

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de La Recherche Scientifique
Université de Saad Dahleb Blida-1-



Faculté des Sciences
Département de Chimie

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2

Option

Chimie Appliquée

Thème

**Synthèse et activité antioxydante d'une série de
nitrones à base de produit naturelle.**

Présentée et Soutenue par : M^{elle} AMIMOUSSI Amira le 03-10-2019

Devant les jurys :

| | | | |
|--------------|-----------------------------|-----|------|
| Présidente : | M ^{me} A. BESSI | MCB | USDB |
| Examineur : | M ^f A. AIT YAHIA | MAA | USDB |
| Promotrice : | M ^{me} K. HAMZA | MAA | USDB |

Année universitaire :
2018-2019

Remerciement

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».

Je tiens tout d'abord à remercier le miséricordieux **Allah** à qui je dois tout.

J'exprime mes profonds remerciements à ma promotrice, **M^{me} HAMZA Kahina** pour l'aide compétente qu'elle m'a apportée, pour sa patience et son encouragement. Son œil critique m'a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections.

Je remercie ensuite l'ensemble des membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir étudier avec attention mon travail.

Je voudrais aussi remercier en particulier **M^{me} BESSI Assia**, pour son grand honneur d'avoir accepté le jugement de mon travail.

Je remercie sincèrement **M^r AIT YAHIA Ahmed**, Pour son aide, ses conseils et sa gentillesse, je tiens à lui exprimer ma gratitude et mon grand respect.

Je tiens à remercier mes collègues pour leurs aides dans la réalisation de ce mémoire.

Que mes vifs remerciements aillent à mes enseignants de **la faculté des Sciences Blida 1**, pour ces années enrichissement.

Je remercie également tous le personnel de laboratoire au niveau de pavillon 5 de l'Université Saad Dahlab Blida1 : **M^{me} HADAD**, **M^r CHWAKI** et **M^{me} OUIAZRI** pour son soutien et tous ses conseils scientifiques.

Que tous ceux qui m'ont aidé, de près ou de loin, à mener à bien ce travail Trouvent ici ma reconnaissance et ma gratitude.

DÉDICACES

Je dédie cet humble travail avec grand amour

Sincérité et fierté :

*A mon cher père, mon premier encadrant, depuis Ma
Naissance.*

*A ma très chère mère, qu'elle trouve ici l'hommage de Ma
gratitude, source de tendresse et d'amour.*

*A mon adorable sœur, Sabrina, je souhaite que vous Soyiez
chanceuse.*

*A mon cher frère, Khaled, je vous souhaite un bel Avenir, plein
de réussite.*

*À mes deux chères grands-mères, qu'Allah lui accorde Une
longue vie inshallah.*

A ma cousine Ikram et son fils Abderrahmane.

*Pour toute ma grande famille et tous mes ami(e)s qui sont chers,
Particulièrement :*

*Yamna; Nawal; Nesrine; Selma; khawla ; Dalal ; Houda ; Amel ;
Djauida;...*

*Que Allah le tout puissant vous préserve tous et vous
Procure sagesse et bonheur.*

Amira

Sommaire

Remerciement

Dédicaces

ملخص

Résumé

summary

Liste de figures

Liste des schémas

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

Chapitre I : Généralité sur les nitrones.

I.1- Définition..... 2

I.2- Nomenclature..... 2

I.3- Historique sur les Nitrones..... 3

I.4- Préparation des nitrones..... 3

I.5- Applications des nitrones..... 5

 I.5.1- Nitrones aux propriétés de piégeage et antioxydantes..... 6

 I.5.2- Synthèse de produits naturels..... 6

I.6- Propriétés pharmacologiques..... 6

I.7- Activité anti-inflammatoire.....7

I.8- Bioactivités.....7

Chapitre II : partie expérimentale.

II.1- Appareillages et produits.....8

 II.1.1- Appareils8

 II.1.2- Produits.....8

II.2- Préparation de la β -phénylhydroxylamine.....9

 II.2.1- Mode opératoire.....9

II.3- Condensation des aldéhydes aromatiques sur la β -phénylhydroxylamine.....11

II.4- Activité antioxydante.....12

 II.4.1 - Test de piégeage du radical libre DPPH.....12

 II.4.2 - Méthode de la β -carotène.....12

 II.4.2- Test de la réduction du fer FRAP.....13

Chapitre III : Résultats et discussions.

| | |
|--|----|
| III.1- Préparation des nitrones..... | 15 |
| III.1.1- Préparation de la β -phénylhydroxylamine..... | 15 |
| III.1.2- Condensation des aldéhydes aromatiques sur la β -phénylhydroxylamine..... | 15 |
| III.2- Analyse spectrale des nitrones synthétisées..... | 17 |
| III.2.1- Etude spectrophotométrique en UV-Visible..... | 17 |
| III.2.2- Etude par spectrophotométrie infrarouge IR..... | 20 |
| III.3- L'activité antioxydantes..... | 26 |
| III.3.1- Introduction..... | 26 |
| III.3.2- Test de piégeage du radical libre DPPH..... | 27 |
| III.3.3- Test de la réduction du fer FRAP..... | 28 |
| III.3.4- Méthode de la β -carotène..... | 29 |
| Conclusion générale..... | 32 |
| Références bibliographiques. | |

ملخص

بالنظر إلى النشاط البيولوجي المكثف للمركبات غير المتجانسة من ناحية ، والنشاط المضاد للأوكسدة المثير للاهتمام النتروونات من ناحية أخرى ، فقد ربطنا خصائص الكسح الجذري الحرة لوظيفة النيترون مع الخصائص العلاجية للالأدهيدات الطبيعية غير المتجانسة.

في الجزء الأول من هذه الرسالة ، قمنا بتخليق نيتروونات حلقيه غير متجانسة عن طريق تكتيف الأدهيدات المختلفة غير المتجانسة على فينيل هيدروكسيل أمين .تمت دراسة خصائص جميع المنتجات المركبة بالأشعة تحت الحمراء والأشعة فوق البنفسجية الطيفية . هذا سمح لنا للتحقق من وجود وظائف النيترون.

في الجزء الثاني ، قمنا بإجراء تقييم لنشاط مضادات الأوكسدة في النتروونات المصنعة بواسطة ثلاثة اختبارات كيميائية ، طريقة تبييض β كاروتين ، وطريقة " FRAP المضادة للتأكسد الحديديك" وطريقة محاصرة الجذور الحرة " DPPH 1-diphenyl-2-picrylhydrazule 1

أظهرت هذه الاختبارات أن طريقة DPPH ليست مناسبة للغاية لتقييم نشاط مضادات الأوكسدة من النيترات الحلقيه غير المتجانسة .ويعزى ذلك إلى تأثير ستريك الناتجة عن هذا الجزيء.

من ناحية أخرى ، فإن النتائج التي تم الحصول عليها عن طريق طرق أخرى تظهر فعالية هذه النتروونات مع أنشطة أكبر من المراجع توليف المواد المضادة للاكسدة.

الكلمات المفتاحية: النيترون ، مضادات الأوكسدة ، DPPH ، FRAP ، كاروتين

Résumé

Compte tenu des activités biologiques très étendues des composés hétérocycliques d'une part, et de l'activité antioxydante très intéressante des nitrones d'autre part, nous avons associé les propriétés de piégeage des radicaux libres de la fonction nitroène aux propriétés thérapeutiques des aldéhydes hétérocycliques naturels.

Dans la première partie de ce mémoire nous avons réalisé la synthèse des différents nitrones hétérocycliques par condensation des différents aldéhydes hétérocycliques sur la β -phénylhydroxylamine. Tous les produits synthétisés ont été caractérisés par spectroscopie IR et UV. Cela nous a permis de vérifier l'existence des fonctions nitrones.

Dans la deuxième partie nous avons effectué l'évaluation de l'activité antioxydante des nitrones synthétisées par trois tests chimiques, la méthode de blanchiment β -carotène, la méthode de FRAP « ferric réducting antioxydant » et la méthode de piégeage du radical libre DPPH « 1,1-diphényl-2-picrylhydrazole ».

Ces tests ont montré que la méthode DPPH n'est pas très adaptée pour l'évaluation de l'activité antioxydante des nitrones hétérocycliques. Cela est attribué à l'effet stérique engendré par cette molécule.

D'autre part, les résultats obtenus par les autres méthodes montrent l'efficacité de ces nitrones avec des activités supérieures à celle des antioxydants des références de synthèse.

Mots clés : nitroène, antioxydant, DPPH, FRAP, β -carotène

Abstract :

Considering the very wide biological activities of heterocyclic compounds on the one hand, and the very interesting antioxidant activity of nitrones, on the other hand, we have associated the free radical scavenging properties of nitronone function with the therapeutic properties of natural heterocyclic aldehydes.

In the first part of this work, we realized the synthesis of different heterocyclic nitrones by condensation of different heterocyclic aldehydes on β -phenylhydroxylamine. All synthesized products have been characterized by IR and UV spectroscopy. This allowed us to verify the existence of nitronone functions.

In the second part we carried out the evaluation of the antioxidant activity of the synthesized nitrones by three chemical tests, the β -carotene bleaching method, the FRAP "ferric reducing antioxidant" method and the method of trapping the free radical DPPH "1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine".

These tests showed that the DPPH method is not very suitable for evaluating the antioxidant activity of heterocyclic nitrones. This is attributed to the steric effect generated by this molecule.

On the other hand, the results obtained by the other methods show the effectiveness of these nitrones with activities greater than that of antioxidant synthesis references.

Key words: nitronone, antioxidant, DPPH, FRAP, β -carotene

Listes des figures

| | |
|---|----|
| Figure n° 1 : Les étapes de la préparation de la β -phénylhydroxylamine..... | 10 |
| Figure n° 2 : Spectres UV des nitrones synthétisées (I, II, III, IV, V et VI) dans l'éthanol...19 | 19 |
| Figure n° 3 : Spectres UV des nitrones synthétisées (VII et VIII) dans l'éthanol.....20 | 20 |
| Figure n° 4 : Spectres IR des Nitrones (I et II).....21 | 21 |
| Figure n° 5 : Spectres IR des Nitrones (III et IV).....22 | 22 |
| Figure n° 6 : Spectres IR des Nitrones (V et VI).....23 | 23 |
| Figure n° 7 : Spectres IR des Nitrones (VII et VIII).....24 | 24 |
| Figure n° 8 : Réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant.....27 | 27 |
| Figure n° 9 : Histogramme de la variation de l'activité des nitrones synthétisées évaluée par la méthode DPPH.....28 | 28 |
| Figure n° 10 : Histogramme de la variation de l'absorbance à 700nm des nitrones synthétisée obtenue lors du test d'évaluation de l'activité antioxydant (FRAP).....29 | 29 |
| Figure n° 11 : La structure de la bêta-carotène.....30 | 30 |
| Figure n° 12 : Activité antioxydante des nitrones synthétisées obtenue lors du test de blanchiment de β -carotène.....31 | 31 |

Listes des schémas

| | |
|---|---|
| Schéma n° 1 : Structure générale d'une nitrone..... | 2 |
| Schéma n° 2 : Délocalisation de la charge positive du groupe nitrone..... | 2 |
| Schéma n° 3 : α -benzoyl-N-phénylnitronne..... | 3 |
| Schémas n° 4 : Condensation de cétones et d'hydroxylamines..... | 4 |
| Schéma n° 5 : Formation d'une imine entre une hydroxylamine et un aldéhyde..... | 4 |
| Schéma n° 6 : réaction de N-alkylhydroxylamines et d'hydroxylamine aqueuse avec des allènes monosubstitués..... | 4 |
| Schémas n° 7 : L'oxydation directe d'amines secondaires en nitrones..... | 5 |
| Schémas n° 8 : Synthèse efficace et sans métal de transition de (Z) -N-arylnitrones dans des conditions douces..... | 5 |
| Schéma n° 9 : Synthèse de cétonitrones insaturés N-alkylés à partir de propargyloxyamines... | 5 |

Listes des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau (1) : liste de produits utilisés..... | 8 |
| Tableau (2): Les rendements des nitrones obtenues..... | 11 |
| Tableau (3) : Le rendement (Rdt) et le rapport frontal (R_f) par CCM sur le gel de silice et la point de fusion (P_f) de la β -phénylhydroxylamine..... | 15 |
| Tableau (4) : Nomenclatures et structures des nitrones synthétisées..... | 16 |
| Tableau (5) : Caractéristique physico-chimiques et les rendements des nitrones synthétisées..... | 17 |
| Tableau (6) : caractérisation spectrale en UV-Visible des nitrones synthétisées..... | 18 |
| Tableau (7) : caractérisations spectrales en infrarouge des nitrones synthétisées..... | 25 |
| Tableau (8) : L'absorbance à 517 nm et l'activité antioxydante de chaque nitrone synthétisée..... | 27 |
| Tableau (9) : L'absorbance à 700nm des nitrones synthétisée obtenue lors du test d'évaluation d'activité antioxydante par la méthode FRAP..... | 29 |
| Tableau (10) : Absorbance à 490 nm et Activité antioxydant des nitrones synthétisées obtenues lors du test de blanchiment de β -carotène..... | 30 |

Introduction

Générale

Introduction générale

Le déséquilibre entre la production d'espèces oxygénées et azotés réactives et les défenses antioxydants est définie comme un stress oxydant. Ce phénomène est associé à de nombreuses pathologies telles que des maladies neurodégénératives et cardiovasculaires ou des cancers. Pour contrecarrer les dégâts causés par le stress oxydant, l'utilisation d'antioxydants synthétiques s'est avérée très avantageuse.

