

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTÈRE
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB BLIDA-1-



FACULTÉ DE SCIENCES

DÉPARTEMENT DE CHIMIE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

OPTION

CHIMIE APPLIQUÉE

THÈME

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA RELATION STRUCTURE
CHIMIQUE-ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE PAR DFT DES
SUBSTANCES NATURELLES PHÉNOLIQUES

PRÉSENTÉ PAR : ZAMIME MOHAMED

SOUTENU LE : 18/10/2020

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

EXAMINATRICE :	MME. A BESSI	USDB
PRÉSIDENT :	MR. A OURADI	USDB
ENCADREUR :	MR. AHMED AIT YAHIA	USDB

Remerciements

Je remercie Dieu, le tout puissant de ma avoir accordé santé et courage pour accomplir ce modeste travail.

A mon promoteur, Mr AHMED AYET YAHIA

Je vous remercie d'avoir été à l'initiative de ce travail. Vous m'avez guidé dans l'élaboration de ce mémoire par votre grande disponibilité, vos conseils et votre précieuse aident. Merci de m'avoir fait partager vos connaissances, j'ai été heureux de travailler avec vous et je tiens à vous en remercier sincèrement.

Je tiens à remercier à mes deux amies proche Mohamed et Hakim, pour son aide, ces encouragements et ces conseils.

Je remercie chaleureusement les membres de jury : Mme. A bessi et MR. ouradi pour l'intérêt qu'ils ont manifesté envers mon travail en acceptant de l'évaluer.

Je voudrais aussi exprimer ma gratitude et mes remerciements à tous le personnel Existés pendant le travail en laboratoire, pour leurs orientations, leurs conseils et leurs disponibilités tout au long de la réalisation de mon travail

Merci pour tous ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre mon travail

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à :

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon très cher père

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut, tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Qu'Allah, le tout miséricordieux, te préserve, t'accorde santé, bonheur et te protège de tout mal.

À mes très chères sœurs et frère

Asma, Marwa et Adam Merci de m'avoir accompagné pendant toute ma vie, d'être toujours là pour moi et de m'avoir supporté. Je vous aime tous. Qu'Allah le tout puissant, vous protège et vous exauce tous vos vœux

À tous les membres de la famille ZAMIME

À mes collègues de la promotion de chimie appliquée 2020

À mes très chers amis

Mohamed touil, Hakim maizi, Rabah boudissa, housseem Nm, Toufik et Amin nafnaf, Hicham tchalabi, Yasser abderrahim, islem Carmen, Hamid alili, rafik chaban, Abdelaziz megatli, gasmi abdnour, mesbah et Younes, saïs abdo, aïssou Meriem, Rania, Tahar maouiya, zerrout anfal, lamis, gherraben rachda, Meriem zibani, et à tous ceux que je n'ai pas mentionnés.

Merci d'être à mes côtés dans mes pires et bons moments

MOHAMED

Table de matière

Remerciements	I
DEDICACES	II
Table de matière	III
Résumé	VI
ملخص	VI
Abstract	VIII
Liste des figures	IX
LISTE DES HISTOGRAMMES	IX
Liste des tables	X
LISTE DES ABREVIATIONS	XI
Introduction générale	1
Chapitre I : généralité sur les antioxydant	2
I. Définition des antioxydants	2
Classification des antioxydants	2
I.1.Classification des antioxydants par rapport à leurs mécanismes d'action	2
I.2.Classification des antioxydants suivant la nature chimique dans les aliments	2
a) Antioxydants naturels	2
b) Antioxydants synthétiques	3
c) Antioxydants synergiques	3
I 2.1-Les antioxydants naturels	3
I.2.1.1. Les antioxydants enzymatiques	3
a) Les superoxydes dismutases (SOD)	4
b) La glutathion peroxydase (GSHPx)	4
c) La Catalase (CAT)	4

I.2.1.2- Les antioxydants non enzymatiques	4
a) La vitamine E.....	4
b) La vitamine C (acide ascorbique)	5
c) Caroténoïdes	5
I.3-Méthode d'étude d'activité des antioxydants.	6
I.3.1- le test de piégeage du radical DPPH	6
Principe.....	6
Mode opératoire.....	6
I.3.2-Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power)	7
Principe.....	7
Dosage :.....	7
I.3.3-Test qualitatif au β-carotène	8
Principe :	8
Dosage :.....	8
Chapitre II : Relation activité antioxydant_ structure chimique	1
II.1-Généralité.....	9
II.2-Historique.....	9
II.3-Définition de SAR.....	9
II.4- Descripteur moléculaire.....	11
II.4.1-Les descripteurs 3-D	12
▪ Descripteurs géométriques	12
▪ Descripteurs électroniques	12
▪ Descripteurs physicochimiques.....	13
II.5- Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT).....	14
Chapitre III : MATERIEL ET METHODE.....	1
III.1- matériels et produits.....	16
III.1.1 matériels.....	16

