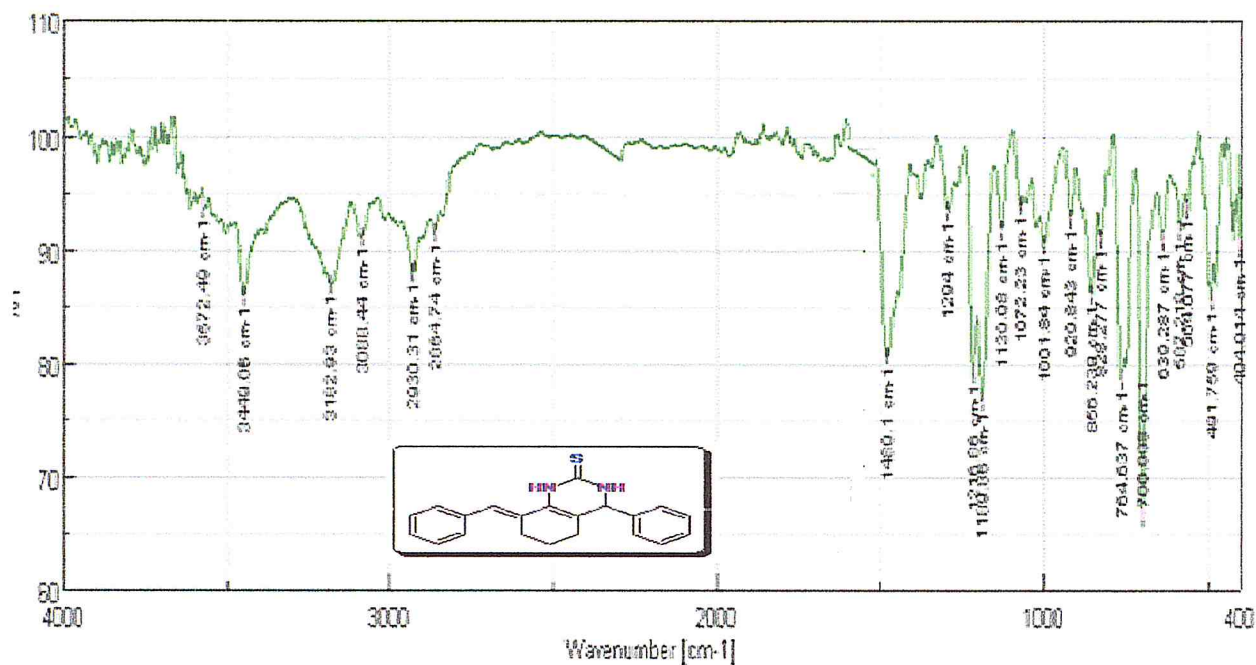


Figure 15: spectre IR du DBC<sub>t</sub>

## II. 3.2.6 Spectre RMN <sup>1</sup>H

### ➤ RMN <sup>1</sup>H

Le spectre de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>/TMS)

δ ppm = 7.37-7.32 (m, 10H<sub>ar</sub>) ; 6.30 (s, 1H, H<sub>2</sub>) ; 4.47 (s, 1H, H<sub>4</sub>) ; 2.21 (t, 4H, NH) ; 1.9 (t, 4H, H<sub>6</sub>) ; 1.3 (quint, 2H, H<sub>5</sub>)

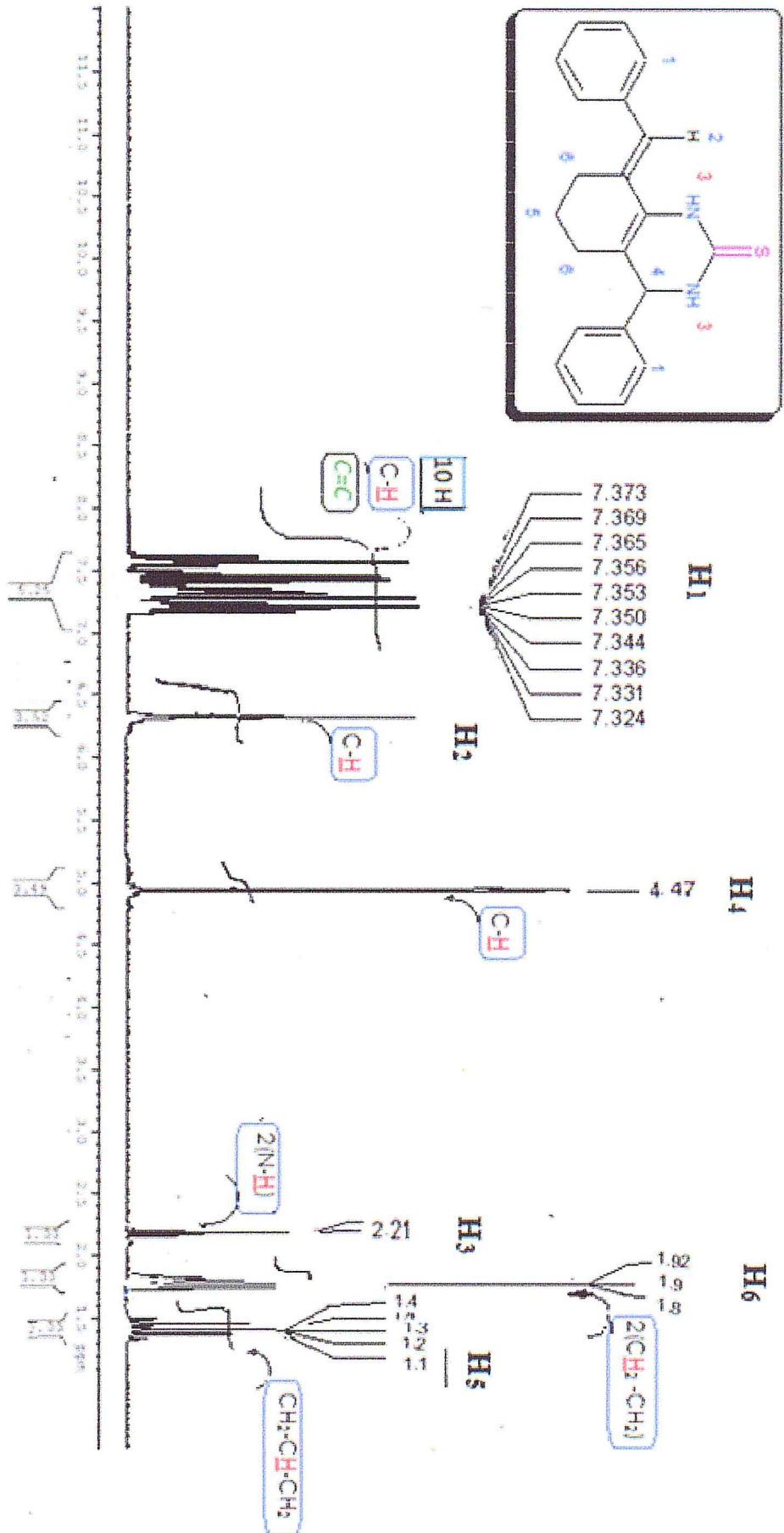


Figure 16: Spectre  $\text{RMN}^1\text{H}$  du DBC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm

**Tableau 1 :** Comparaison  $\delta$ ppm thiorique /  $\delta$ ppm expérimentale

Composés	$\delta$ ppm des signaux	Attribution des signaux
	7.32-7.37	(m, 10H <sub>ar</sub> )
	6.30	(s, 1H, H <sub>2</sub> )
	4.47	(s, 1H, H <sub>4</sub> )
	2.21	(s, 4H, NH)
	1.90	(t, 4H, H <sub>6</sub> )
	1.30	(quint, 2H, H <sub>5</sub> )

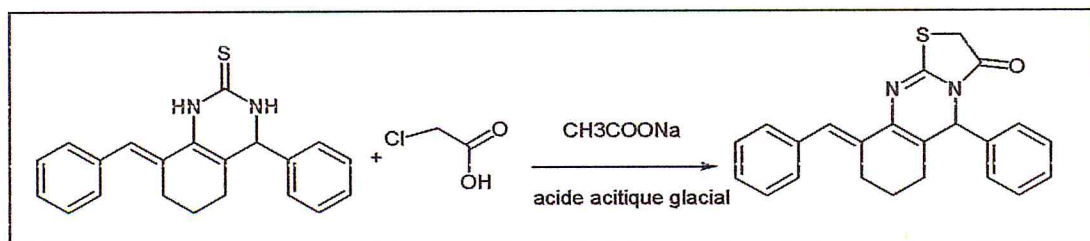
### II. 3.3. Synthèse DBC Cl (9E)-9-benzylidene-6, 7, 8, 9-tetrahydro-5-phenyl-2H-thiazolo [2,3-b] quinazolin-3(5H)-one

#### II. 3.3.1 Mode opératoire

0,33 g de de DBC thiourea (2 mmole) est introduite dans un erlenmeyer à fond rond contenant 10 ml d'acide acétique glacial Le mélange est agité pendant 5min on a ajoute 0,1 g de ClCH<sub>2</sub>COOH (1.5mmole ) et 1g de CH<sub>3</sub>COONa , Le mélange est porté au reflux sous agitation magnétique pendant 3h-4h, La réaction est suivie par CCM .

#### ✓ Traitement

On laisse refroidir à température ambiante. on a ajoute 1 eau glacée et laisse sous agitation magnétique jusqu'a forme solide. Le précipité obtenu est filtré recristallise (éthanol) Il est séché. Le schéma 12 représente la synthèse générale.