Les nitrones se sont révélées, des antioxydantes très intéressantes, utilisées in-vitro et in-vivo. Parmi ces nitrones, la 5,5 diméthylpyrroline-N-oxyde (DMPO), L'alpha-phényl-N-tert-butylnitron (PBN) ainsi que la α -4-pyridyl-1-oxide-N-tert-butylnitron (POBN) qui ont été très largement étudiées. Cependant, malgré la capacité que possèdent ces nitrones à piéger de nombreux radicaux libres, et à réduire les dommages causés par ces derniers, La recherche de nouvelles nitrones plus efficaces, plus soluble dans le milieu biologique et moins toxique pour les cellules est en perpétuelle expansions.

L'objectif de notre travail rentre dans ce contexte, il consiste en :

- 1- La synthèse et caractérisation de nouveaux nitrones à base d'aldéhydes naturelles.
- 2- L'évaluation de l'activité anti-oxydante de ces nitrones par trois méthodes : la méthode de DPPH, blanchissement du β -carotène et la méthode de FRAP.

Ce manuscrit est organisé en trois chapitres suivants :

- Un premier chapitre qui présentera un rappel bibliographique sur les nitrones, leurs méthodes de synthèse et leurs applications.
- Un deuxième chapitre qui regroupe l'ensemble du matériels et méthodes utilisés.
- Un troisième chapitre consacré aux résultats expérimentaux. Une partie de ce dernier sera consacrée à la synthèse et caractérisation des nitrones, et l'autre partie sera réservée aux résultats des tests de l'activité antioxydant des nitrones synthétisées.

On terminera par une conclusion générale.

Chapitre I
Etude
Bibliographique

I.1- Définition :

Une nitronne est un amine-oxyde (N-oxyde) d'une imine, elle peut être vue comme un N-alkyloxime. C'est un groupe fonctionnel. La structure générale est $R_1R_2C=N^+R_3O^-$ où R_3 est différent de H[1].

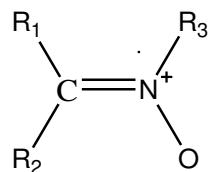


Schéma n° 1 : Structure générale d'une nitronne [1].

I.2-Nomenclature :

Le nom nitronne est obtenu par la contraction du nom azote cétone. La fonction nitronne est capable de résonance comme indiqué dans le schéma n° 2. La structure (A) semble être la forme de contribution la plus importante.

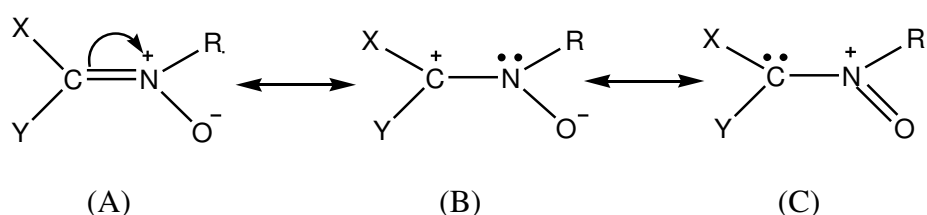
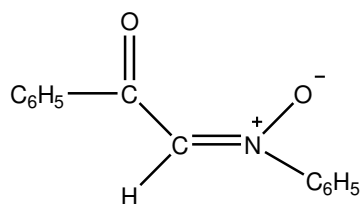


Schéma n° 2 : Délocalisation de la charge positive du groupe nitronne.

Lorsque le groupe nitronne fait partie d'un système aromatique (pyridine et N-oxydes de quinoléine) est considérable comme la délocalisation de la charge positive et il n'est donc pas considéré que la réactivité du groupe nitronne est identique. De plus, si X ou Y = oxygène faisant partie d'un système cyclique (isoxazoline-2-oxyde et furoxanes), une réduction similaire des propriétés se produit également. Cependant, si X ou Y = aryle, alkyle ou cétone, les propriétés ne sont pas réduites. Lorsque X ou Y sont des groupes attracteurs d'électrons, les propriétés électrophiles des groupes sont améliorées. Par exemple, l' α -benzoyl-N-phénylnitronne subit une 1,3-cycloaddition 110 fois plus rapidement que l' α -N-diphénylnitronne.

La nomenclature des résumés chimiques pour les nitronnes utilise le préfixe α pour les groupes liés à l'atome de carbone et N pour les groupes liés à l'azote [1]. Par exemple :

Schéma n° 3: α -benzoyl-N-phénylnitronium. [1]

I.3 -Historique sur les Nitrones :

L'évolution de la science des nitrones avec les années de 1957 jusqu'à maintenant...

| | | | | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|----------|
| 1957 | 1959 | 1969 | 1975 | 1985 | 1990 | 1998 | 2003 | 2007 ... |
|------|------|------|------|------|------|------|------|----------|

1^{er} synthèse de PBN (nitronium linéaire).

1^{er} synthèse de DMPO (nitronium cyclique).

Nitrones, piègeurs de radicaux libres (systèmes chimiques).

Nitrones, piègeurs de radicaux libres (système biologique).

Activité pharmaco-protectrice.

Activité neuro-protectrice.

Activité anti-âge.

Activité contre le cancer [2].

I.4 -Préparation des nitrones :

Pour la préparation des nitrones, la méthode la plus populaire est la condensation d'aldéhydes ou de cétones avec des hydroxylamines N-monosubstituées. Cependant, cette méthode est difficile à appliquer à la préparation de nitrones cycliques non conjuguées et de cétonitrones ayant des groupes alkyles volumineux.

L'oxydation directe d'amines secondaires en nitrones correspondantes a également été étudiée au cours de ces deux décennies et s'est révélée être une méthode utile pour la préparation de nitrones [3].

Dans des conditions thermiques simples, qui avaient déjà démontré leur aptitude à minimiser la décomposition de l'hydroxylamine (t-BuOH, 110 ° C), permettaient la condensation de cétones et d'hydroxylamines pour former des cétonitrones exocycliques, acycliques et α - β -insaturés avec des substituants azotés linéaires et azotés ramifiés modérés à excellents isolés [3].

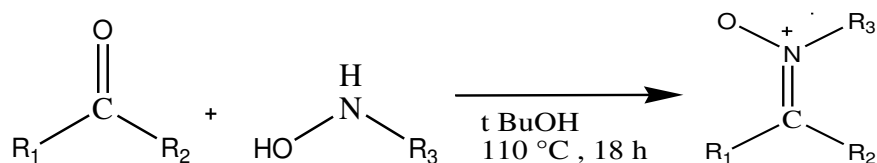


Schéma n° 4: La condensation des cétones et d'hydroxylamines [3].

La voie de préparation la plus importante des nitrones part des hydroxylamines. Les nitrones à chaînes ouverte sont préparées en général simplement par la formation d'une imine entre une hydroxylamine et un aldéhyde (Schéma n° 5) [4].

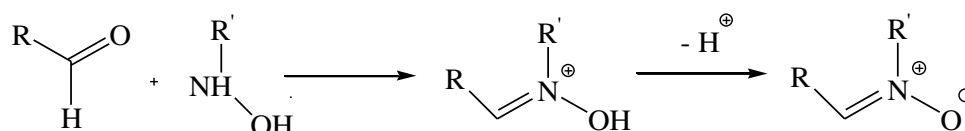


Schéma n° 5: Formation d'une imine entre une hydroxylamine et un aldéhyde [4].

La réaction de N-alkylhydroxylamines et d'hydroxylamine aqueuse avec des allènes monosubstitués donne respectivement des nitrones et des oximes avec de bons rendements. Les calculs de la théorie fonctionnelle de la densité (TFD) soutiennent un processus d'hydroamination de type Copé concerté à cinq membres, et les énergies calculées aux états de transition concordent parfaitement avec les observations expérimentales [5].

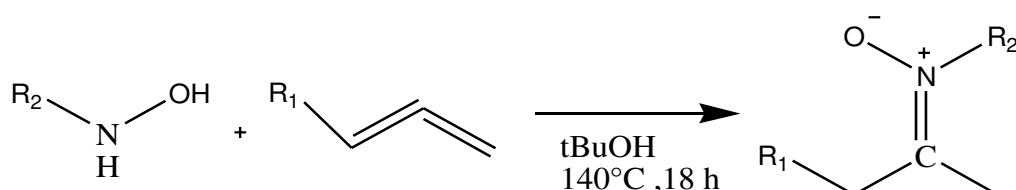


Schéma n° 6 : réaction de N-alkylhydroxylamines et d'hydroxylamine aqueuse avec des allènes monosubstitués [5].

Un protocole général, efficace et sans métal, pour l'oxydation directe d'amines secondaires en nitrones, tolère d'autres groupes fonctionnels ou des centres stéréogènes existants en utilisant Oxone dans un milieu basique biphasique comme seul oxydant [6].

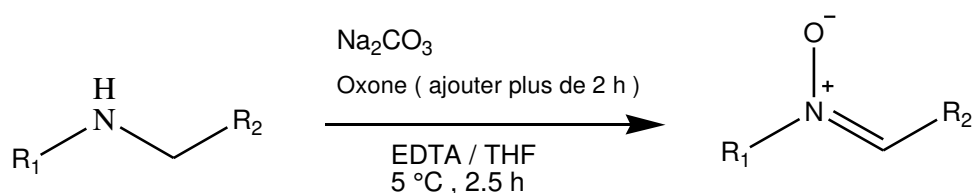


Schéma n° 7 : L'oxydation directe d'amines secondaires en nitrones [6].

Un couplage direct de N-nosylhydrazones avec des nitrosoarènes permet une synthèse efficace et sans métal de transition de (Z) -N-arylnitrones dans des conditions douces. Le protocole est compatible avec une large gamme de groupes fonctionnels et fournit les nitrones correspondantes avec de très bons rendements par un simple processus de recristallisation [7].

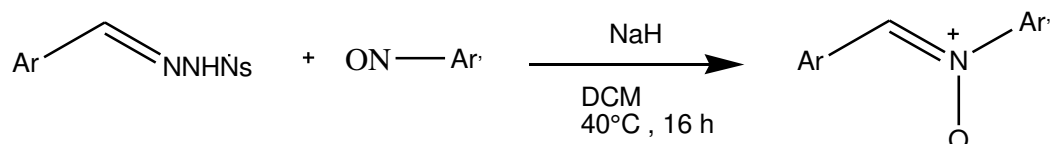


Schéma n° 8 : Synthèse efficace et sans métal de transition de (Z) -N-arylnitrones dans des conditions douces [7].

La catalyse par le Cu permet la synthèse de cétonitrones insaturés N-alkylés à partir de propargyl oxyamines. La réaction de réarrangement se déroule par hydroamination intramoléculaire catalysée au Cu, suivie de l'ouverture du cycle électrocyclique par induction thermique [8].

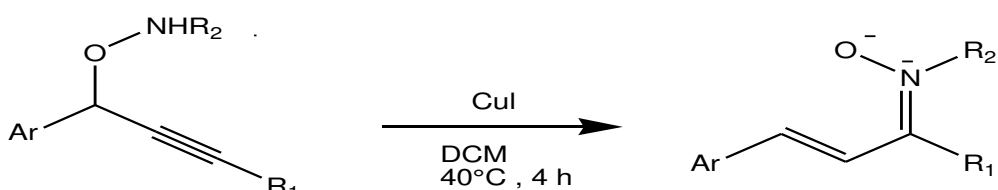


Schéma n° 9 : Synthèse de cétonitrones insaturés N-alkylés à partir de propargyloxyamines [8].