III.1.2 produits chimiques.....	17
III.2-1 Test de piégeage du radical DPPH.....	17
III.2.1.1-Mode opératoire.....	18
III.2.1.2- Etude théorique des composés phénoliques par la méthode de DFT	21
Chapitre IV : Résultats et discussion.....	1
IV.1-Méthode de piégeage du radical libre DPPH	25
IV.2-Application de la méthode DFT	32
IV.3.1-Influences des interactions avec le solvant sur la polarisabilité	35
IV.3.2-Influence des interactions avec le solvant sur l'entropie.....	36
IV.3.3-Influence des interactions avec le solvant sur l'énergie moléculaire à l'état fondamental.....	37
IV.3.4-Influence des interactions avec le solvant sur l'énergie moléculaire à l'état radicalaire.....	37
IV.4-Calcul de l'énergie de dissociation de la bonde O-H.....	39
IV.4.1-Calcul de la BDE cas de la première approche	39
IV.4.2-Calcul de la BDE cas de la deuxième approche :	41
IV.4.3-Influence des interactions avec le solvant sur la BDE	42
Conclusion générale	44
Références bibliographique.....	46

Résumé

Notre travail expérimental est une contribution à l'étude quantitative de la relation structure chimique-activité antioxydante par la méthode DFT des substances naturelles et synthétiques phénoliques comme le carvacrol, le thymol, le 2-naphtol et le BHT, et une comparaison à la même méthode appliquée aux composés non phénoliques tel que le p-cymène et le menthol. Nous avons réalisé cette étude selon deux approches, dans la première approche on a introduit les interactions entre les molécules étudiées et le solvant à savoir l'éthanol. Par contre, dans la deuxième approche, ces interactions molécule-solvant ont été négligées. Du côté expérimental, en utilisant la méthode de piégeage du radical libre DPPH, nous avons déterminé l'IC₅₀ de chaque molécule ce qui nous a permis de les classer par ordres décroissants de l'activité antioxydante comme suit :

$$\text{Activité}_{50\%}^{\text{BHT}} \gg \text{Activité}_{50\%}^{2\text{-naphtol}} > \text{Activité}_{50\%}^{\text{carvacrol}} > \text{Activité}_{50\%}^{\text{thymol}} > \text{Activité}_{50\%}^{\text{p-cymène}} > \text{Activité}_{0\%}^{\text{menthol}}$$

Du côté théorique nous avons calculé, par le programme Gaussian09W et la méthode DFT en utilisant la base de calcul 6-311G+, les énergies de dissociation homolytique de la bonde O-H 'BDE' responsable de l'activité antiradicalaire des composés étudiés selon le mécanisme de transfert de proton 'HAT'. Le classement croissant des différentes BDE calculées et comme suit :

$$\text{BDE}_{\text{DFT},6-311\text{G}+}^{\text{BHT}} < \text{BDE}_{\text{DFT},6-311\text{G}+}^{2\text{-naphtol}} < \text{BDE}_{\text{DFT},6-311\text{G}+}^{\text{carvacrol}} < \text{BDE}_{\text{DFT},6-311\text{G}+}^{\text{thymol}} < \text{BDE}_{\text{DFT},6-311\text{G}+}^{\text{p-cymène}} < \text{BDE}_{\text{DFT},6-311\text{G}+}^{\text{menthol}}$$

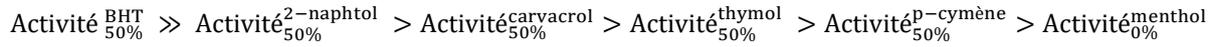
Une valeur faible de la BDE implique une forte activité antiradicalaire. Ceci prouve l'existence d'une corrélation entre les mesures expérimentales des IC₅₀ et les valeurs théoriques de la BDE.

Nous avons constaté l'influence des interactions avec un solvant polaire et portique, comme l'éthanol, sur la polarisabilité de l'état fondamental et radicalaire et sur le moment dipolaire. Ces derniers augmentent en utilisant ce type de solvants. De même, la barrière énergétique représentée par le BDE s'affaiblit. La différence entre les BDE obtenus par les deux approches dans le cas du BHT est quasi négligeable, ceci et probablement dû aux deux groupements tert-butyl adjacents à la fonction 1-hydroxy, et qui diminuent la surface de solvation du BHT.

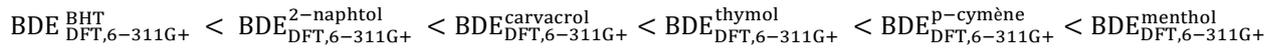
Mots clés : IC₅₀, HAT, DFT, BDE.