**Schéma 12 :** Synthèse de DBC Cl

### II.3.3.2 Mécanisme réactionnel

Le mécanisme réactionnel proposé est:

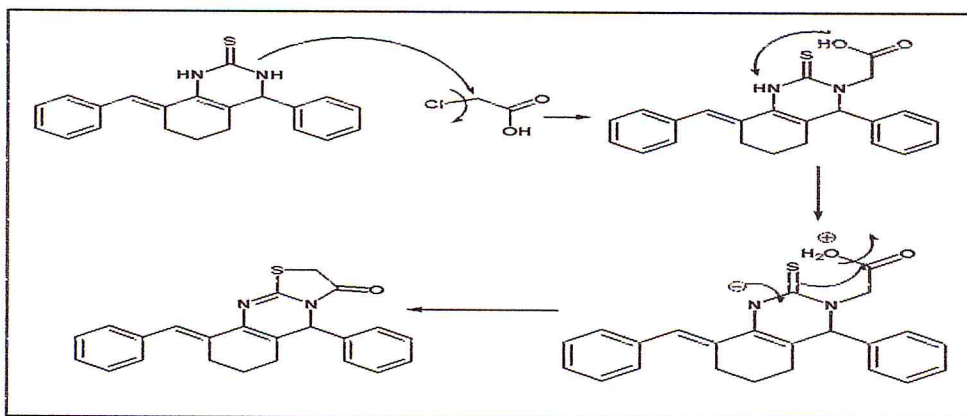
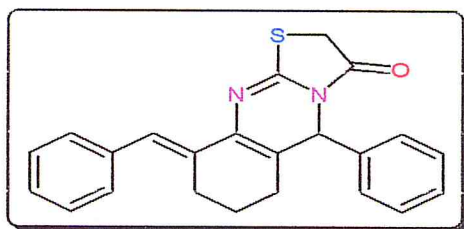


Schéma 13 : Mécanisme réactionnel de la préparation de DBC<sub>Cl</sub>

### II. 3.3.3 Description de la DBC<sub>Cl</sub>



(9E)-9-benzylidene-6,7,8,9-tetrahydro-5-phenyl-2H-thiazolo[2,3-b]quinazolin-3(5H)-one

**Formule brute :** C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>OS

**Masse moléculaire:** 372 g.mol<sup>-1</sup>

**Aspect =** cristaux marron

**Tf=** 214 °C

**Rf(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)=** 0.62

**Rdt =** 71%

La structure de DBC<sub>Cl</sub> est confirmée par IR et RMN <sup>1</sup>H

#### II. 1.3.3.4 Spectre IR

➤ IR (KBr , cm<sup>-1</sup>)

1722 (C=O); 1607 (C=N) aromatique; 692 (CH) aromatique

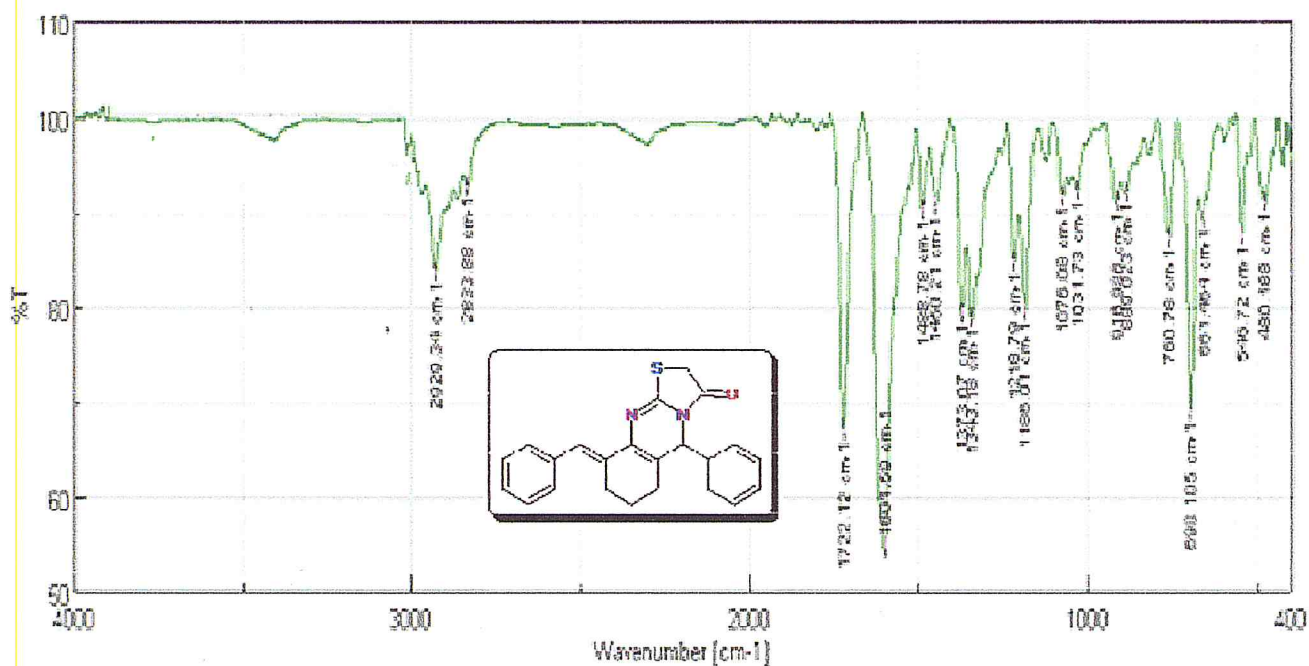


Figure 17: spectre IR du DBCl

### II. 1.3.3.5 Spectre RMN <sup>1</sup>H

#### ➤ RMN <sup>1</sup>H

Le spectre de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>/TMS )

$\delta$  ppm = 7.37 -7.32 (m, 10H<sub>ar</sub>) ; 6.30 (s, 1H, H<sub>2</sub>); 4.47 (s, 1H, H<sub>4</sub>) ; 3.6 (s, 2H, H<sub>3</sub>) ; 1.9 (t, 4H, H<sub>6</sub>) ; 1.3 (quint, 2H, H<sub>5</sub>)

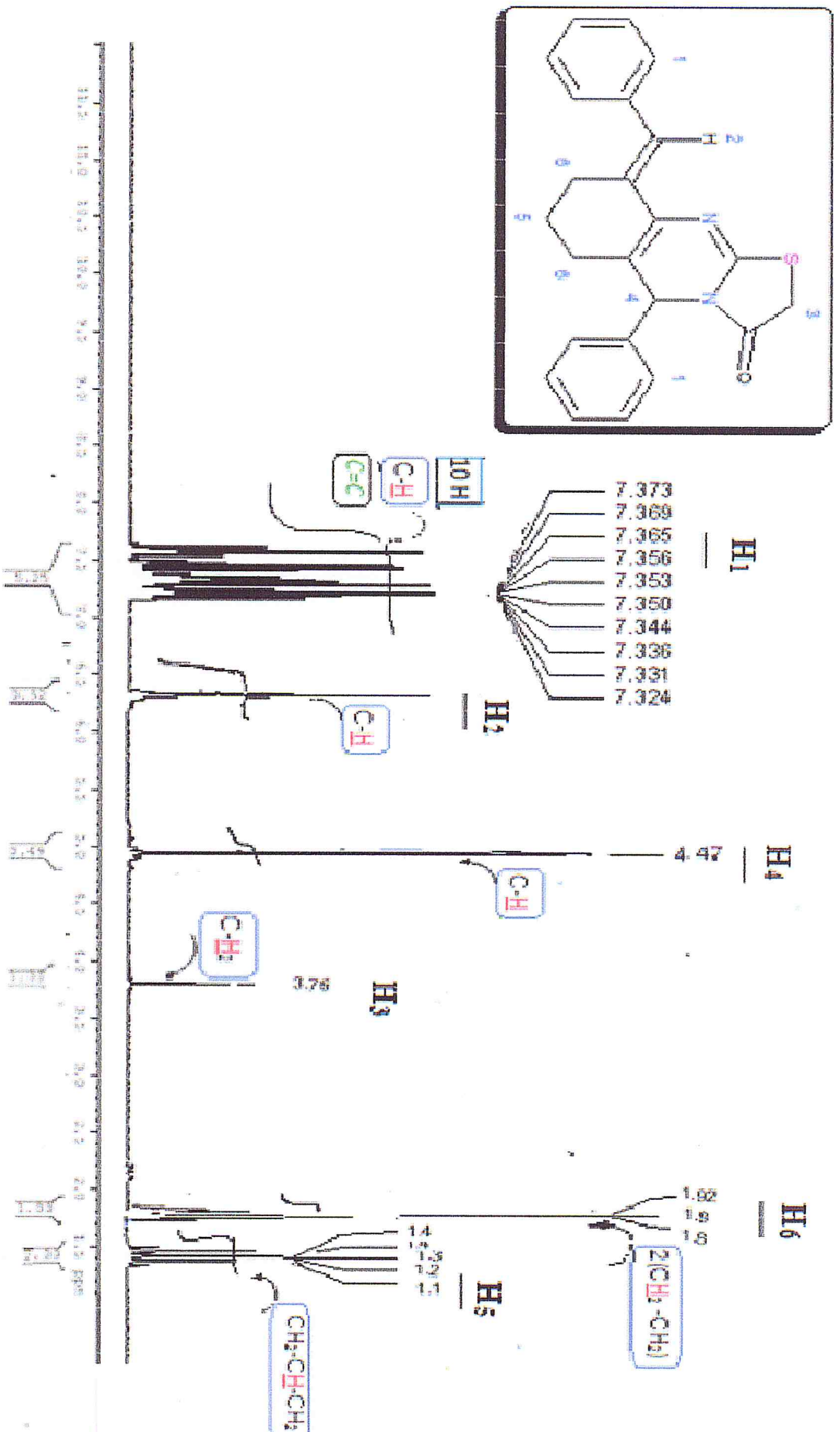
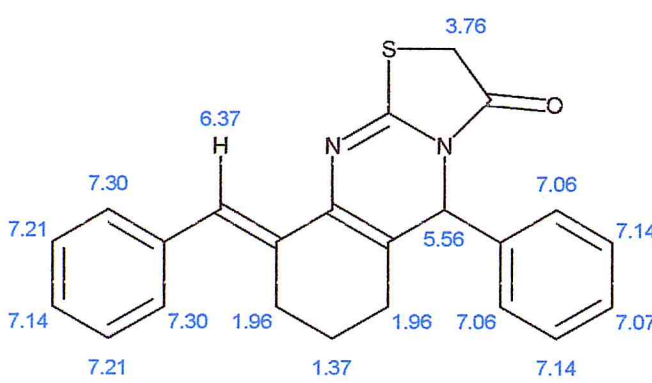


Figure 18: Spectre RMN<sup>1</sup>H du DBCci

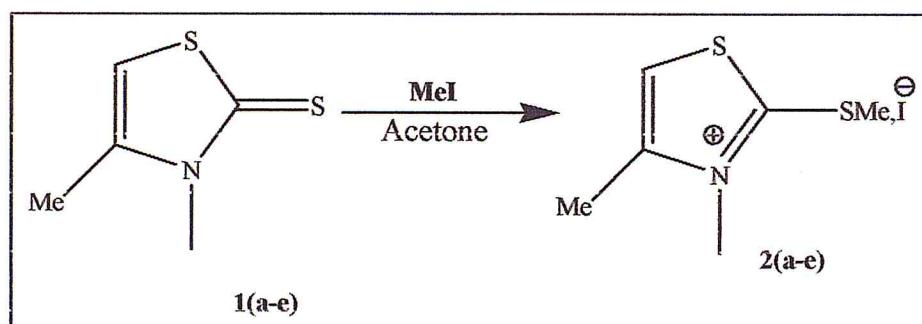
**Tableau 2 :** Comparaison entre  $\delta$ ppm théorique /  $\delta$ ppm expérimentale

Composés	$\delta$ ppm des signaux	Attribution des signaux
	7.36-7.32	(m, 10H <sub>ar</sub> )
	6.30	(s, 1H, H <sub>2</sub> )
	4.47	(s, 1H, H <sub>4</sub> )
	3.60	(s, 2H, H <sub>3</sub> )
	1.90	(t, 4H, H <sub>6</sub> )
	1.30	(quint, 2H, H <sub>5</sub> )