I.5 -Application des nitrones :

Les nitrones occupent une place importante dans la chimie organique. Elles représentent des composés intermédiaires dans la synthèse de beaucoup de produits d'intérêt biologique ; elles sont utilisées dans le piégeage des radicaux libres [9].

I.5.1-Nitrones aux propriétés de piégeage et antioxydante :

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre la production d'espèces oxygénées et les réactifs antioxydants. Ce phénomène est associé à de nombreuses pathologies telles que des maladies neurodégénératives et cardiovasculaires ou des cancers. Pour contrecarrer les dégâts causés par le stress oxydant, l'utilisation d'antioxydants synthétiques s'est avérée intéressante, il est alors possible de modifier les propriétés physico-chimiques des antioxydants et de leur assurer un meilleur ciblage cellulaire et tissulaire.

L'alpha-phényl-N-tert-butylnitron (PBN), est une des nitrones qui présente une bonne activité pharmacologique contre les dégâts liés aux radicaux libres, et qui est également largement utilisée en tant que sonde analytique pour l'identification d'espèces radicalaires par la technique de piégeage de spin couplée à la résonance paramagnétique électronique (RPE) [10].

I.5.2- Synthèse de produits naturels :

La méthodologie de préparation d'une large gamme de produits naturels et leurs dérivés tels que les lactones, lactames et les complexes nucléosides ; ceci en se basant sur la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre les C-alkoxycarbonylnitrones et une variété d'alcènes substitués. L'insertion de centres chiraux en α de la fonction nitron ou la présence d'auxiliaires chiraux qui sont des substituants chiraux liés à l'atome d'azote permet une synthèse énantioselective de ces composés [9].

I.6- Propriétés pharmacologiques :

Les nitrones ont également été utilisées dans le cadre d'expériences biologiques afin d'évaluer si leurs propriétés de piégeage des radicaux libres pouvaient avoir un effet protecteur sur des cellules ou des organismes exposés à un stress oxydant. Les premières recherches ont débuté dès 1985, lorsque Novelli et Coll. ont découvert que la PBN possédait une activité protectrice dans les cas d'ischémies cérébrales [9].

I.7 -Activité anti-inflammatoire :

L'anti-inflammatoire, désigne une substance qui s'oppose ou combat l'inflammation. De façon générale l'inflammation correspond à un ensemble de phénomènes survenant à un point d'irritation après l'invasion par un agent pathogène (susceptible d'engendrer une maladie). À la suite d'une agression constituée par une blessure, une infection ou un traumatisme consécutif à un acte chirurgical, il se crée dans l'organisme ce que l'on appelle une inflammation. Classiquement, une inflammation se manifeste par quatre signes principaux : rougeur, chaleur, tuméfaction (gonflement), douleur. Le mécanisme inflammatoire fait intervenir un grand nombre de substances présentes dans le sang, entre autres de nombreuses hormones, comme les prostaglandines, l'histamine, des compléments, les cytokines participent à l'inflammation [11].

La PBN est connue depuis plusieurs années pour ses activités protectrices. En effet, elle a été considéré comme agent anti-inflammatoire dans certains contextes expérimentaux [9].

I.8 -Bioactivités :

Le monde de la santé et du cosmétique s'intéresse de plus en plus aux dérivés de chitine et de chitosane (Polysaccharide, Biopolymère) en raison de leur origine naturelle, leur biocompatibilité, leur biodégradabilité, et de leur faible toxicité et surtout de leurs activités biologiques. Les propriétés biologiques les plus remarquables, sont les activités antitumorales et antimicrobiennes, les effets analgésiants et hémostatiques et les propriétés d'adhésion avec les muqueuses et les cellules [12].

Chapitre II
Partie
Expérimentale

II.1 -Appareillage et produits :**II.1.1- Appareils :**

-Les spectres IR des produits synthétisés ont été analysés à température ambiante, à l'aide d'un appareil de marque JVSCO-4100. Les pastilles de KBr sont préparées en mélangeant à l'aide d'un mortier (4-8mg) de l'échantillon dans 40-80mg de KBr. La position des bandes caractéristiques est donnée en cm^{-1} .

-Les points de fusion des produits synthétisés ont été mesurés en tube capillaire à l'aide d'un appareil Stuart de Type SMP3.

-Les spectres UV-Visible des nitrones ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, de marque SHIMADZU, type 1800.

II.1.2 -Produits :

Les produits utilisés dans notre travail sont réunis dans le tableau (1) :

Tableau (1) : liste de produits utilisés.

| Produit | Origine | Pureté |
|--|---------------|--------|
| Ethanol | Sigma-Aldrich | 99,8 |
| Diéthyl éther ((C ₂ H ₅) ₂ O) | Sigma-Aldrich | 99,5 |
| Ether de pétrole | Sigma-Aldrich | 95 |
| Acétate d'éthyle | Sigma-Aldrich | 99,5 |
| Nitrobenzène | Fluka | 99 |
| Chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl) | Sigma-Aldrich | 99,5 |
| Zinc en poudre | Merck | 98 |
| Chlorure de sodium (NaCl) | Sigma-Aldrich | 99,5 |
| Furaldehyde | Fluka | 99 |
| 5-Nitro-2-furaldehyde | Merck | 99 |
| 5-NitroIndol-3-carbaldehyde | Merck | 98 |
| 7-azaindole-3-carboxaldehyde | Merck | 98 |
| Piperenal | Merck | 99 |
| Indole-3-carboxaldehyde | Sigma-Aldrich | 99,9 |
| Pyridine | Sigma-Aldrich | 99,6 |
| L'imidazole | Fluka | 99 |

II.2 -Préparation de la β -phénylhydroxylamine :

Dans un erlenmeyer de 500 ml placé sur un agitateur magnétique chauffant, introduire 25 g de chlorure d'ammonium, 200 ml d'eau et 59 g de nitrobenzène. Ajouter petit à petit 59g (0,83mol) de zinc en poudre. Chauffer éventuellement légèrement vers 35 à 40 °C pour faciliter la réaction. Surveiller la température qui ne devra pas dépasser 65°C. Pour suivre l'agitation pendant un quart d'heure quand l'addition est terminée.

On observe la précipitation de l'oxyde de zinc qui se manifeste par un aspect blanchâtre. Filtrer à chaud, l'oxyde de zinc formé et rincer avec 100 ml d'eau chaude. Le filtrat est placé dans un erlenmeyer, saturé avec 300 g de chlorure de sodium puis placé dans un bain de glace. Filtrer sur Büchner lorsque la précipitation est terminée. On récupère le solide qui est un mélange de N-phénylhydroxylamine et de chlorure de sodium. Ne pas jeter le filtrat.

Le solide est dissous dans diéthyle éther pour éliminer toute trace de composés inorganiques. Sécher la phase organique sur carbonate de sodium anhydre. Evaporer le solvant à l'évaporateur rotatif, des cristaux jaunes de β -phénylhydroxylamine sont obtenus. Sécher à l'air libre sur papier filtre, en écrasant bien le solide à l'aide d'une spatule. On observe un "blanchiment" du produit, alors que le papier filtre jaunit par fixation du reste de nitrobenzène.

La recristallisation de ce dernier dans l'éther de pétrole nous donne 23.55 g de β -phénylhydroxylamine sous forme de cristaux blancs. Pour améliorer le rendement il est possible de reprendre le filtrat par extraction à l'éther, séchage de la phase organique et évaporation du solvant. La deuxième fraction de produit obtenu ne sera pas mélangée à la précédente. Les étapes de cette préparation sont données dans la figure n°1.

Cette réaction se fait sous contrôle thermique car, elle est exothermique et si on laisse la température dépasser 65 °C, on aura la réduction complète de la fonction nitro (formation d'aniline).

| | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| <p>(a) Mélange réactionnel sous agitation.</p> | <p>(b) Filtration sous vide du mélange réactionnel.</p> | <p>(c) Extraction de la phase organique.</p> |
|  |  |  |
| <p>(d) Séchage de phase organique avec du sulfate de sodium.</p> | <p>(e) Filtration de la phase organique.</p> | <p>(f) Évaporation du solvant.</p> |
|  |  |  |
| <p>(g) Recristallisation dans l'éther de pétrole.</p> | <p>(h) Filtration des cristaux.</p> | <p>(i) Solution de β-phénylhydroxylamine dans l'éthanol.</p> |

Figure n°1 : Les étapes de la préparation de la β -phénylhydroxylamine.

II.3- Condensation des aldéhydes aromatiques sur la β -phénylhydroxylamine :

La série de nitrones est synthétisée par condensation des aldéhydes aromatiques sur la β -phénylhydroxylamine, Ces nitrones ont été purifiées par recristallisation. Cette synthèse a été réalisée selon le mode opératoire général suivant :

A une solution d'aldéhyde approprié dans l'éthanol (50 ml), on ajoute une solution de β -phénylhydroxylamine dans l'éthanol (50 ml). On maintient ce mélange sous agitation à température ambiante pendant 3 h. On laisse décanter à température ambiante. On filtre et on récupère un composé solide [9]. Le tableau (2) rassemble les quantités des réactifs utilisés et des produits obtenus :

Tableau (2): Les rendements (Rdts) des nitrones obtenues.

| Nitronne | Mélange réactionnel | Rdt(%) |
|-------------|------------------------------|--------|
| I | β -phénylhydroxylamine | 71 % |
| | Furaldehyde | |
| II | β -phénylhydroxylamine | 93 % |
| | 5-Nitro-2-furaldehyde | |
| III | β -phénylhydroxylamine | 70 % |
| | 5-NitroIndol-3-carbaldehyde | |
| IV | β -phénylhydroxylamine | 49 % |
| | 7-azaindole-3-carboxaldehyde | |
| V | β -phénylhydroxylamine | 65 % |
| | Piperenal | |
| VI | β -phénylhydroxylamine | 82% |
| | Indole-3-carboxaldehyde | |
| VII | β -phénylhydroxylamine | 68,31% |
| | Pyridine | |
| VIII | β -phénylhydroxylamine | 84% |
| | L'imidazole | |

II.4 -Activité antioxydant :

II.4.1 -Test de piégeage du radical libre DPPH :

L'activité antioxydante in vitro a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl) selon la méthode ci-dessous :

- Pour préparer des solutions mères, on prend différentes masses de même concentrations ($5 \cdot 10^{-3}$ M) dans 10 ml d'éthanol.
- La solution de DPPH est préparée dans l'éthanol à raison de 4mg/100ml à l'avance (au moins 3 ou 4 heures) car la solubilisation est difficile.
- On prend 0,2 ml (200 μ l) de la solution mère pour chaque tube à essai dans 0,8 ml (800 μ l) de l'éthanol. Le test est répété 3 fois.
- Les solutions éthyliques sont additionnées de 1ml de la solution de DPPH.
- On incube à la température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes, l'absorbance est mesurée à 517 nm.
- Les solutions des antioxydantes de synthèse : vitamine C, l'hydroxytoluènebutylé (BHT) et PBN ont été préparées avec des même concentrations [14].
- L'activité antioxydante est estimée selon l'équation suivante:

$$AA \% = ([Abs_{DPPH} - Abs_{écha}] / Abs_{DPPH}) \times 100$$

Avec : AA : activité antioxydant, Abs_{DPPH}: absorbance de DPPH à 517 nm.

Abs_{éch} : absorbance d'échantillon à 517 nm.

II.4.2 -Méthode de la β -carotène :

Deux milligrammes de β -carotène ont été dissous dans 1 ml de chloroforme, la solution obtenue a été introduite dans un ballon de 50 ml contenant 0,025 ml (25 μ l) d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme sous vide (40 °C), 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène. De cette nouvelle solution, 2.5 ml ont été transférés dans un tube contenant 0.35 ml (350 μ l) de chaque solution mère à une concentration de ($5 \cdot 10^{-3}$) [15].

Ce système d'émulsion a été incubé pendant 48 heures à l'obscurité, avec répétition du même procédé pour l'antioxydant synthétique l'hydroxytoluène butylé (BHT), Vitamine C et PBN. L'absorbance a été mesurée à 470 nm et l'activité antioxydant relative (AAR) a été calculée selon la formule suivante:

$$\text{AAR (\%)} = (\text{Abs échantillon} / \text{Abs BHT}) \times 100 \text{ [15].}$$

II.4.3- Test de la réduction du fer FRAP :

❖ Préparation de la solution tampon :

Elle est préparée à partir des deux solutions suivantes :

- ✓ 125,5ml de KH_2PO_4 (di-hydrogène phosphate de potassium) à M/15 (9,08g de KH_2PO_4 par litre).
- ✓ 74,5ml de Na_2HPO_4 (di-sodium hydrogène phosphate) à M/15 (8,47g de Na_2HPO_4 par litre).