ملخص

عملنا التجريبي هو مساهمة في الدراسة الكمية للعلاقة بين التركيب الكيميائي والنشاط المضاد للأوكسدة بواسطة طريقة DFT للمواد الفينولية الطبيعية والاصطناعية مثل كارفاكرول ، ثيمول ، 2-نافتول و BHT ، ومقارنة مع نفس الطريقة المطبقة على المركبات غير الفينولية مثل p-cymene والمنثول. لقد أجرينا هذه الدراسة وفقاً لمنهجين ، في الطريقة الأولى قدمنا التفاعلات بين الجزيئات المدروسة والمذيب ، أي الإيثانول. من ناحية أخرى ، في النهج الثاني ، تم إهمال تفاعلات المذيبات الجزيئية. على الجانب التجريبي ، باستخدام طريقة مسح الجذور الحرة DPPH ، حددنا IC₅₀ لكل جزيء مما سمح لنا بتصنيفها في ترتيب متناقص من النشاط المضاد للأوكسدة على النحو التالي :



من الناحية النظرية ، قمنا بحساب ، من خلال برنامج Gaussian09W وطريقة DFT باستخدام قاعدة حساب G 311-6 ، طاقات التفكك المتماثل لنسخة 'BDE' OH المسؤولة عن نشاط الجذور الحرة للمركبات التي تمت دراستها وفقاً لآلية نقل البروتون "HAT". الترتيب المتزايد للإثيرات ثنائية الفينيل المبرومة المحسوبة المختلفة وعلى النحو التالي:



تشير القيمة المنخفضة لـ BDE إلى نشاط قوي مضاد للجذور الحرة. وهذا يثبت وجود ارتباط بين القياسات التجريبية لـ IC₅₀ والقيم النظرية للإثير ثنائي الفينيل متعدد البروم.

لقد لاحظنا تأثير التفاعلات مع المذيب القطبي والبوابي ، مثل الإيثانول ، على استقطاب الحالة الجذرية والأرضية وعلى العزم ثنائي القطب. يزيد الأخير عند استخدام هذا النوع من المذيبات. وبالمثل ، فإن حاجز الطاقة الذي يمثله BDE يضعف. إن الفرق بين الإثيرات ثنائية الفينيل المبرومة التي تم الحصول عليها من خلال النهجين في حالة BHT يكاد يكون ضئيلاً ، ويرجع ذلك على الأرجح إلى مجموعتي ثالثي بوتيل المجاورتين لوظيفة 1-هيدروكسي ، والتي تقلل من امهامة BHT.

الكلمات الرئيسية: IC₅₀ ، HAT ، DFT ، BDE

Abstract

Our experimental work is a contribution to the quantitative study of the chemical structure-antioxidant activity relationship by the DFT method of natural and synthetic phenolic substances such as carvacrol, thymol, 2-naphthol and BHT, and a comparison to the same method applied to non-phenolic compounds such as p-cymene and menthol. We carried out this study using two approaches, in the first approach we introduced the interactions between the molecules studied and the solvent, namely ethanol. On the other hand, in the second approach, these molecule-solvent interactions have been neglected. On the experimental side, using the DPPH free radical scavenging method, we determined the IC₅₀ of each molecule which allowed us to classify them in decreasing orders of antioxidant activity as follows:

$$\text{Activité}_{50\%}^{\text{BHT}} \gg \text{Activité}_{50\%}^{2\text{-naphthol}} > \text{Activité}_{50\%}^{\text{carvacrol}} > \text{Activité}_{50\%}^{\text{thymol}} > \text{Activité}_{50\%}^{\text{p-cymène}} > \text{Activité}_{0\%}^{\text{menthol}}$$

On the theoretical side we have calculated, by the Gaussian09W program and the DFT method using the 6-311G + calculation base, the homolytic dissociation energies of the OH 'BDE' bond responsible for the anti-free radical activity of the compounds studied according to the mechanism of proton transfer 'HAT'. The increasing ranking of the different calculated BDEs and as follows:

$$\text{BDE}_{\text{DFT},6-311\text{G}+}^{\text{BHT}} < \text{BDE}_{\text{DFT},6-311\text{G}+}^{2\text{-naphthol}} < \text{BDE}_{\text{DFT},6-311\text{G}+}^{\text{carvacrol}} < \text{BDE}_{\text{DFT},6-311\text{G}+}^{\text{thymol}} < \text{BDE}_{\text{DFT},6-311\text{G}+}^{\text{p-cymène}} < \text{BDE}_{\text{DFT},6-311\text{G}+}^{\text{menthol}}$$

A low value of the BDE implies a strong anti-free radical activity. This proves the existence of a correlation between the experimental measurements of IC₅₀ and the theoretical values of the BDE.