### II.3.4. Synthèse du sel thiazoluim ST

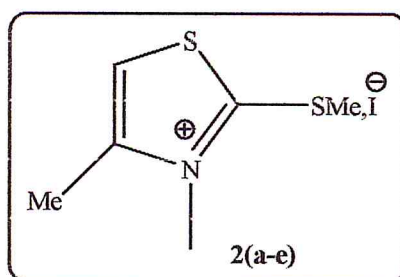
#### II.3.4. 1 Mode opératoire

Un mélange de thiazolinethione 1(a-e) et iodure de méthane (2eq, 60mmol) est introduit dans un ballon contenant 150 ml d'acétone. Le mélange est mis sous agitation à température ambiante jusqu'à formation d'un précipité. Le sel obtenu est filtré puis lavé à l'acétone. Le schéma 14 représente la synthèse générale



**Schéma 14 :** Synthèse du Sel Thiazoluim ST

### II.3.4.2 Description de Sel Thiazoluim (ST)



#### Idure de 3,4-diméthyl-2-(méthylethio)-1,3-thiazol-3ium

- cristaux jaunes pale
- Rdt = 80%
- $T_f = 160^\circ\text{C}$

### II.3.4.3 Synthèse DBC<sub>sel</sub>

#### II.3.4.3.1 Mode opératoire

1 mmole de de **DBC** Cl est introduite dans un erlenmeyer à fond rond contenant 10 ml de dichloromethane on a ajoute 1 mmole de de Sel Thiazoluim (ST) et 0.2 ml de  $\text{Et}_3\text{N}$ . On laisser sous agitation magnétique à température ambiante. La réaction est suivie par CCM.

#### II.3.4.3.2 Traitement

Le précipité obtenu est filtré recristallise (Méthanol) Il est séché. Le schéma 15 représente la synthèse générale

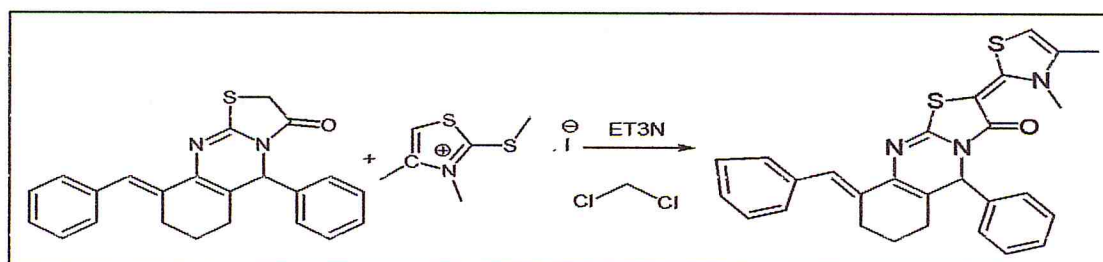
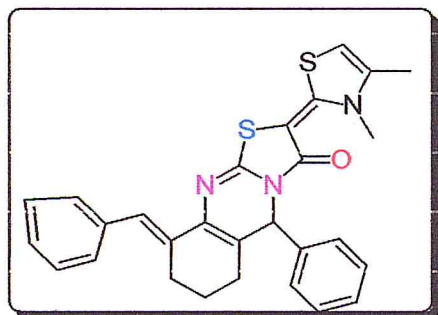


Schéma 15 : Synthèse de DBC<sub>sel</sub>



### II.3.4.3.3 Description de la DBC<sub>SeI</sub> : (2Z, 9E)-9-benzylidene-6, 7, 8, 9-tetrahydro-2-(3,4-dimethylthiazol-2(3H)-ylidene)-5-phenyl-2H-thiazolo [2,3-b] quinazolin-3(5H)-one

C'est une nouvelle molécule synthétisée



← Nouveau produit

**Formule brute :** C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>OS<sub>2</sub>

**Masse moléculaire:** 483 g.mol<sup>-1</sup>

**Aspect =** cristaux noirs

**Tf=** 234 °C

**Rf(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)=** 0.42

**Rdt =** 62%

La structure de DBC<sub>3</sub> est confirmée par IR et RMN <sup>1</sup>H

#### II.3.4.3.4 Specter IR

➤ IR (KBr, cm<sup>-1</sup>)

1694 (C=O) aromatique ; 1505 (C=N) ;

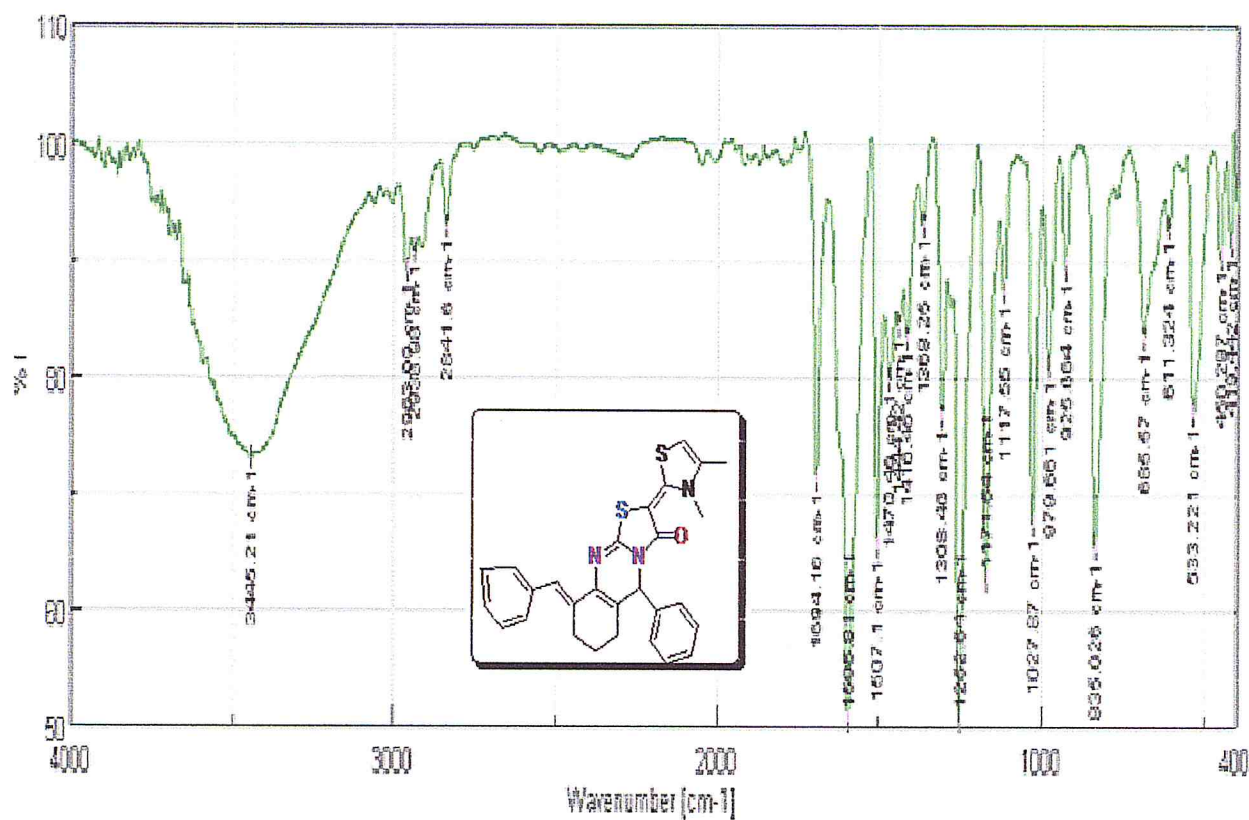


Figure19 : spectre IR du DBC<sub>Set</sub>

### II.3.4.3.5 Spectre RMN <sup>1</sup>H

#### ➤ RMN <sup>1</sup>H

Le spectre de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>/TMS )

$\delta$  ppm = 7.37 -7.32 (m, 10H<sub>ar</sub>) ; 6.25 (s, 1H, H<sub>2</sub>); 5.67 (s, 1H, H<sub>4</sub>) ; 5.36 (s, 1H, H<sub>3</sub>) ; 2.47 (s, 3H, H<sub>8</sub>) ; 1.92 (t, 4H, H<sub>6</sub>) ; 1.5 (s, 3H, H<sub>7</sub>) ; 1.1 (m, 2H, H<sub>5</sub>)

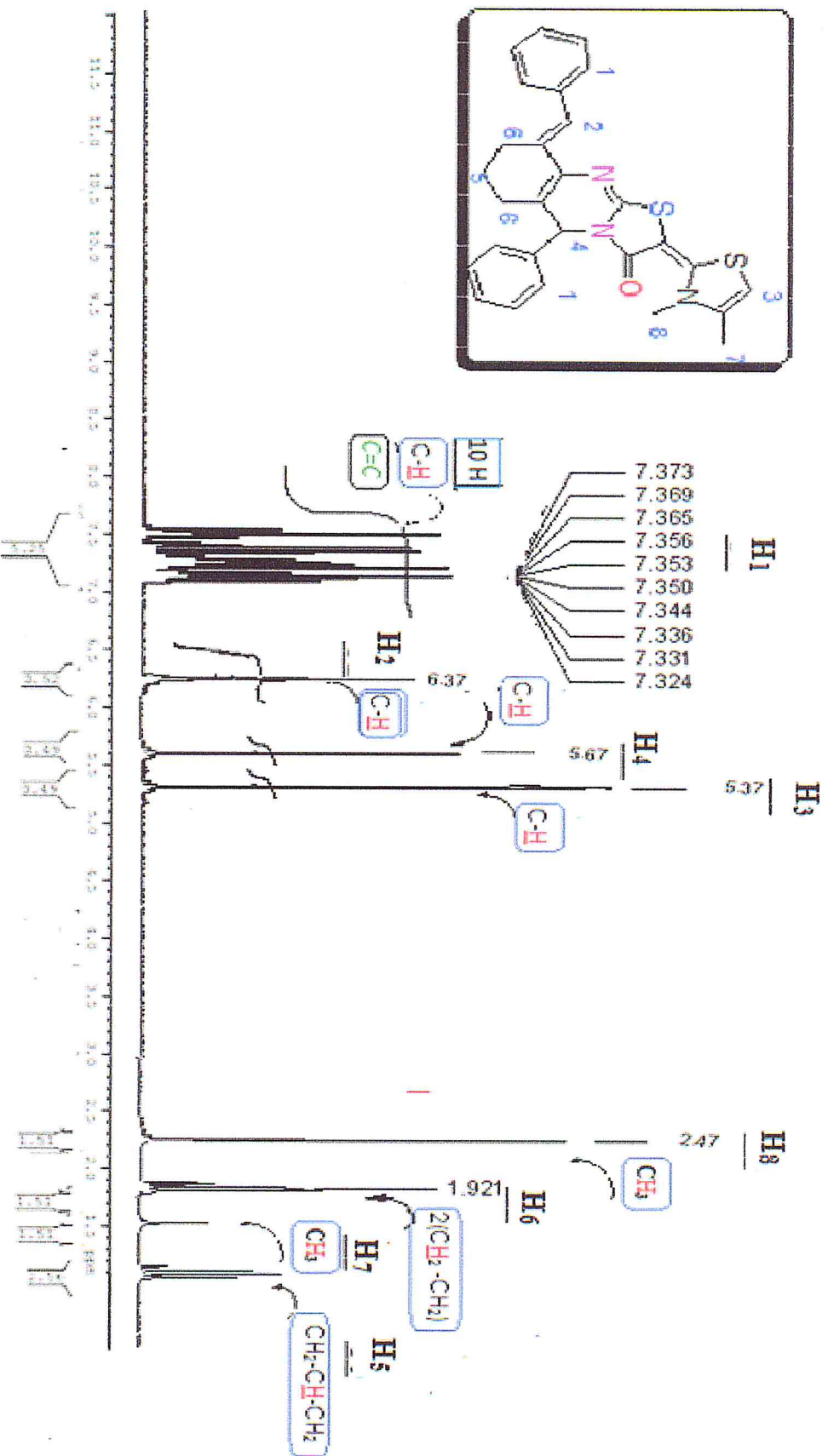


Figure 20: Spectre RMN $^1\text{H}$  du DBCsel (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm

**Tableau 3 :** Comparaison entre  $\delta$ ppm théorique /  $\delta$ ppm expérimentale

Composés	$\delta$ ppm des signaux exp	Attribution des signaux
	7.37-7.32	(m, 10H <sub>ar</sub> )
	6.25	(s, 1H, H <sub>2</sub> )
	5.67	(s, 1H, H <sub>4</sub> )
	5.35	(s, 1H, H <sub>3</sub> )
	2.47	(s, 3H, H <sub>8</sub> )
	1.92	(t, 4H, H <sub>6</sub> )
	1.50	(s, 3H, H <sub>7</sub> )
	1.10	(m, 2H, H <sub>5</sub> )

## Partie 2 : Etude des activités biologiques

### II. 4.1. Etude du pouvoir antimicrobien

#### II. 4.1.1 Matériels et méthodes

C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien. Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et facilement reproductible [49].

L'aromatogramme représente cependant un point de repère essentiel puisque sa technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques (figure21) [50].

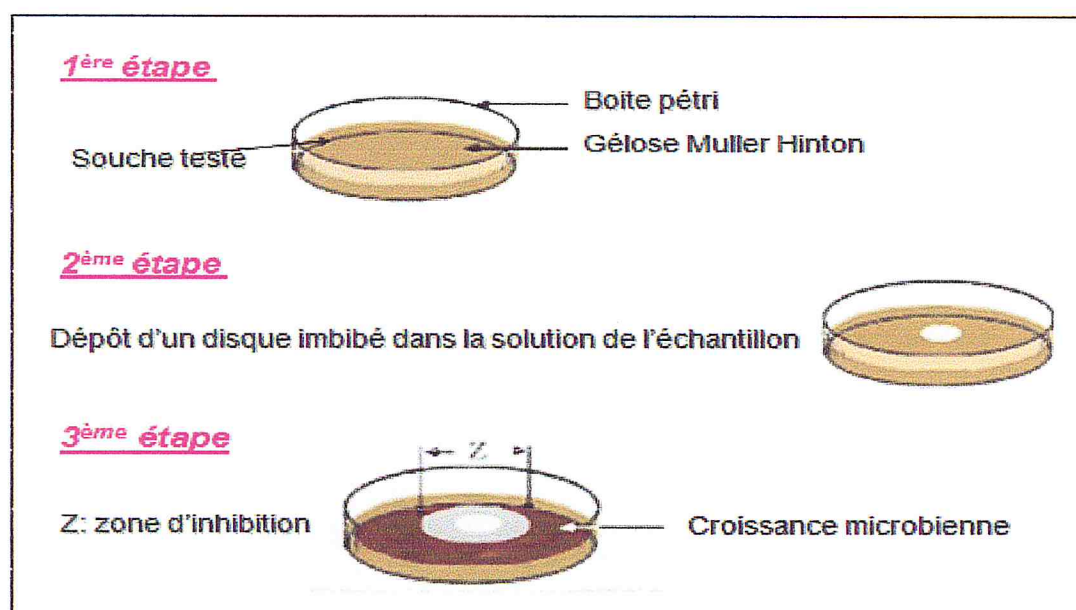
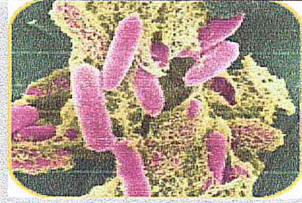
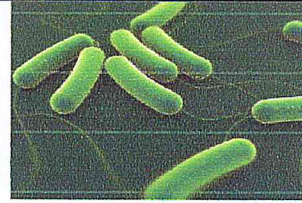
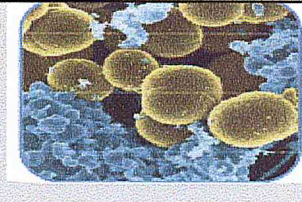
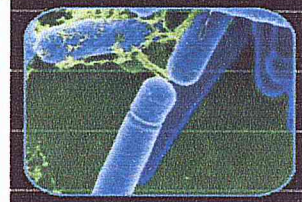




Figure 21 : Illustration de la méthode des aromatochromes sur boîte de Pétri

#### II. 4.1.2 Souches microbiennes choisies

Les souches utilisées pour les tests antimicrobiens sont : *Escherichia coli* (*Gram*<sup>-</sup>) , *Salmonella . tiphy* (*Gram*<sup>-</sup>) , *Staphylococcus aureus* (*Gram*<sup>+</sup>) , *Bacillus subtilis* (*Gram*<sup>+</sup>) pour l'activité antibactérienne ,et *Candida albicans* , *Mucor ramannianus* pour l'activité antifongique, qui ont été utilisées dans les tests d'antibiogrammes au niveau de l'unité de bactériologie clinique de laboratoire centrale de l'Etablissement Publique Hospitalier de Blida.

**Tableau 4:** Les références des souches microbiennes.

Souche bactérienne	Référence	Gram	Allures	Pathologie
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-		Entéropathogène : Gastroentérite, infections intestinales
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 23455	-		Pathogène
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	+		Pathogène
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 663	+		Non pathogène
<i>Candida albicans</i>	IPA 200	levure		Responsable d'infections superficielles
<i>Mucor ramannianus</i>	NRRL1829	champignon		Mucoromycoses opportunistes

### II. 4.1.3 Protocole expérimental

L'activité inhibitrice de nos produits a été déterminée selon le procédé indiqué précédemment dans la littérature, avec de légères modifications [52].

- **Repiquage des espèces bactériennes** : les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.
- **Préparation de l'inoculum** : des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans 10 mL de bouillon nutritif puis portées à l'incubation pendant 18 à 24 h à 37 °C.
- **Préparation des disques** : des disques de 9 mm de diamètre, stériles, sont chargés de produits à tester.
- **Préparation des milieux de culture** : la gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage pour l'activité antibactérienne et Sabouraud pour l'activité antifongique, elles sont coulé dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur est de 4 mm répartie uniformément dans les boîtes. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi. Comme elles sont illustrées dans la figure 22

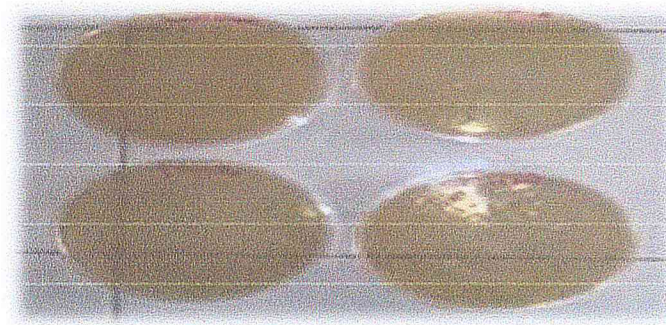


Figure 22 : Gélose fusionnée dans des boîtes de pétri

- **Ensemencement** : des boîtes de Pétri stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalement à l'aide d'un étaloir, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries, à l'aide d'une pince stérile

- **Dépôt des disques** : Les disques de 9mm de diamètre, sont imbibés par différentes concentrations des solutions de chaque composé. Le volume pris de chaque concentration est de l'ordre de 20 µl. les disques de papier filtre contenant les produits (A : DBC , B :DBC<sub>t</sub> , C : DBCsel , D : DBCcl ) qui sont solubilisé dans le DMSO à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable. Pour permettre une bonne diffusion de ces composés dans le milieu, et inhiber momentanément la croissance du germe testé, les boites sont placées à 4°C pendant trois heures, puis incubées à 37°C pendant 24h.pour les bactéries et après 48 h d'incubation à 25 °C pour les levures
- **La lecture** : L'activité antibactérienne et antifongique est déterminée par la mesure avec précision des diamètres de zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boite fermée, produite

#### II. 4.1.4 Résultats et discussions

Cette étude est basée sur la mesure des diamètres des halos d'inhibition des produits A, B, C, D.

L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique des produits a été effectuée par un test appelé « Aromatogramme » qui est une méthode de diffusion sur milieu gélosé ou méthode des disques absorbants. La mesure des diamètres des zones d'inhibition permet la détermination de l'activité antimicrobienne des produits in vitro.

Les résultats qualitatifs concernant les diamètres des zones d'inhibition du développement des différentes souches bactériennes testées, sont regroupés dans le tableau 5

**Tableau 5:** Les valeurs de diamètre des zones d'inhibition (mm) des produits aux souches bactériennes testées

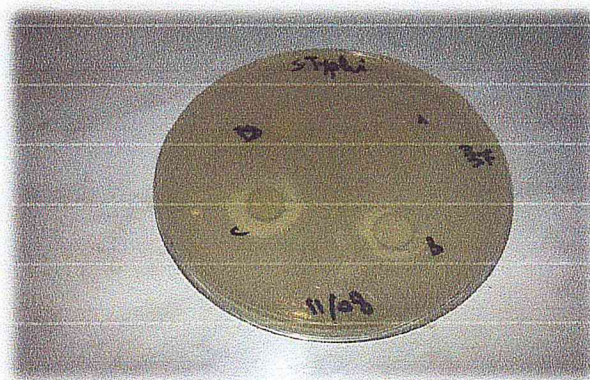
Souche bactérienne	La zone d'inhibition			
	A	B	C	D
<i>Escherichia coli</i>	11 mm	16 mm	19 mm	<9mm
<i>Selmonilla tiphy</i>	10 mm	14 mm	18 mm	<9 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 mm	16 mm	17 mm	12 mm
<i>Bacillus subtilis</i>	12 mm	16 mm	15 mm	<9 mm



Les figures 23, 24, 25 et 26 montrent les photographies des résultats obtenus de l'activité antibactérienne des composés testés contre les souches bactériennes après 24 h d'incubation à 37°C.