❖ Préparation des solutions mères :

Les solutions utilisées sont décrites comme suit :

- ✓ Solution de FeCl_3 (0,1%) : 1g de FeCl_3 dans 1000ml d'eau distillée.
- ✓ Solution $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%) : 10g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- ✓ Solution de trichloracétique (10%) : 100g de TCA dans 1000 ml d'eau distillé.
- ✓ Pour préparer des solutions mères, on prend différentes masses de même concentrations ($5 \cdot 10^{-3}$ M) dans 10 ml d'éthanol.

❖ Mode opératoire :

Un volume égal à 0,2 ml de solutions filles à partir d'une solution mère de concentration ($5 \cdot 10^{-3}$ M) est mélangé avec 1 millilitres d'une solution tampon phosphate (pH = 6.6) et 1 millilitres d'une solution de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Le tout est chauffé à 60°C au bain-marie pendant 20 minutes, puis refroidi à la température ambiante. Ensuite, 1 millilitres d'acide trichloracétique (TCA) sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 tpm pendant 10 minutes. 1 millilitres d'eau distillée et 0.1 ml d'une solution de ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) sont ajoutés également au mélange (la coloration vire au bleu). Enfin nous réalisons, pour l'échantillon ainsi préparé, la mesure de l'absorbance à 700 nm. Ces mesures sont répétées trois fois pour chaque concentration afin de prendre la valeur moyenne.

Le BHT, PBN et Vitamine C sont utilisés comme contrôles positifs dans cette expérience aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales [16].

Chapitre III

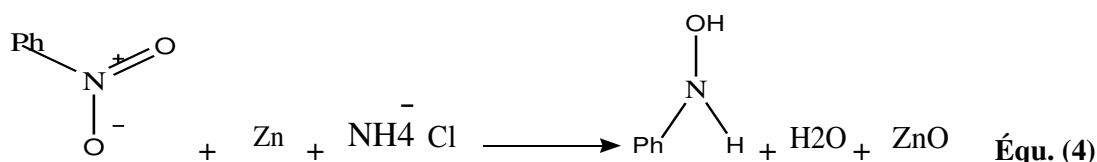
Résultats et Discussions

III.1- Préparation des nitrones :

Pour la préparation des nitrones, les méthodes de condensation entre les composés carbonylés et les hydroxylamine-*N* substituées sont les plus souvent employées. L'hydroxylamine choisie est la β -phényl hydroxylamine.

III.1.1- Préparation de la β -phénylhydroxylamine :

La β - phénylhydroxylamine est un réactif sensible à la lumière, l'aire et la température. Elle peut être préparée par réduction du nitrobenzène ($C_6H_5NO_2$) par le zinc en poudre, en présence de chlorure d'ammonium (NH_4Cl), (équation(4))[17]



Les caractérisations de la β -phénylhydroxylamine sont regroupées dans le tableau (3).

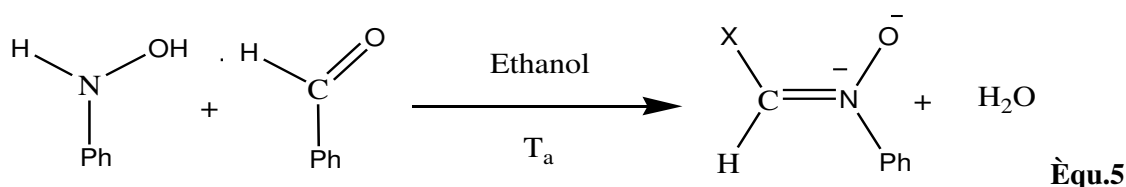
Tableau (3) : Le rendement (Rdt) et le rapport frontal (R_f) par CCM sur le gel de silice et la point de fusion (P_f) de la β -phénylhydroxylamine.

| Aspect et couleur | Rdt (%) | R_f * | P_f (°C) |
|-------------------|---------|---------|------------|
| Cristaux blancs | 66,24 % | 0,52 | 82 |

* : CCM sur plaque de silice, éluant : diéthyléther – éther de pétrole (50/50 %) (v/v).

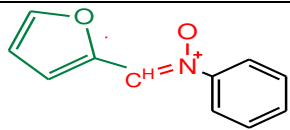
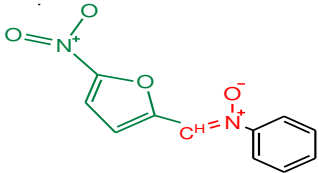
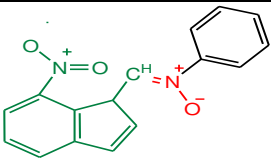
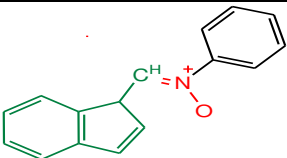
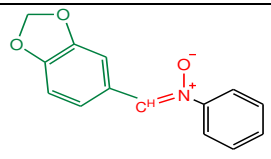
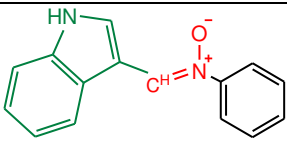
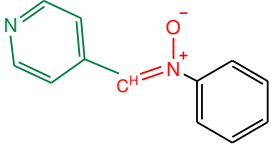
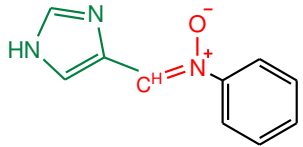
III.1.2- Condensation des aldéhydes aromatiques sur la β -phénylhydroxylamine :

Cette condensation se fait en solubilisant les deux réactifs dans l'éthanol absolu à température ambiante (équ.5) [9].



La structure et la nomenclature des nitrones synthétisées est donnée dans le tableau (4) :

Tableau (4) : Nomenclatures et structures des nitrones synthétisées.

| Nitronne | Structure | Nomenclature |
|----------|---|---|
| I |  | C-2-furyl-N-phénylnitronne |
| II |  | C-(Z) 5-nitrofur-2-yl-N-phénylnitronne |
| III |  | C-5-nitroindol-3-yl-N-phénylnitronne |
| IV |  | C-[(Z)-1H-pyrol [2, 3b]pyridin-3-yl]-N-phénylnitronne |
| V |  | C-(Z)-3,4-(méthylendioxy)phényl-N-phénylnitronne. |
| VI |  | C-(3-indolyl)-N-phénylnitronne |
| VII |  | C-(Z)-4-pyridyl-N-phénylnitronne |
| VIII |  | C-[Z]-1H-imidazol-4-yl-N-phénylnitronne |

Le tableau (5) présente la masse molaire, la formule brute, l'aspect, la mode de recristallisation, le rendement, et le point de fusion des produits obtenus :

Tableau (5) : Caractéristique physico-chimiques et les rendements des nitrones synthétisées.

| Nitronne | MM (g/mole) | Formule brute | Aspect | recristallisation | Rdt (%) | P _f (°C). |
|----------|----------------|---|---------------------|--|------------|-------------------------|
| I | 187.19 | C ₁₁ H ₉ NO ₂ | Poudre marron | Acétate d'éthyle. | 71 | 92,4 |
| II | 232.19 | C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₄ | Poudre vert | Ethanol. | 93 | 180,5 |
| III | 281.26 | C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃ | Poudre orange | Acétate d'éthyle / éther de pétrole. | 70 | 243,1 |
| IV | 237.25 | C ₁₄ H ₁₁ N ₃ O | Poudre jaune | Le minimum de chloroforme et récupéré avec l'éther de pétrole. | 49 | 123,1. |
| V | 241.24 | C ₁₄ H ₁₁ NO ₃ | Poudre blanche. | L'acétate d'éthyle. | 65 | 132,6 |
| VI | 236.26 | C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O | Poudre jaune | Chloroforme / éther de pétrole. | 82 | 192,1 |
| VII | 198.22 | C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O | Poudre blanche. | L'acétate d'éthyle. | 68,31 | 139,8 |
| VIII | 187.19 | C ₁₀ H ₉ N ₃ O | Solide jaunâtre. | L'éthyle d'acétate. | 84 | 185,3 |

III.2- Analyse spectrale des nitrones synthétisées :

Les nitrones synthétisées ont été caractérisées par deux méthodes spectroscopiques (UV-Visible, IR).

III.2.1- Etude spectrophotométrique en UV-Visible :

L'analyse spectrophotométrique en UV-Visible nous a permis de localiser les bandes d'absorption caractéristique des nitrones synthétisées. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau (6).

Tableau (6) : caractérisation spectrale en UV-Visible des nitrones synthétisées.

| Nitrones | Bande E2 | Bande K |
|----------|-----------------------|-----------------------|
| | λ_{\max} (nm) | λ_{\max} (nm) |
| I | 239 | 335 |
| II | 303 | 384 |
| III | 338 | 280 |
| IV | 284 | 341 |
| V | 239 | 344 |
| VI | 225 | 354 |
| VII | 230 | 317 |
| VIII | 227 | 319 |

Il est décrit dans la littérature que les nitrones présentent trois bandes connues E1, E2, et K.

- La bande E2 caractérise les transitions électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$ dans le centre de la molécule et le cycle aromatique.
- La bande K concerne les transitions électroniques $n \rightarrow \pi^*$ dans toute la molécule.

Les spectres UV des nitrones synthétisées sont donnés dans les figures (12 et 13) :

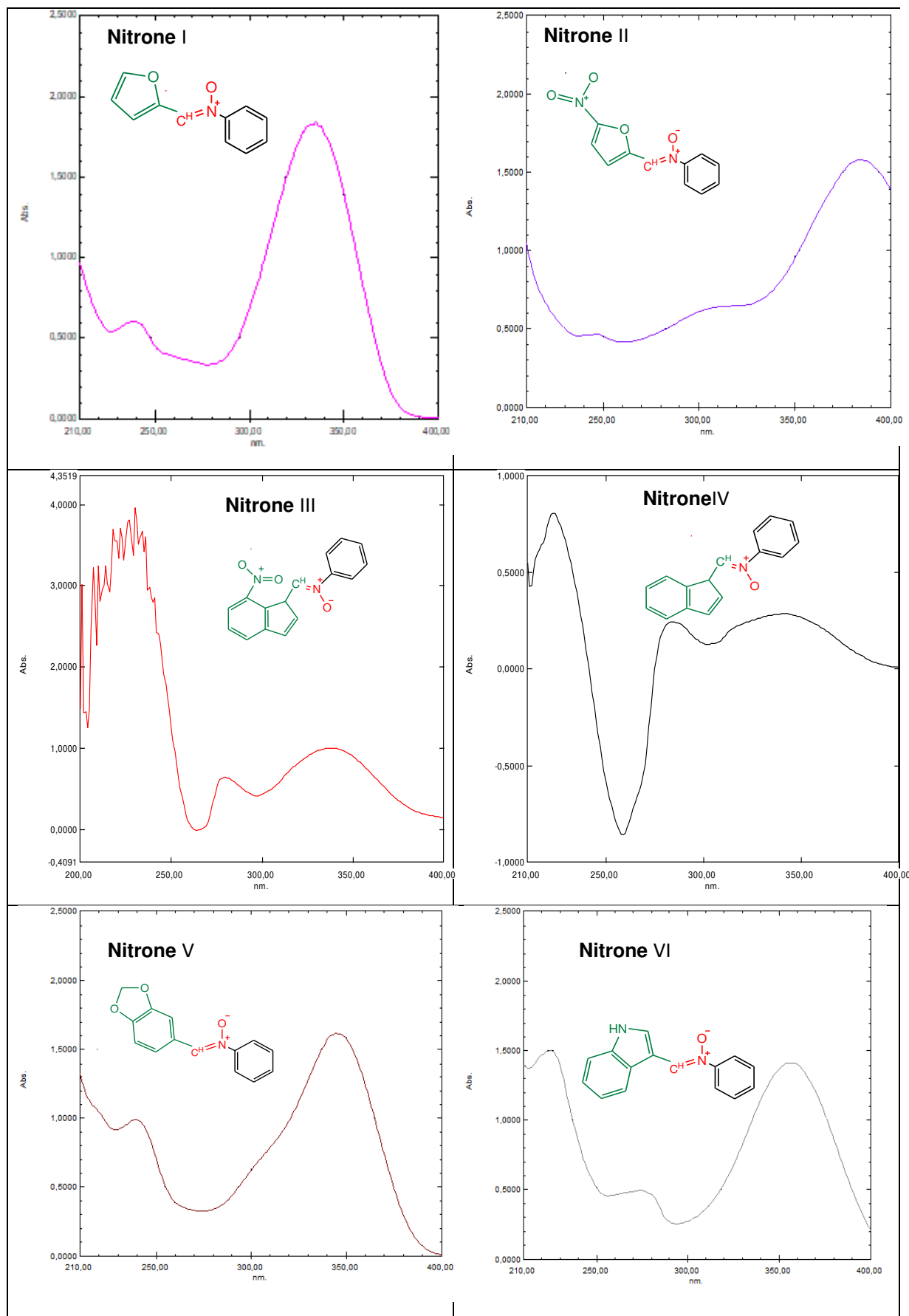


Figure n° 2 : Spectres UV des nitrones synthétisées (I, II, III, IV, V et VI) dans l'éthanol.

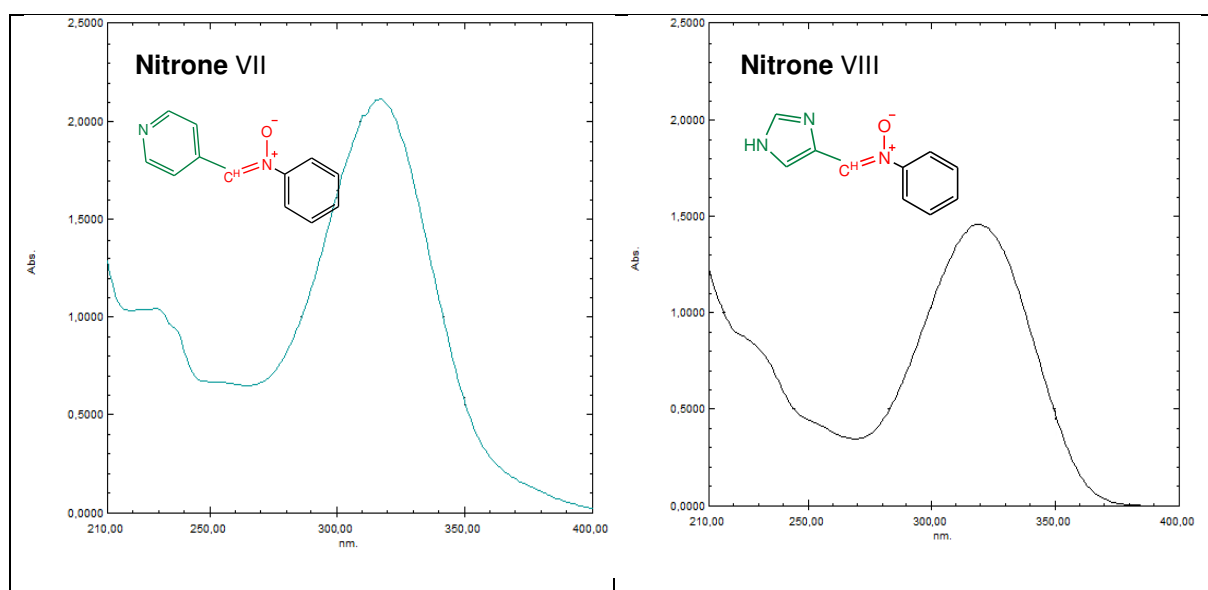


Figure n° 3 : Spectres UV des nitrones synthétisées (VII et VIII) dans l'éthanol.

III.2.2- Etude par spectrophotométrie infrarouge IR :

Les nitrones synthétisées ont été analysé par spectroscopie IR. Les spectres obtenus sont illustrés dans les photos suivantes :

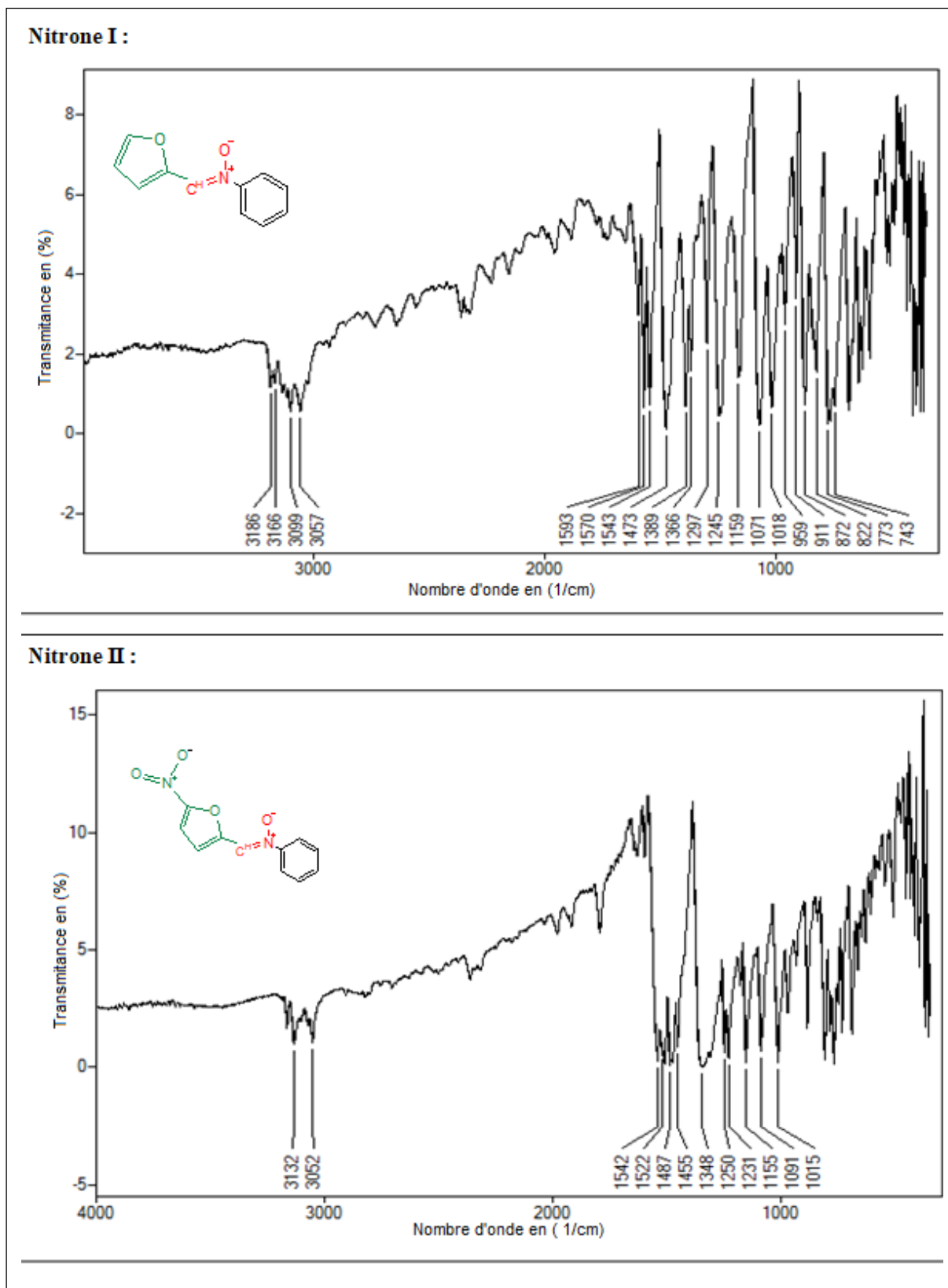


Figure n° 4 : Spectres IR des Nitrones (I et II).

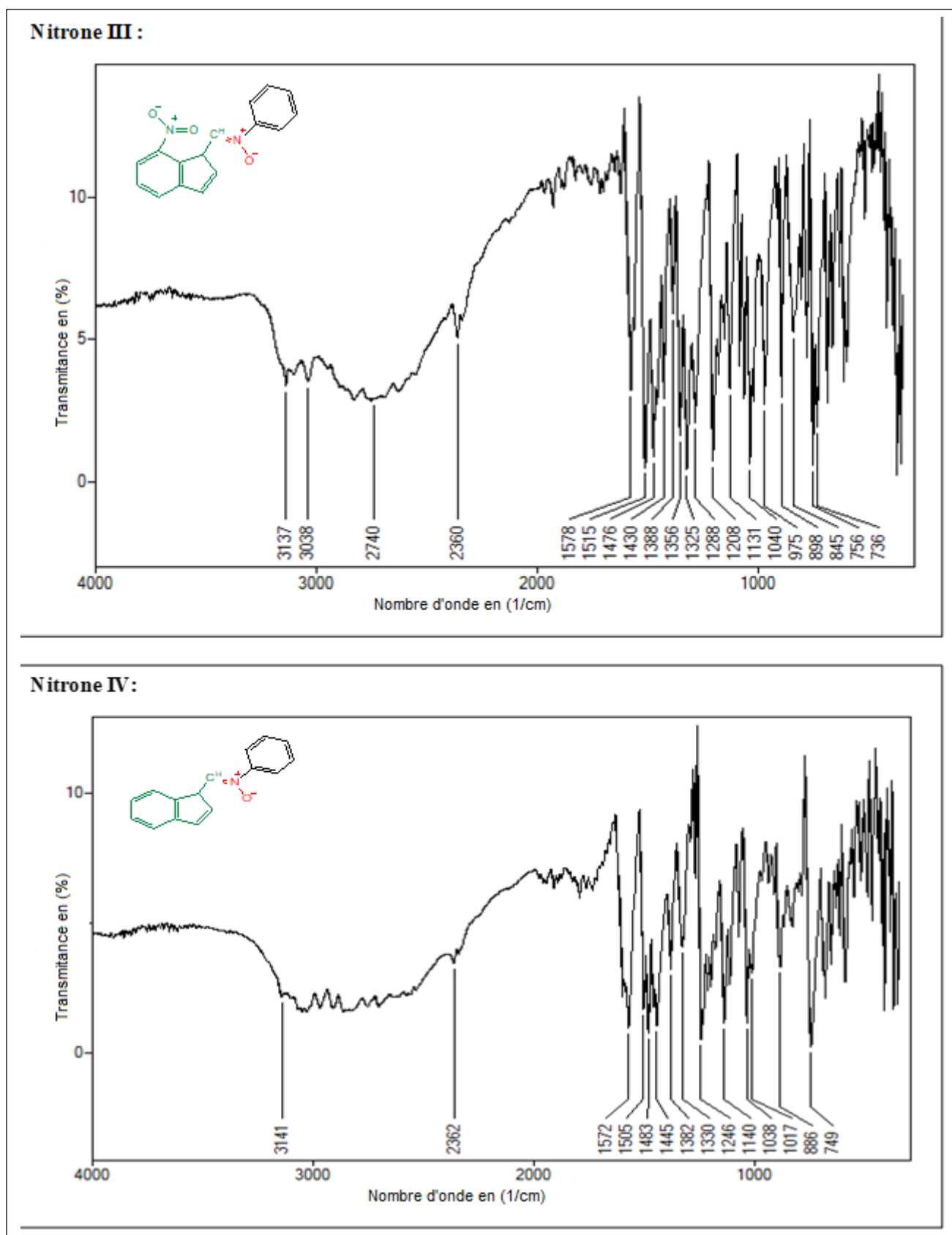
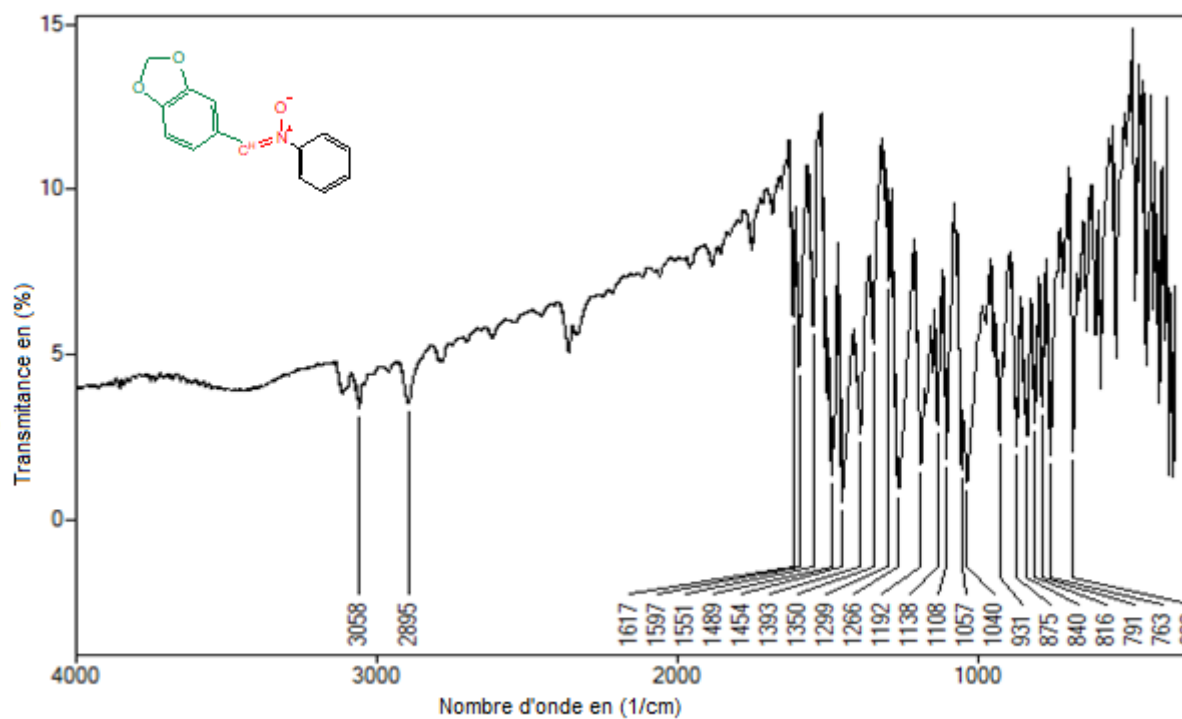