**Figure 23** : Aromatogramme d'E.coli avec les produits A, B, C, D



**Figure24** : Aromatogramme de S.typhi avec les produits A, B, C, D



**Figure 25** : Aromatogramme de S.aureus avec les produits A, B, C, D



Figure 26 : Aromatogramme de *B.subtilis* avec les produits A, B, C, D

Tableau 6 : Les valeurs de diamètre des zones d'inhibition (mm) des produits aux levures et champignon

Souche bactérienne	La zone d'inhibition			
	A	B	C	D
<i>Candida albicans</i>	13 mm	16 mm	18 mm	12 mm
<i>Mucor ramannianus</i>	10 mm	20 mm	26 mm	12 mm

Les figures 27 et 28 montrent les photographies des résultats obtenus de l'activité antifongique des composés testés contre *Candida albicans* et *Mucor ramannianus* après 48h d'incubation à 37°C.

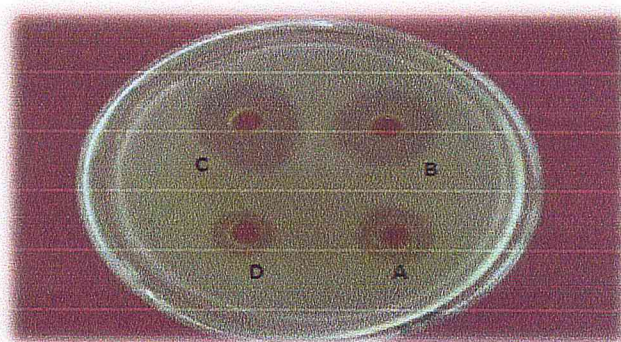
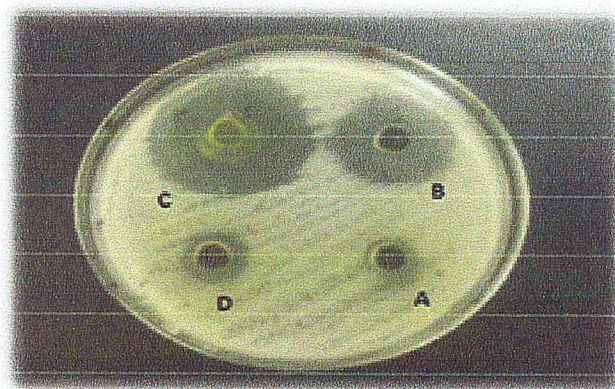


Figure 27 : Aromatogramme de *Candida Albicans* avec les produits A, B, C, D



**Figure 28** : Aromatogramme de *Mucor Ramannianus* avec les produits A, B, C, D

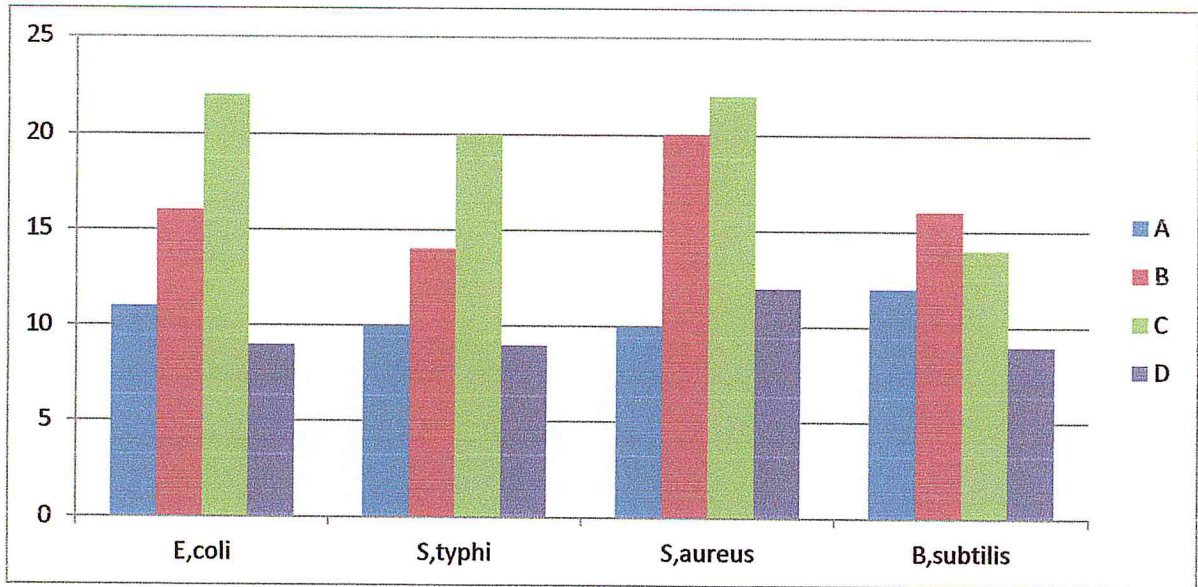
L'estimation de l'activité antibactérienne est basée sur une échelle de mesure, ils ont classé le pouvoir antibactérien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne en quatre classes [52] :

**Tableau 7** : Relation entre le diamètre d'inhibition et la sensibilité des souches

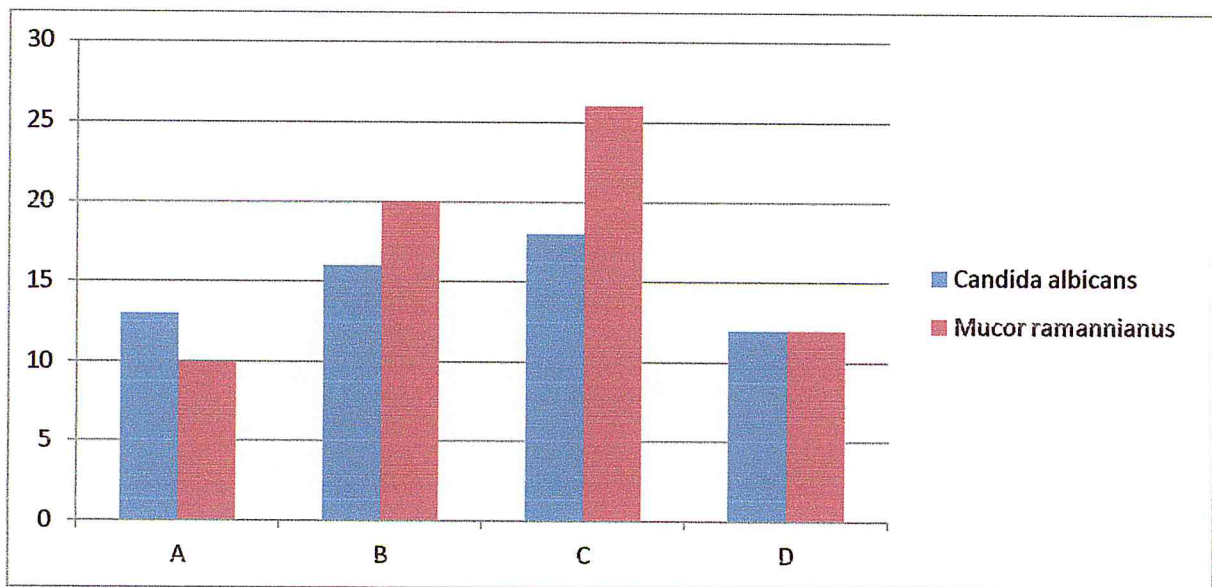
Diamètre d'inhibition (mm)	Sensibilité des souches
0-8 mm	non sensible
9-14 mm	Sensible
15-19 mm	très sensible
> 20 mm	extrêmement sensible

L'examen des résultats obtenus montre que les produits A, B, C et D présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis des quatre souches testées, à savoir : *Escherichia coli* (Gram<sup>-</sup>), *Salmonella typhi* (Gram<sup>-</sup>), *Staphylococcus aureus* (Gram<sup>+</sup>), *Bacillus subtilis* (Gram<sup>+</sup>), et antifongique vis-à-vis *Candida albicans* (levure) et *Mucor ramannianus* (champignon).

- La bactérie *Escherichia coli* n'est pas sensible pour l'échantillon D avec un diamètre (<9 mm), par contre elle est moyennement sensible pour l'échantillon A, très sensible pour l'échantillon B et C avec une zone d'inhibition de 11mm, 16 mm, 19 mm respectivement comme elle est présente dans la figure 23.
- La bactérie *S.typhi* n'est pas sensible pour l'échantillon D avec un diamètre (<9 mm), par contre elle est moyennement sensible pour l'échantillon A, sensible pour l'échantillon B et extrêmement sensibles pour l'échantillon C avec une zone d'inhibition de 10 mm, 14 mm, 18 mm respectivement comme elle est présenté dans la figure 24.
- La bactérie *S. aureus* elle est moyennement sensibles pour les deux échantillons A et D avec une zone d'inhibition 10 et 12 mm respectivement, elle est aussi très sensible pour les deux échantillons B et C avec une zone de 16 – 17 mm respectivement. comme elle est présenté dans la figure 25.
- La bactérie *B. subtilis* ne montre aucune sensibilité pour l'échantillon D avec un diamètre (<9 mm), par contre elle est moyennement sensible pour l'échantillon A avec un diamètre de 12 mm et elle est très sensible pour l'échantillon B et C avec une zone d'inhibition de 16 mm, 15 mm respectivement comme elle est présenté dans la figure 26.
- La levure *Candida albicans* est moyennement sensible pour les deux échantillons A et D avec une zone d'inhibition 13 et 12 mm respectivement, elle est aussi très sensible pour les deux échantillons B et C avec une zone de 16 – 18 mm respectivement. comme elle est présentée dans la figure 27.
- Le champignon *Mucor ramannianus* est moyennement sensible pour les deux échantillons A et D avec une zone d'inhibition 10 et 12 mm respectivement, elle est aussi extrêmement sensible pour les deux échantillons B et C avec une zone de 20 – 24 mm respectivement. comme elle est présentée dans la figure 28.



**Figure 29** : Histogramme représentant l'étude comparative de l'activité antimicrobienne des quatre produits A.B.C.D



**Figure 30** : Histogramme représentant l'étude comparative de l'activité antifongique des quatre produits A.B.C.D

D'après l'histogramme 29 et 30, on peut constater que les souches testées, se sont révélées les plus sensibles à l'égard des produits A, B et C

Les résultats du tableau illustrés par l'histogramme précédent montrent que les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne qui ont été utilisées, agissent sur le pouvoir antimicrobien (diamètres des zones d'inhibition).