Figure n° 5 : Spectres IR des Nitrones (III et IV).

Nitron V :



Nitron VI :

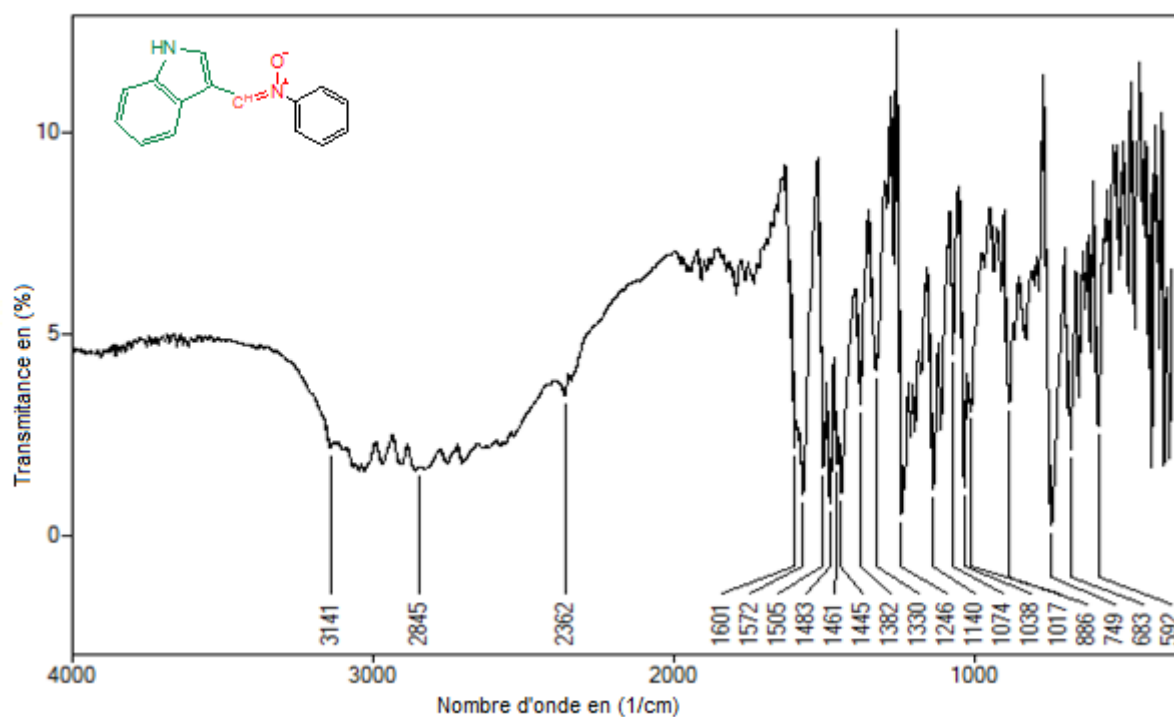
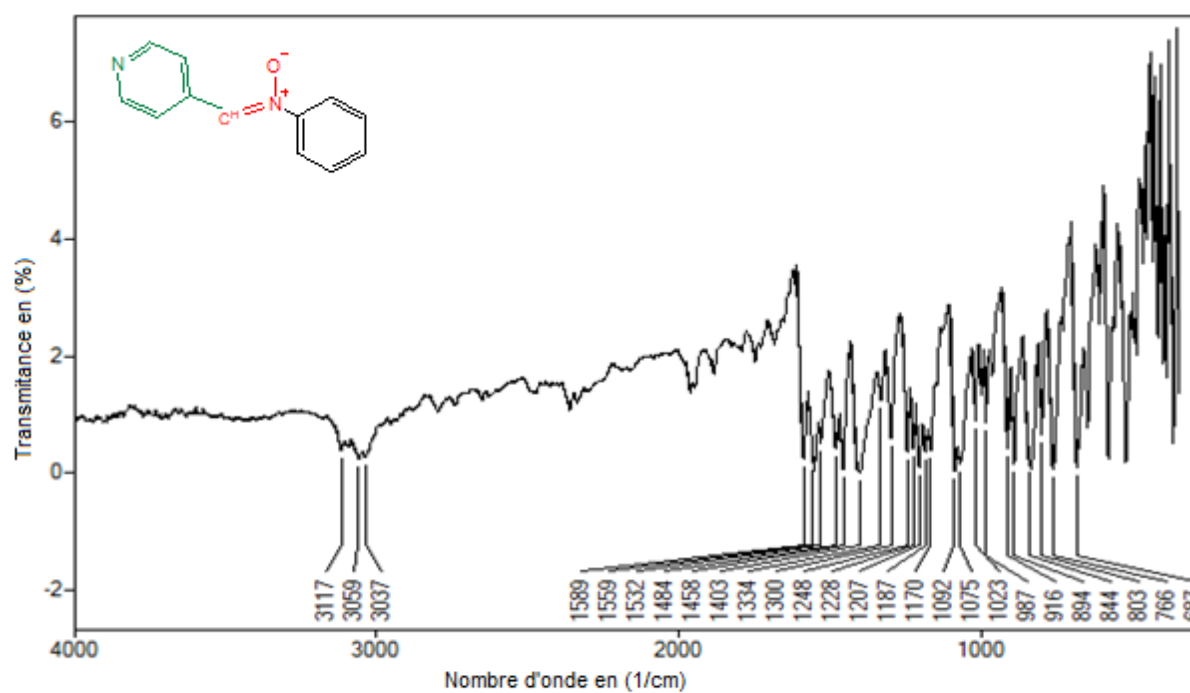


Figure n° 6 : Spectres IR des Nitrones (V et VI).

Nitron VII :



Nitron VIII :

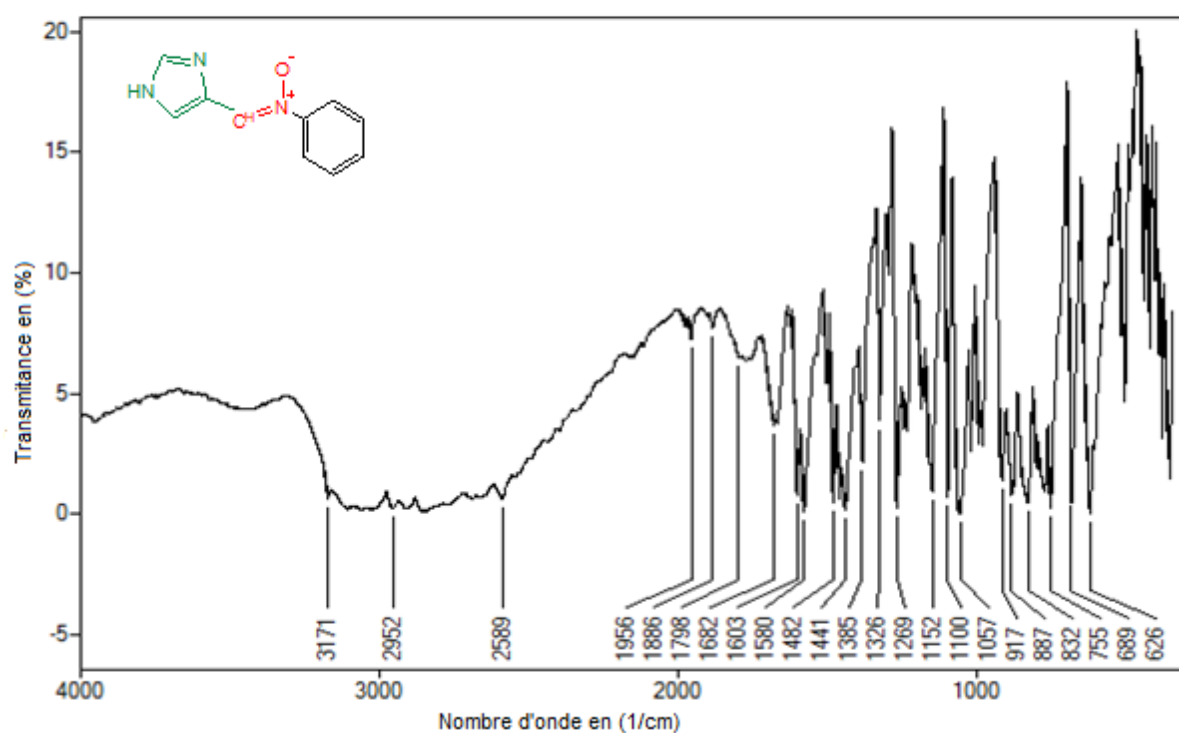


Figure n° 7 : Spectres IR des Nitrones (VII et VIII).

A partir des spectres IR nous avons détecté les bandes caractéristiques des nitrones synthétisées. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau (7) suivants :

Tableau (7) : caractérisations spectrales en infrarouge des nitrones synthétisées.

| Nitrone | L'infrarouge |
|---------|---|
| I | IR (KBr): ν (cm⁻¹): σ C=N : (1570), σ N- O : (1155), σ C-H de l'hétérocycle : (3186-3057), σ C=C benzénique et σ C=C-C=C de conjugaison de l'hétérocyclique : (1593, 1543, 1473), σ C-C du noyau benzénique : (1389-1366), σ C-C : (1245, 1159, 1071, 1018, 959, 911) δ C-H : (872, 822, 773, 743). |
| II | IR (KBr): ν (cm⁻¹): σ C=N : (1542), σ N- O : (1155), σ C-H de l'hétérocycle : (3132-3052), σ C-NO ₂ asymétrique: (1522), σ C-NO ₂ symétrique: (1384), σ C-C hétérocyclique et benzéniques : (1487-1455) δ (=C-O-C=) éther: (1250-1231), δ (C-O) éther : (1015). |
| III | IR (KBr): ν (cm⁻¹): σ C=N : (1578), σ N- O : (1208), σ C-H de l'hétérocycle : (3137-3038), σ C-NO ₂ asymétrique: (1515), σ C-NO ₂ symétrique: (1388), σ N-H: (1356, 1325, 1285), δ C-H dans le plan: (1131-1040), σ C=C benzénique : (1476, 1430), δ C-H hors du plan: (975-736). |
| IV | IR (KBr): ν (cm⁻¹): σ C=N (nitrone): (1584), σ N- O : (1246), σ C-H de l'hétérocycle et σ N-H pyridine : (3141-2533), σ C=C pyridine : (1572), σ C=N pyridine : (1601), σ C=C benzénique : (1505, 1483, 1445), σ N-H non liée pyridine : (1382, 1330), δ C-H : (1140, 1038, 1017). |
| V | IR (KBr): ν (cm⁻¹): σ C=N : (1597), σ N-O : (1266), σ C-H de l'hétérocycle : (3113-3058), σ (-CH ₂) symétrique: (2895), σ C-O éther cyclique: (1266). |
| VI | IR (KBr): ν (cm⁻¹): σ C=N : (1572), σ N-O: (1246), σ C-H de l'hétérocycle: (3141-2845), σ N-H: (2362), σ C-C du noyau benzénique : (1601), σ N-H: (1505-1330), δ C-H dans le plan: (1140), δ C-H hors du plan: (1074-1017), déformation dans le plan de l'hétérocycle: (886), déformation hors du plan de l'hétérocycle : (683-592). |

| | |
|------|---|
| VII | . IR (KBr): ν (cm⁻¹): σ C=N : (1559), σ N- O : (1170), σ C-H de l'hétérocycle : (3117-3037), σ C=N pyridine : (1589), σ C=C pyridine : (1532), σ C=C pyridine : (1484, 1458, 1403), σ C-C du noyau benzénique : (1334-1300), δ C-H dans le plan: (1248, 1228, 1207, 1187), δ C-H hors du plan: (916, 894, 766). |
| VIII | IR (KBr): ν (cm⁻¹): σ C=N : (1580), σ N- O : (1269), σ C-H de l'hétérocycle : (3171-2952), σ N ⁺ -H : (2589), harmoniques du noyau benzénique : (1956-1682), σ C-C du noyau benzénique : (1603), σ C-N et σ N-H non liée : (1482, 1441, 1385, 1326), δ C-H dans le plan: (1152-1100), δ C-H hors du plan: (1057-917), déformation de l'hétérocycle dans le plan : (887), δ N-H hors du plan: (832). |

Les résultats de ce tableau montrent bien la présence des bandes caractéristiques des nitrones et l'absence de ceux des réactifs. Cela nous permet de conclure que la réaction de préparation de nitrones est finie et que les produits récupérés sont purs.

III.3 - L'activité antioxydants :

III.3.1 - Introduction :

L'utilisation des molécules antioxydants de synthèse actuelles est remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles molécules plus actives et moins toxiques sont recherchées. Dans ce contexte, l'activité antioxydante des nitrones synthétisées a été évaluée par trois méthodes. Ces méthodes reposent sur trois mécanismes différents à savoir :

- Mécanisme de réaction SET « simple transfert d'électron » réalisé par la méthode FRAP « Ferric Reducing Antioxydant Power. »
- Mécanisme de réaction HAT « transfert d'atome d'hydrogène réalisé par la méthode de blanchiment β -carotène »
- Mécanisme de réaction HHAT et SET à la fois réalisé par la méthode de piégeage du radical libre DPPH « 1,1-diphényl-2-picrylhydrazole ».

III.3.2 - Test de piégeage du radical libre DPPH :

Le principe du test consiste à l'addition du radical DPPH• à une solution éthanoïque (ou méthanoïque) contenant un composé potentiellement antioxydant et pouvant céder un atome d'hydrogène qui entraîne une diminution de la coloration violette caractéristique de l'apparition de la forme réduite du DPPH [22].

La réduction du DPPH° est facilement mesurée par spectrophotométrie à 517 nm (λ_{\max} DPPH°). La réaction sera plus ou moins rapide selon la nature de l'antioxydant, et la quantité de DPPH-H formée dépendra de la concentration en antioxydant (figure n° 8) [23].

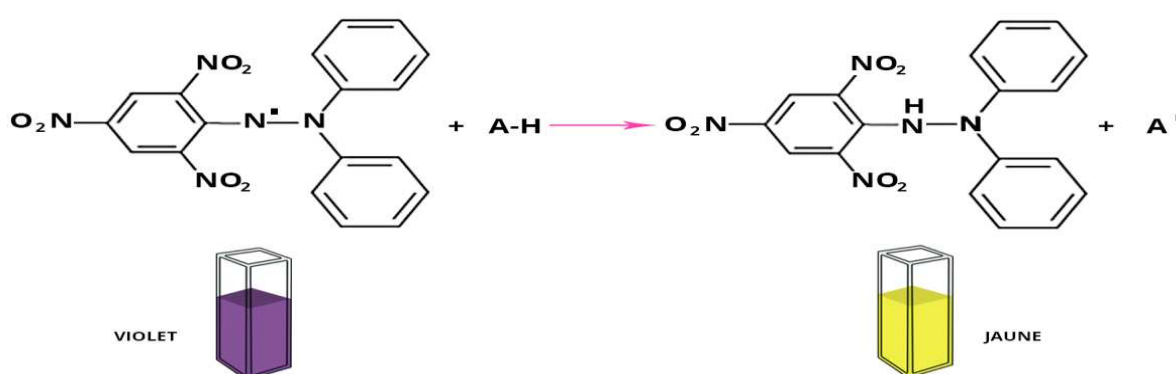


Figure n° 8 : Réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant [23].

L'absorbance et l'activité antioxydant de chaque nitrone synthétisée est donnée dans le tableau (8). Les activités sont représentées dans la figure n° 9 :

Tableau (8) : L'absorbance à 517 nm et l'activité antioxydante de chaque nitrone synthétisée.

| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | PNB | BHT | Vit C |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|-------|-------|
| Abs | 0,4873 | 0,4349 | 0,5936 | 0,2913 | 0,4455 | 0,4676 | 0,2721 | 0,4574 | 0,53 | 0,11 | 0,09 |
| %A | 9,73 | 19,42 | / | 46,04 | 17,47 | 13,37 | 49,59 | 15,26 | 1,81 | 79,62 | 83,32 |

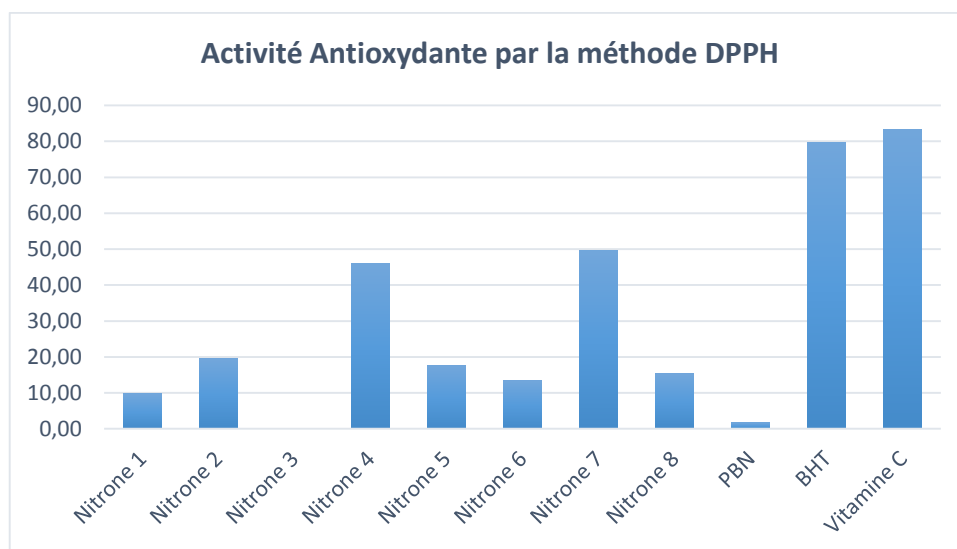


Figure n° 9 : Histogramme de la variation de l'activité des nitrones synthétisées évaluée par la méthode DPPH.

On remarque que l'activité des nitrones varie selon leur structure, la nitron à base de pyridine N4 et indolique N5 présentent de meilleurs résultats. Seulement cette activité reste inférieure à celle de la vit C et de la BHT. Cette diminution d'activité peut être attribuée à l'effet stérique engendré par la taille du DPPH.

III.3.3 - Test de la réduction du fer FRAP :

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode FRAP [24], Elle est basée sur la réaction chimique de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} [25].

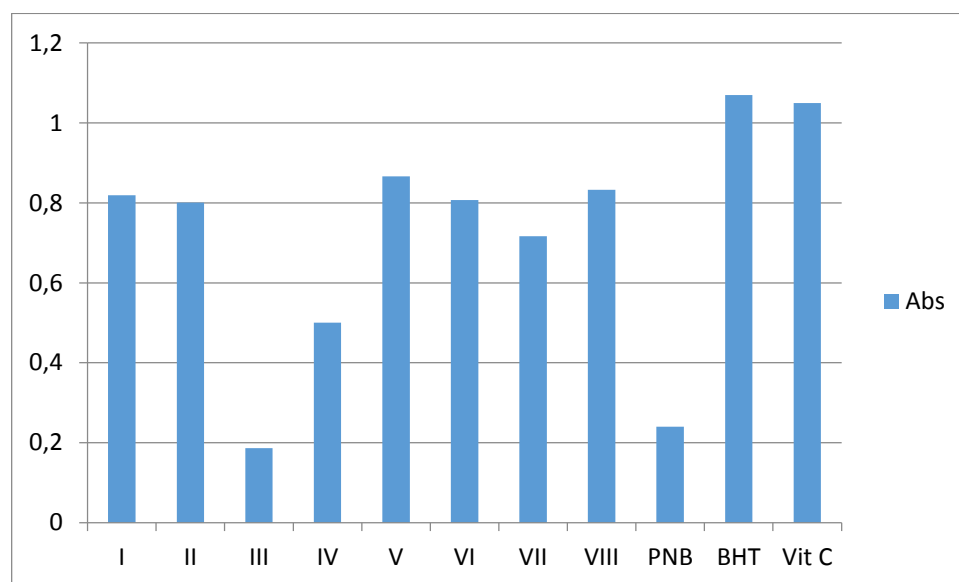
❖ Principe:

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique est développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}).

En effet, le (Fe^{3+}) participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton, qu'il est révélé par le virement de la couleur jaune du fer ferrique en couleur bleu vert du fer ferreux. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspondante à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [26]. L'absorbance à 700 nm de chaque nitron testée par cette méthode est donnée dans le tableau (9) suivant :

Tableau (9) : L'absorbance à 700nm des nitrones synthétisée obtenue lors du test d'évaluation d'activité antioxydante par la méthode FRAP.

| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | PNB | BHT | Vit C |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|------|-------|
| Abs | 0,8189 | 0,8006 | 0,1867 | 0,5003 | 0,8665 | 0,8074 | 0,7170 | 0,8324 | 0.24 | 1.07 | 1.05 |

**Figure n° 10 :** Histogramme de la variation de l'absorbance à 700nm des nitrones synthétisées obtenues lors du test d'évaluation de l'activité antioxydante (FRAP).

L'activité des nitrones synthétisées par la méthode FRAP qui repose sur le mécanisme de transfert des électrons est différent de celle obtenue par la méthode DPPH. On remarque que toutes les nitrones testées présentent une activité supérieure à 50% par rapport à celle de la BHT, excepté la nitrone III. Cela nous permet de conclure que les nitrones synthétisées présentent un bon pouvoir réducteur.

III.3.4- Méthode de la β -carotène :

Le β -carotène est un type de caroténoïdes et précurseur de la vitamine A. Il agit sur les espèces réactives de l'oxygène, en formant un radical de vitamine A qui pourra agir comme antioxydant en réagissant avec un autre radical pour former un non radical, ou sera régénéré en vitamine A (figure n° 11) [27] [24].

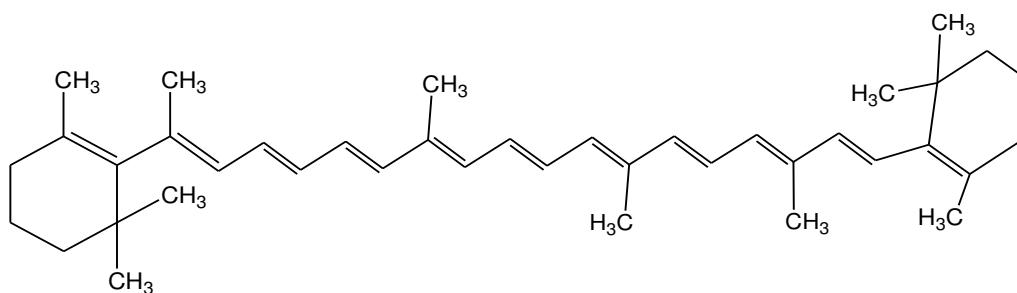


Figure n° 11 : La structure de la bêta-carotène.

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui attaquent les onze doubles liaisons du β -carotène, ce qui entraîne une décoloration de ce dernier mesuré par spectromètre à 490 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β carotène [27]. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. La couleur jaune si elle persiste, indique la présence de substances antioxydants [28].