Le pouvoir antibactérien et antifongique sur les souches *E coli*, *S. tiphy*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Candida albicans*, *Mucor ramannianus* apparaît plus puissant que celui de nos produits B et C. Donc on peut conclure que les produits B et C semblent exercer une activité antibactérienne et antifongique importante par rapport aux autres produits A et D.

#### ➤ **Interprétation des résultats**

Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé que les composés synthétisés présentaient des activités antibactériennes et antifongiques.

Le pouvoir antibactérien et antifongique sur les souches *E coli*, *S. tiphy*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Candida albicans*, *Mucor ramannianus* apparaît plus puissant chez les produits B et C. Donc on peut conclure que les produits B et C exercent une activité antibactérienne et antifongique importantes par rapport aux autres produits A et D.

## II. 4.2 Etude du pouvoir antioxydant

### II. 4.2.1 Méthode de piégeage du radical libre DPPH

Dans notre travail nous avons étudié l'activité antioxydante des différents composés synthétisés afin de juger et localiser le composé le plus actif.

Le pouvoir antioxydant de nos produits a été testé par la méthode au DPPH [ 54] avec quelques modifications.

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour nos produits, nous avons utilisé la méthode au DPPH, ce radical libre synthétique présente une coloration violette sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle (figure 1), le virage vers cette coloration et l'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule.

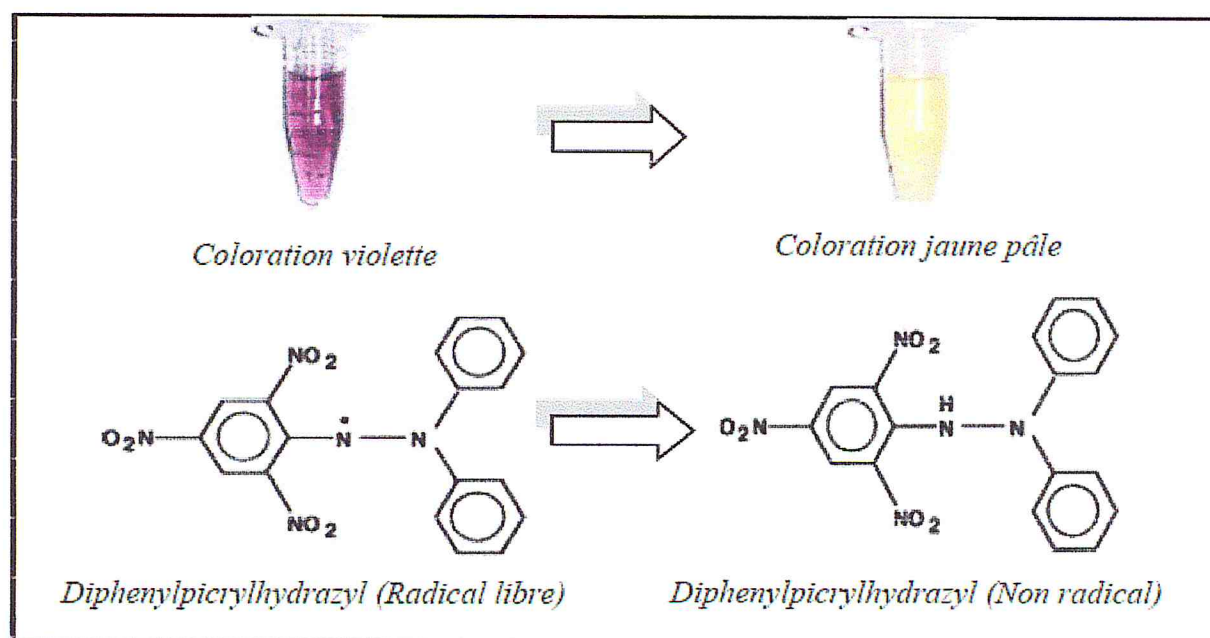


Figure 31 : Forme libre et réduite du DPPH [53]

### II. 4.2.2 Appareillage et réactifs

Le matériel suivant a été utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante des produits :

- Un spectrophotomètre UV-visible de marque Chimadzu type 1605 à double faisceau.
- Une balance sensible de marque Scaltec type OSI 9001, avec une précision de 0.01 mg.
- Des tubes à essais avec leurs supports.
- Deux pipettes de 1ml graduées et une micropipette (pipette de précision).

- Papier aluminium, pour préserver les solutions à l'abri de la lumière.
- Fliale de 100 ml pour préparer la solution de DPPH.

### II. 4.2.3 Mode opératoire

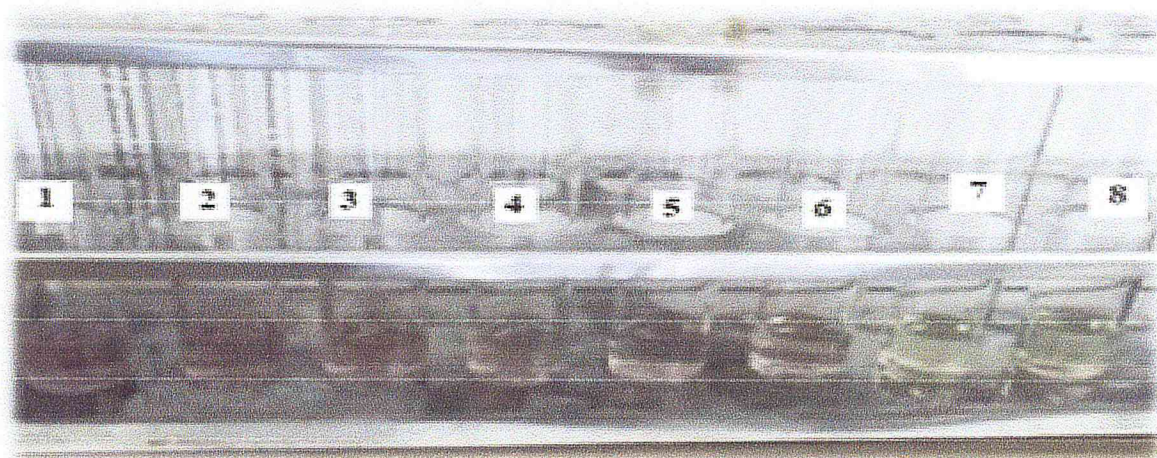
- Le DPPH (2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) est solubilisé dans le méthanol absolu pour avoir une solution de concentration de 0.004%, en raison de 4 mg de DPPH dissout dans 100 ml de méthanol.
- Les échantillons ont été dilués dans le chloroforme (solution)
- Les solutions ont été préparées par dissolution de 0.5 mg de chaque solution dans 1 ml de méthanol. Cette solution dite solution mère, subit ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de mg par ml.
- En parallèle, une solution méthanolique, de la vitamine E, a été préparée par dissolution de 0.2 mg de standard dans 1ml de méthanol. L'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.
- Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1ml du méthanol et les différentes concentrations de la solution à tester, on ajoute 1 ml de la solution DPPH. Les tubes sont placés à l'obscurité, à une température ambiante (25°C) pendant 30 min. Pour chaque concentration.
- La lecture est effectuée par la mesure d'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, en utilisant des cuves en quartz de 2 ml
- Pour chaque dilution, on prépare un blanc, constitué de 1 ml méthanol et 1 ml de la solution DPPH.

La caractéristique principale d'un antioxydant est sa capacité de capter les radicaux libres. Pour se renseigner sur la vitesse de réduction du radicale et la puissance d'un antioxydant, nous avons réalisé un suivi de la réaction de réduction par mesure de l'abaissement d'absorbance dans le temps, de nos produits, ainsi que l'étalon d'antioxydante à la concentration qui correspond à la valeur de EC50 (autrement appelée la valeur IC50).

La valeur **EC50** est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur).

La figure 32 montre la photographie des résultats obtenus de l'activité antioxydante de nos produits testés par la méthode au DPPH au sein de notre laboratoire de Chimie des Substances Naturelles.





**Figure 32** : La photographie des résultats obtenus de l'activité antioxydante de Vit E testée par la méthode au DPPH

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit deux paramètres :

- La concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution ( $IC_{50}$ ).
- Le pouvoir antiradicalaire (APR) qui est inversement proportionnel à l' $IC_{50}$ .

#### II. 4.2.4 Détermination du pouvoir antioxydant

Pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH à 50% ( $EC_{50}$ ), les résultats sont exprimés en activité antioxydante, qui exprime la capacité de piégeage du radical libre et elle est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. L'activité antioxydante « AA% » est donnée par la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{Abs control} - \text{Abs test}) / \text{Abs control} * 100$$

Soit :

**AA** : Activité antioxydante.

**Abs** : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

**Abs control**: Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de la solution méthanol + DPPH.

**Abs test** : Absorbance à 517 nm de l'échantillon

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance anti-radicalaire [55].

$$\text{ARP} = 1 / \text{IC}_{50}$$

**ARP** : Puissance anti radicalaire

**IC<sub>50</sub>** : Concentration de la solution nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH

#### II. 4.2.5 Résultats et discussions

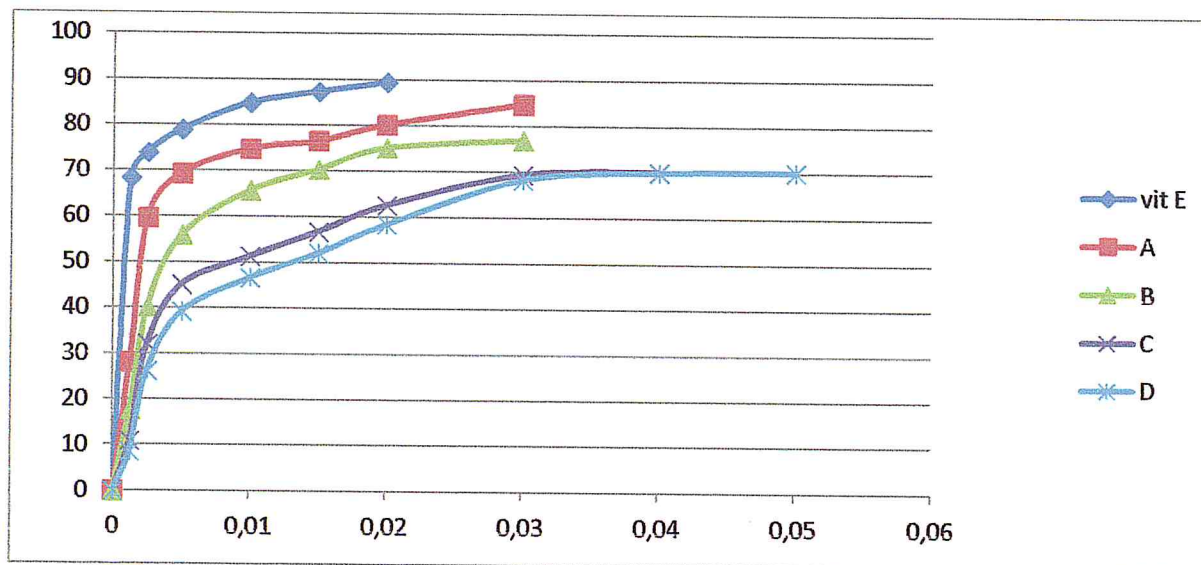
Nos produits ont présenté un très bon pouvoir antioxydant, ce qui est confirmé par la bibliographie.