L'absorbance et l'activité antioxydant de chaque nitrone synthétisée sont données dans le tableau (10) et représenté sur l'histogramme de la figure n° 12:

Tableau (10) : Absorbance à 490 nm et Activité antioxydant des nitrones synthétisées obtenues lors du test de blanchiment de β -carotène.

| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | PBN | BHT | Vit C |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|------|-------|
| Abs | 0,1551 | 0,1422 | 0,4474 | 0,1641 | 0,1705 | 0,1439 | 0,1429 | 0,1260 | 0.05 | 0.10 | 0.10 |
| A% | 155,13 | 142,20 | 447,43 | 164,13 | 170,53 | 143,93 | 142,93 | 126,03 | 50 | 100 | 100 |

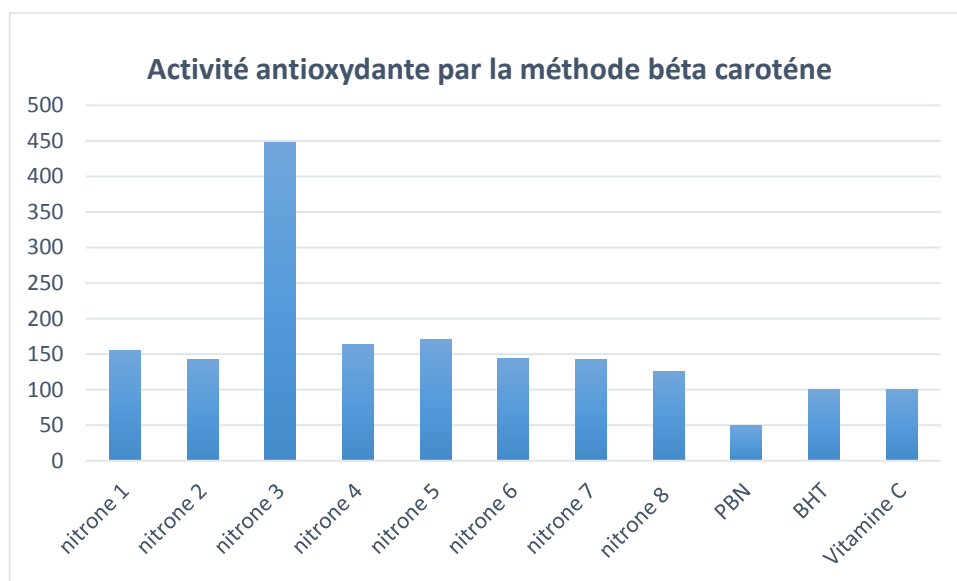


Figure n° 12 : Activité antioxydante des nitrones synthétisées obtenue lors du test de blanchiment de β -carotène.

Les résultats de l'activité antioxydant par la méthode de blanchiment de β -carotène montrent que toutes les nitrones synthétisées présentent des activités similaires exceptées pour la nitrones 3. Ces activités sont équivalentes ou meilleures à celle de la BHT et la vitamine C. cela fait de nos nitrones de très bons agents protecteurs et ouvrent la voie à des applications de ces derniers dans le domaine pharmaceutique.

Conclusion

Générale

Conclusion générale

Dans le but d'associer l'activité thérapeutique d'une série d'aldéhyde naturels à l'activité antioxydantes des nitrones, nous avons synthétisé une série de nitrones aux dérivés hétérocycliques.

Premièrement nous avons synthétisé la β -phénylhydroxylamine par la réduction du nitrobenzène avec du zinc en présence du chlorure d'ammonium. Cette dernière est additionnée aux aldéhydes naturels pour avoir la série de nitrone attendue. Ces dernières ont été purifiées par recristallisation. Les rendements obtenus sont très satisfaisants.

L'étude de l'activité antioxydante réalisée par trois tests chimiques, a révélé que les nitrones synthétisées présentent une activité meilleure que celle de la PBN (nitrone de référence). Cette activité n'est pas appréciée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Cela a été attribué à l'effet stérique engendré par le DPPH.

L'évaluation de l'activité antioxydante des nitrones par les autres méthodes a révélé l'effet protecteur et réducteur de ces nitrones. Ces activités sont meilleures que celui de la vitamine C et BHT.

En perspective, il serait intéressant de tester l'activité anti-inflammatoire et anti-cancer des nitrones synthétisées.

Références bibliographiques

References

- [1] Stanley R. Sandler, Wolf Kuroki; « Organic Functional Group Preparation »; Academic Press, New York, San Francisco, 24/28th Ave. London NW1; (1972); volume III; p302; printed in the United States of America.
- [2] Anaïs Deletraz, « Les nitrones : des composés piègeurs de radicaux libres et antioxydants », thèse de doctorat en Agrosciences, Université d'Avignon - France, (2017), p 231.
- [3] Jennifer Y., Pfeiffer A., M. Beauchemin, J., « Organic Chemistry : Simple Reaction Conditions for the Formation of Ketonitrones from Ketones and Hydroxylamines », The Journal of Organic Chemistry, Vol. 74, (2009), p 8381-8383.
- [4] Jonathan Clayden, Nick Greeves, Stuart Warren; « Chimie organique : une approche orbitale »; De Boeck Supérieur - France, volume II, (2013); p 902.
- [5] C. Gella, È. Ferrer, R. Alibés, F. Busqué, P. de March, M. Figueredo, J. Font, J., « Organic Chemistry », Le Journal de Chimie Organique, Vol. 74, no. 16, (2009), p 6365-6367.
- [6] J. Moran, J. Y. Pfeiffer, S. I. Gorelsky, A. M. Beauchemin, « Organic Letters : Ketonitrones par Hydroamination », Centre de recherche sur la catalyse et d'innovation, Université d'Ottawa, 10 Marie Curie, Ottawa, Ontario, Canada K1N 6N5, Vol .11, (2009), p 1895-1898.
- [7] T. Liu, Z. Liu, D. Hu, Y. Wang, « Synthesis », Le Journal de Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York, Vol.50, no. 8, (2018), p 1728-1736.
- [8] I. Nakamura, T. Onuma, R. Kanazawa, Y. Nishigai, M. Terada, « [1,3]-arrangement de N-alcoyloxycarbonyloxylanilines catalysé par le cobalt », Journal Beilstein de Chimie organique, Vol. 16, (2014), p 1972–1979.
- [9] Chahrazad Guernah., « évaluation de l'activité antimicrobienne d'une série de nitrones C-phénoliques », Mémoire magister, chimie Org. appliquée, ENS Kouba-Alger, (2009), p 30-35.
- [10] M. Rosselin, « Conception de nitrones amphiphiles aux propriétés de piégeage et antioxydantes supérieures », thèse de doctorat, chimie Org, université d'Avignon Vaucluse-Marseille (Dec. 2014).
- [11] François Nsemi Muanda; « Identification de Polyphénols, Evaluation De Leur Activité Antioxydante et Etude de Leurs Propriétés Biologiques »; thèse de doctorat, chimie Org, à l'Université P-Verlaine de Metz-France; (2010).

- [12] Alexandre Guerry, « Synthèse de chitoooligosaccharidegrafted-polycaprolactone par chimie « click » : vers des nanogels bioactifs et biostimulables » ; », thèse de doctorat, chimie Org, Appliquées de Lyon dans l'École Doctorale de Chimie-France, 30 novembre (2012).
- [13] Thierry briere, « Chimie organique et chimie minérale », Journal studylib Chim fr, Vol. 361 (2013), P 21.
- [14] R. A. Floyd, R. D. Kopke, C. Choi, S. B. Foster, S. Doblaz, and R. A. Towner, « Free Radical Biology & Medicine Nitrones as therapeutics », Free Radic. Biol. Med., vol. 45, no. 10, (2008), p 1361–1374.
- [15] Nabila bougandoura, Nassima bendimerad, « Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Saturejacalaminthassp.Nepeta », Nature et Technologie, B- Sciences Agronomiques et Biologiques, no.9 ,(2013), p 14-19.
- (a) Suhaj, M., « Spice antioxidants isolation and their antiradical activity », Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 19, (2006), p 531–537.
- (b) Tadhani, M.B., Patel, V.H., et Subhash, R., « In vitro antioxidant activities of Stevia rebaudiana leaves and callus ». Journal of Food Composition and Analysis , Vol. 20, (2007), p 323-329.
- (c) Koechlin Ramonatxo C. « Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. Nutrition Clinique et Métabolique. » , Vol. 20, (2006), p 165- 177.
- (d) Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. « the chemistry behind antioxidant capacity assays », Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 53, (2005), p 1841-1856.
- (e) Marc Fr., Davin A., Deglène-Benbrahim L., et Ferrand C. « Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments ». Erudit, médecine sciences, Vol. 20, no. 4, (2004) , p 458-463.
- (f) Sanchez-Moreno C. « Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems », Food Science and Technology International, Vol. 8, no.3, (2002), p 121-137.
- (g) Vârban D.I., Duda M., Vârban R.,et Muntean S, « Research Concerning the Organic Technology for SaturejaHortensis » ,Culture.Bulletin UASVM Agriculture,Vol. 66, no. 2 ,(2009), p 225- 229.
- [16] Medjaoui Belkhatir Amel, « Étude de l'activité antioxydante de l'extrait hydroacétonique des racines de l'Arbutusunedo de la région de Tlemcen », Master en Biologie, Université Abou -BekrBelkaid de Tlemcen ; (2017) ; p 8.

- [17] E. Bamberger, and Muller, J. Beer, « Phénylhydroxylamine », *Russian Journal of Organic Chemistry*, vol. 27, (1894), p 1347-1350.
- [18] Benhaddouche Khireddine, « Evaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Daucus crinitus*, *Lavandulamultifida* et *Thym us fontanesii* », *Master en Biologie, Université Abou beker belkaid Tlemcen*, (2014), p 42.
- [19] Roberta B. Rodrigues Ramona Lichtenthäler Benno F. Zimmermann Menelaos et MaiaOssalin Almeida ; « Capacité totale de piégeage des oxydants d'Euterpe oleracea Mart et identification de leurs composés polyphénoliques », *Journal de la chimie agricole et alimentaire*, Vol. 54: (2006), p 607-616.
- [20] Cristina Popovici, Ilonka Saykova, Bartek Tylkowski , « Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH » , *Revue de génie industriel* ,Vol. 4, (2009), p 25-39.
- [21] Atti Ikram ; « Evaluation des activités antioxydant et antiradicalaire d'un mélange d'épices « Ras el hanout » », mémoire de master en Sciences de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah Ouargla-Alger, (2014), p 25-30.
- [22] Djeghim Hanène ; « Etude phytochimique et biologique d'une plante médicinale Algérienne du Genre *Genista* (Fabaceae) », mémoire de master en Biochimie Moléculaire et santé, Université des Frères Mentouri-Constantine ; (2016) ; p 40-43.
- [23] Abdelaziz Merouane , Abdallah Noui , Housseine Medjahed , Kamel Nedjari benhadj Ali et Abdelkader ; « Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle » ; *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, Vol.8, no. 4, (2014); p 1865-1870.
- [24] Y. Pan, K. Wang, S. Huang, H. Wang, X. Mu, C. He, X. Ji, J. Zhang and F. Huang, « Antioxydant activity of microwave-assisted extract of longan peel », *Food Chemistry*, Vol. 106: (2008), p 1264-1270.
- [25] Fatima kholkhal , Hamadi Abderrahmane , Lazouni, Mourad bendahou , Ikram boublenza, Sari Daoudi chabane et Tarik chaouch , « Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus Ciliatus. Coloratus* », *Revue internationale des sciences et technologie*, Vol.9, no. 1, (2013), p 151 – 158.
- [26] Ouatah Hayat, Ouchabaa yahi Fatima , « Activités antioxydantes et antibactériennes de quelques miels de la Wilaya de Béjaia » , mémoire de master en Pharmacologie Moléculaire ,Université Abderrahmane mira de Béjaia ; (2016), p 23.
- [27] Benhammadi Zeyneb , « Contribution à l'étude phytochimique et de l'activité antioxydante des extraits des plantes : *Salviaofficinalis*, *Menthapulegium*, *Saturejacalamintha* et *Marrubiumvulgare* » ; mémoire master en biochimie appliquée ,Université de Tlemcen, (2016) , p 8-13.

[28] Mickaël Laguerre ; « Bases moléculaires de la capacité antioxydante de composés phénoliques : étude en milieux homogène, émulsionné et cellulaire » ; thèse de doctorat en chimie et technologie des aliments, Université de Montpellier II-France, (2008) ; p 75.