Pour montrer la capacité antioxydante des produits (A: DBC, B: DBCt, C: DBCsel, D: DBC cl), on a effectué un test du taux de piégeage de radical libre DPPH sur la vitamine E, Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 8.

**Tableau 8** : Variation des absorbances et du taux de piégeage du DPPH en fonction des différentes concentrations des produits et de l'étalon antioxydant

Concentration	AA % (vit E)	AA % (A)	AA % (B)	AA % (C)	AA % (D)
0.00125	68.34	59.6	40.6	10.90	8.5
0.00250	73.92	66.7	54.25	40.23	26.33
0.00500	78.99	4.06	62.2	45.11	40.87
0.01000	84.85	75.8	65.64	51.30	46.65
0.01500	87.30	79.6	70.34	56.73	52.14
0.02000	89.46	80.64	75.23	62.54	58.42
0.03000	-	-	76.89	69.41	68.32
0.04000	-	-	-	70.12	70.00
0.05000	-	-	-	-	70.22

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des pourcentages d'inhibition calculés en fonction des différentes concentrations utilisées pour les produits étudiés



**Figure 33:** Variation du taux de piégeage du DPPH par la vitamine E, les produits : A, B, C, D en fonction des différentes concentrations

La figure 33 montre que les produits présentent une bonne activité comme des capteurs de radicaux par rapport à Vit E

#### II. 4.2.6 La détermination de la valeur EC50

L'EC50 a été apparemment introduit par Brand-Williams et ses collaborateurs et elle a été ensuite employée par plusieurs groupes de chercheurs pour représenter leurs résultats. Elle définit la concentration efficace de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical libre « DPPH » [55].

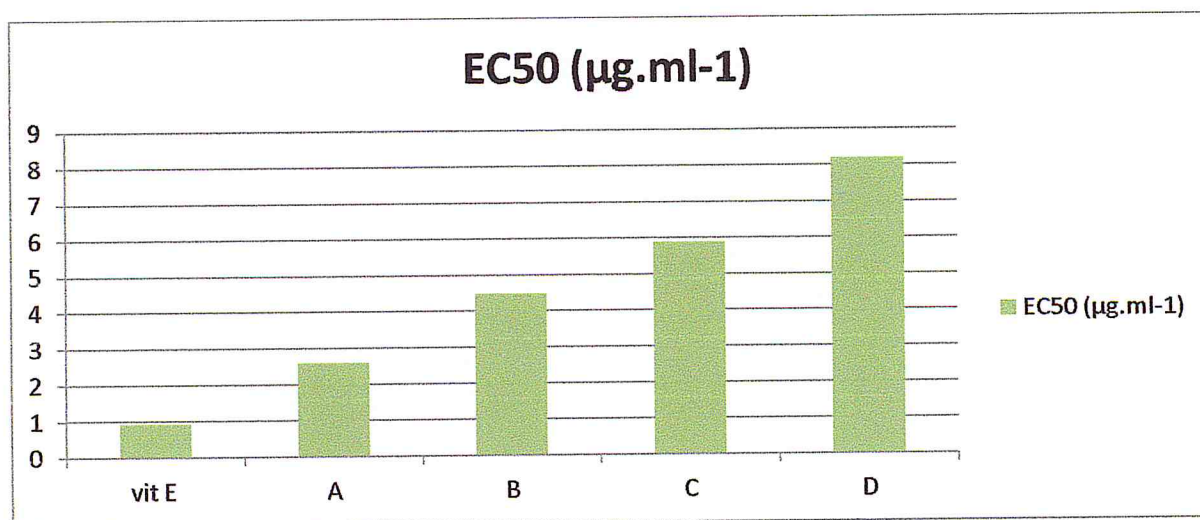
Les EC50 des produits et l'antioxydant standard sont déterminés graphiquement, dont l'abscisse représente la concentration des produits et l'ordonnée représente l'activité antioxydante en (%). Les résultats déduits sont regroupés dans le tableau 9.

**Tableau 9:** Valeurs EC50 des produits A, B, C, D et standard Vit E antioxydante

Composées	EC50 ( $\mu\text{g.ml-1}$ )
Vit E	0.94
A	2.6
B	4.5
C	5.9
D	8.2

#### II. 4.2.7 Comparaison entre les EC50

La capacité antioxydante des différents composés a été déterminée à partir des IC<sub>50</sub>. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est petite, plus l'activité du composé étudié est grande.



**Figure 34 :** Comparaison des valeurs EC50 de nos produits avec la vitamine E

Comme c'est illustré par l'histogramme de la figure 33, la Vitamine E possède des capacités de piégeage du radical libre DPPH puissantes. Tous les EC50 sont très basses comprises entre 0.94 et 8.2 µg.ml<sup>-1</sup>. Suivant ce paramètre, les capacités de balayage du radical libre sont classées dans l'ordre suivant :

$$\text{Vit E} > \text{A} > \text{B} > \text{C} > \text{D}.$$

#### II. 4.2.8 Interprétation des résultats

La capacité antioxydante des produits sont largement dépendant de la composition des ces structures

- Pour les composés A et B et C et D l'oxydation se fait au niveau de la double liaison des composés dont le potentiel d'oxydation est inférieur à la vitamine E pris comme référence.
- La présence du soufre non libre dans les composés C et D a empêché la facilité de la réduction ce qui explique le meilleur pouvoir antioxydant de A et B par rapport à C et D

L'activité antioxydante augmente quand la concentration de l'échantillon augmente donc elle est proportionnelle à la concentration.

## Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous avons synthétisé un nouveau produit comportant un motif thiazolique (DBCsel) à partir des précurseurs analogues de la curcumines tels que la dibenzylidène cyclohexanone( DBC), la thiourée (DBCT) et le méthylène actif(DBCcl).

L'identification structurale des produits synthétisés a été confirmée par les méthodes spectroscopiques (IR et RMN).

Nous avons également réaliser une étude biologique sur le produit final (DBCsel) ainsi que sur ses précurseurs vis-à-vis de quelques bactéries : *Escherichia coli* (Gram<sup>-</sup>) *Salmonella . tiphy* (Gram<sup>-</sup>) *Staphylococcus aureus* (Gram<sup>+</sup>) , *Bacillus subtilis* (Gram<sup>+</sup>) pour l'activité antibactérienne ,et *Candida albicans* *Mucor ram annianus* pour l'activité antifongique. Ces tests ont été effectués au niveau de l'unité de bactériologie clinique de laboratoire centrale de l'Etablissement Public Hospitalier de Blida.

Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé que les composés synthétisés présentaient des activités antibactériennes et antifongiques. Les produits B (thiourée cyclique) et C (produit final) exercent une activité antibactérienne et antifongique importantes par rapport aux autres produits A et D.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante par la méthode du DPPH a montré que seuls les composés A et B ne comportant pas de soufre dans leur structure présentent une activité antioxydante appréciable par rapport au contrôle positif de la vitamine E.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante par la méthode du DPPH a montré que seuls les composés A et B ne comportant pas de soufre dans leur structure présentent une activité antioxydante appréciable par rapport au contrôle positif de la vitamine E.

**Perspectives :** Nous souhaitons poursuivre ce travail dans le cadre d'un doctorat en synthétisons une gamme de précurseurs d'analogues à la curcumine comportant un groupement phénolique auxquels seront greffés d'autres sels thiazoliums et comparer leur activité anti-inflammatoire par rapport à la curcumine.

# ***CONCLUSION GENERALE***

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**



## Références bibliographiques

- [1] B. B. Aggarwal ; .A.Kumar ; M.S. Aggarwal ; S.Shishodia ; *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention* **2005**, 349
- [2] S. Guldner ; *Les Zingiberacées, une famille à épices.-116f. Th : Pharm : Nancy I.* **1986**, 86
- [3] P .Delaveau; *Les épices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments.*Paris : Albin Michel, **1987**, 130
- [4] S.Shishodia ; G.Sethi ; B. B. Aggarwal ; *New York Academy of Sciences.* **2005** , 206
- [5] P.C.M. Jansen.; G.J.H. Grubben ;. D .Cardon ; *Ressources végétales de l'Afrique tropicale 3. Colorants et tanins. Wageningen , Pays-Bas.* **2005**, 238
- [6] B.B. Aggarwa l; I.D.Bhatt ; H. Ichikawa ; K.S Ahn ; G.Sethi ; S.K. Sandur ; *The Genus Curcuma. Taylor And Francis Group.* **2006** , 297
- [7] V .Lampe ; J. Milobedzka.; *Studien Fiber Curcumin. Ber Deutsch Chem Ges* **46. 1913**, 2235
- [8] B.B Aggarval ; A.Kumar ; A.C. Bharti ; *Preclinical And Clinical Studies.* **2003**, 363
- [9] L.Shen ; *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **2007**, 619
- [10] H.Itokawa ; Q.Shi; T.Akiyama ; S.Morris-Natschke ; *Chinese Medicine.* **2008**, 11
- [11] *V.Badmaev ;M.Majeed ; Un Bioprotecteur Issu Du Curcuma. Parfums Cosmétiques.Actualités, 154.* **2000**, 48
- [12] R.Anto ; J. Kuttan ; G. Dinesh Babu ; K.V. Rajasekharan ; *International Journal of Pharmacy.* **1996**, 166
- [13] A.Nurfina ; N. Reksohadiprodjo ; M.S. Timmerman ; H. Jenie ; U. A. Sugiayanto ; *European Journal Of Medicinal Chemistry.***1997**, p 321
- [14] C.C.Araujo; L.L.Leon: *Biological Activities Of Curcuma Longa L. Mem Inst Oswaldo Cruz .***2001**, 723
- [15] B.B.Aggarwal; B.Sundaram; *Advances In Experimental Medicine And Biology.***2007**, 75
- [16] M.Man Yin Chan; H.Huang; I.Fenton; D.Fong . *Biochemical Pharmacology* **55. 1998**, 1955
- [17] E.Asente Appiah; A.Skalka; *Molecular Mechanisms In Retrovirus DNA Integration. Antiviral Research* **36.1997**, 139

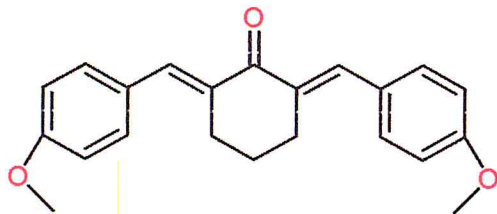
- [18] B.B.Aggarwal ; I.D.Bhatt ; H.Ichikawa ; K.S.Ahn; G.Sethi ; S.K.Sandur *Curcumin– Biological And Medicinal: The Genus Curcuma*, **2006**, 297
- [19] S.Venkateswarlu; M. Rambabu; G.V. Subbaraju ; S.Satyanarayana; *Asian Journal Of Chemistry* **12.2000**, 141
- [20] U.Das; J.Alcorn; A.Shrivastav; R.Sharma; E. Clercq; J. Balzarini; *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2007**, 71
- [21] U. Das; M. Kawase ; H.Sakagami ; A.Ideo ; J.Shimada,; J. Molnar; Z. Barath ; Z. Bata,; *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2007**, 3373
- [22] U.Das ; P.Selvakumar ; R.K.Sharma ; T.A.Haas ; *European Journal of Medicinal Chemistry*.**2007**, 451
- [23] J.R.Dimmock ;V.K.Arora ; S.L.Wonko; N.W.Hamon; J.W.Quail; Z.Jia ; J.S.Lee; *Leukemia Cells, Drug Des Deliv*. **1990**, 183
- [24] G. Liang ; L.Shao; Y. Wang ; C. Zhao; Y. Chu ; J. Xiao; Y. Zhao; X. Li; S.Yang; *European Journal of Medicinal Chemistry*.**2009**, 2623
- [25] J.R. Dimmock ; M.P. Padmanilayam ; R.N. Puthucode ; A.J. Nazarali ; N.L. Motaganahalli ; G.A. Zello,; J.W. Quail; E.O. Oloo; H. B. Kraatz,; J.S. Prisciak ; T.M. Allen; ; *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2001**, 586
- [26] D.A.Skoog; D.M. West; F.J. Holler ; *Chimie Analytique Ed. De Boeck*, **1991**,11
- [27] T.C.Zerarka ; Méthodes Spectroscopiques D’analyses Chimiques *Office Des Publications Universitaires*.**1994**, 13
- [28] J.Mendham; R.C.Denney; J.D.Barnes; M.J.K.Thomas, *Analyse Chimique Quantitative De Vogel Ed. Boeck & Larcier*. **2006**, 134
- [29] S.Webster; S. Kiemle, *Identification Spectroscopique De Composés Organique* , 2<sup>ème</sup> Edition De Boeck Université.**2007**,155
- [30] V.Amico; R.Currenti; G.Oriente ; M. Piattelli ; C. Tringali,; *A Phloroglucinol Derivative From The Brown Alga Zonaria Tournefortii Phytochemistry*.**1981**,1451
- [31] T. Ainane,; Valorisation De La Biomasse Algale Du Maroc : *Thèse De Doctorat, Université Hassan Ii – Casablanca*,**2011**, 403
- [32] S.Venkateswarlu; A. Krishnaraju ; V. Sushruta; G.V. Subbaraju. *Asian Journal of Chemistry*, **14 . 2002** , 409
- [33] Y.Sasaki; H.Goto; C. Tohda; F. Hatanaka; N.Shibahara; Y.Shimada ; K.Terasawa; *Biologica And Pharmaceutical Bulletin*.**2003**, 1135

- [34] J.M.Ringman; S.A.Frautschy; G.M Cole; D.L.Masterman ; S.Cummings, *Alzheimer Research*,**2005**,131
- [35] K.Becker ; D. Harmsen; A. Mellmann ; C. Meier ; P.Schumann ; G. Peters; *Journal Of Clinical Microbiology*, **2004**, 4988
- [36] V.Lampe; *Synthese von Curcumin. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **51**,1918, 1347
- [37] Pavollini T; F.Gambarin; A.Grinzato ; A.M. Curcumina e curcuminoidi. *Annali di Chimica (Rome)*, **1950**, 280
- [38] H.J.J.Pabon ; *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-bas*,**1964**, 379
- [39] M.K.Krackov; H.Bellis; *Brevet PCT WO 97/16403 (1997). Chemical Abstracts*; **1997**, 17480
- [40] H.H.Tonnesen ; j.Karlsen; V.Henegouwen; *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*.**1986**,116
- [41] P.H.Bong; *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **2000**, 81
- [42] A.N.Nurfina ;M.S. Reksohadiprodjo; H. Timmerman;U.Jenie;. A. Sugiayanto, *European Journal Of Medicinal Chemistry*,**1997**, 32
- [43] M.Ali ; A. Bagati; A Gupta; *Indian Journal Of Chemistry*, ,**1995**.884
- [44] H.Tonnesen ;H.Karlsen,; *Zeitschrift FürLebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, ,**1986**, 215
- [45] A.Nouara Ziani; B.Assia Sid ;C.Albert Demonceau *European Journal of Chemistry*,**2013**, 123
- [46] R.B. Aher ; G. Wanare ; N. Kawathekar; D. Sahal ; *Medicinal Chemistry Letters*,**2011** 154
- [47] W.Usama ;A. Hawas; A. Mohamed ;B. Al-Omar ;E.Abdel Galil ;B. Amr ; G.Abu El-Ftough ;A. Hammam ; *Arabian Journal of Chemistry*,**2012**, 509
- [48] A.M.Katsori; A. Chatzopoulou ; K. Dimas ; C. Kontogiorgis ; A. Patsilnakos ; *European Journal of Medicinal Chemistry* ,**2011**, 134
- [49] M.C. Pibiri; Assainissement microbiologiques de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, Thèse de Doctorat de la Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit LAUSANNE, **28**, **2005**.
- [50] A. ZHIRI; Aromathérapie.; Nutranews ; Ed: FONDATION LIBRE CHOIX, 2-16, **2006**.

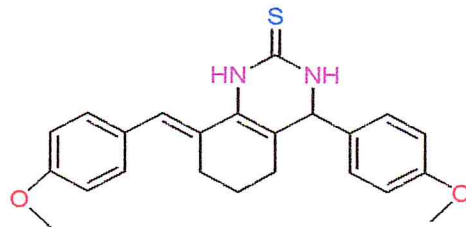
- [51] Anonyme; Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale, 5<sup>ème</sup> édition, 112, 15, 2008.
- [52] E. Jawetz; J.-L. Melnick; E.-A. Adelberg; « *Microbiologie médicale* », Presses Université Laval, 1973, 629.
- [53]. I. Parejo; F. Viladomat; J. Bastida; A. Rosas-Romero; N. Flerlage; J. Burillo and C. Codina. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J. Agric. Food. Chem*, 50, 2002, 6882.
- [54] W. Usama; Hawars ; D.Mohamed ;A.Al-Omar;E.abd elgalil;E.Amr; G.Hammam  
ARBIAN JOURNAL OF CHEMISTRY 2012 509
- [55] W. Brand-Williams; M.E. Cuvelier ; and C. Berset; Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft and Technology*, 28, 1995, 25
- [56] J. C. Smith, M. Karplus; *J. Am. Chem. Soc*, 114, 805., 1992.
- [57] T. Shimanouchi; *Pure Appl. Chem*, 7, 131. 1963.
- [58] Frankie Tristram; Viviane Durier; Gérard Vergoten; *Journal of Molecular Structure.*, 378, 249-256 1996.
- [59] B.J. Alder ;T. E. Wainwright, *J. Chem. Phys*, 27, 1208., 1957.
- [60] A. Rahman;, *Phys. Rev*, 136, A 405. 1964.
- [61] A. Rahman; F. H. Stillinger, *J. Chem. Phys.*, , 5, 3336, 1971.

# ANNEXE

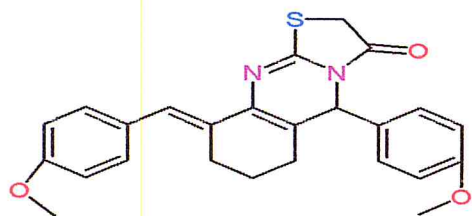
## Formulaire des produits



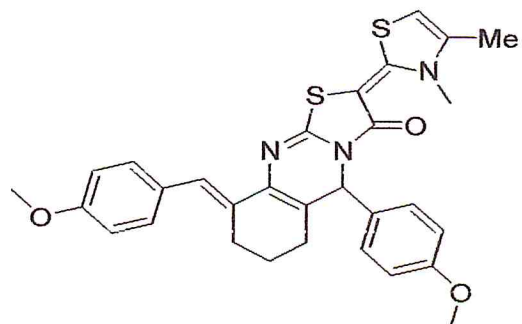
S1



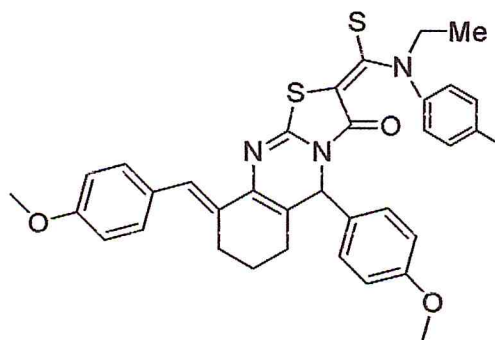
S2



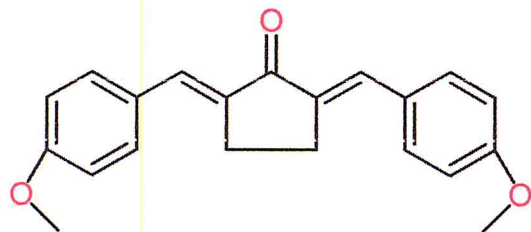
S3



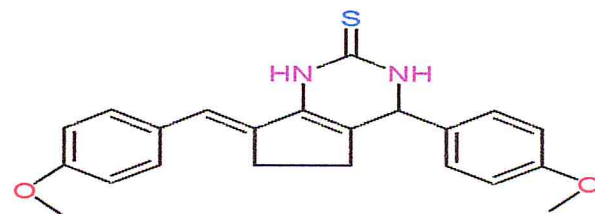
S4



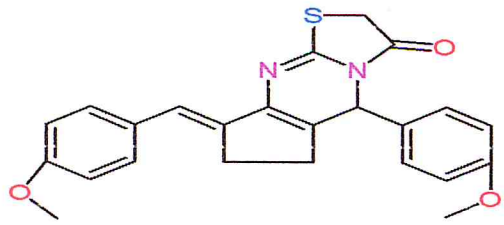
S5



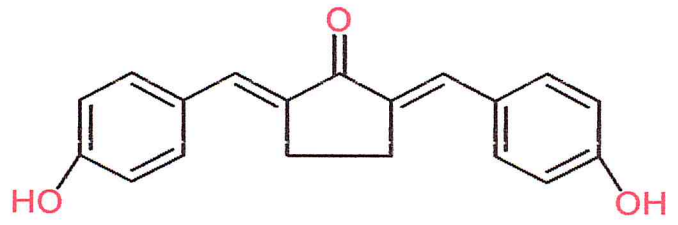
D1



D2



**D3**



**B1**