We have observed the influence of interactions with a polar and protic solvent, such as ethanol, on ground and radical state polarizability and on the dipole moment. The latter increase when using this type of solvent. Likewise, the energy barrier represented by the BDE weakens. The difference between the BDEs obtained by the two approaches in the case of BHT is almost negligible, this and probably due to the two tert-butyl groups adjacent to the 1-hydroxy function, and which reduce the solvation surface of BHT.

Keywords: IC₅₀, HAT, DFT, BDE

Liste des figures

Figure 1 :structure d la vitamine E.	4
Figure 2 :structure de l'acide ascorbique.	5
Figure 3 :structure de la B-carotène[15].....	5
Figure 4 :piégeage du radical libre DPPH.....	6
Figure 5 :Schéma sur la réaction de test FRAP.....	7
Figure 6 : Modelé de l'étude de relation structure activité.	11
Figure 7 : spectrophotométrie UV-visible.....	16
Figure 8 : réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant.	18
Figure 9 : variation de l'activité de piégeages du radical libre DPPH en fonction de la variation de la concentration des différentes molécules étudiées.....	27
Figure 10 : variation de la BDE (AI) et du IC ₅₀ selon la molécule étudiée.....	40
Figure 11 : variation de la BDE (SI) et du IC ₅₀ selon la molécule étudiée.	42
Figure 12 : comparaison des BDE calculées en considérant et en négligeant les interactions des molécules avec le solvant à savoir l'éthanol.....	42

LISTE DES HISTOGRAMMES

Histogramme 1 : Comparaison de l'écart de polarisabilité entre la forme neutre et radicalaire selon les deux approches de notre étude.	35
Histogramme 2 : Comparaison de l'écart de l'entropie entre la forme neutre et radicalaire selon les deux approches de notre étude.	36
Histogramme 3 : Comparaison des énergies moléculaire de l'état neutre selon les deux approches de notre étude.....	37
Histogramme 4 : Comparaison des énergies moléculaire de l'état radicalaire selon les deux approches de notre étude.....	37
Histogramme 5 : Comparaison de l'écart d'énergie entre la forme neutre et radicalaire selon les deux approches de notre étude.....	38
Histogramme 6 : Comparaison des BDE obtenues par les deux approches de notre étude ..	43

Liste des tables

Tableau 1: quelques descripteurs électroniques.....	12
Tableau 2: liste des produits chimiques utilisés et leurs origine.....	17
Tableau 3: concentration des solutions mères, différents volumes et concentrations des solution filles testées.	19
Tableau 4: classes chimiques . Structures, formules brutes et masses molaires des composés volatiles étudiés.	24
Tableau 5: activité de piégeage du radical libre DPPH des molécules étudiées en fonction de la concentration (mg/ml) à partir de leurs absorbances à 517nm.....	25
Tableau 6: valeurs des IC ₅₀ des composés analysés	28
Tableau 7: conformation optimisées de l'état neutre et radicalaire et propriétés thermo-physiques.....	33
Tableau 8: Influence du solvant sur l'écart de polarisabilité entre la forme neutre et radicalaire selon les deux approches de notre étude	35
Tableau 9: Influence du solvant sur l'écart de l'entropie entre la forme neutre et radicalaire selon les deux approches de notre étude	36
Tableau 10: Influence du solvant sur l'écart d'énergie entre la forme neutre et radicalaire selon les deux approches de notre étude	38
Tableau 11: Valeurs de la BDE (AI) en considérant les interactions molécule - solvant.....	39
Tableau 12: Valeurs de la BDE (AI) en considérant les interactions molécule – solvant et les IC ₅₀ correspondants	40
Tableau 13: Valeurs de la BDE (SI) en négligeant les interactions molécule - solvant	41
Tableau 14: Valeurs de la BDE (SI) en négligeant les interactions molécule – solvant et les IC ₅₀ correspondants	41

LISTE DES ABREVIATIONS

DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl
BHT	Butyl-hydroxy-toluène
IC₅₀	Demi-maximal de la concentration d'inhibition (half-maximal inhibitory concentration)
Log	Logarithme
QSAR ou RQSA	Relation quantitative structure-activité
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RSA ou SAR	Relation structure-activité (structure-activity Relationship)
DFT	La théorie de la fonctionnelle de la densité
1D ou 1-D	Descripteurs monodimensionnelles
2D ou 2-D	Descripteurs Bidimensionnelles
3D ou 3-D	Descripteurs tridimensionnelles
4D ou 4-D	Descripteurs quadridimensionnelles
HOMO	L'orbitale moléculaire la plus haute en énergie occupée par au moins un électron
LUMO	L'orbitale la plus basse en énergie non occupée par un électron
µl	Symbole du microlitre
mg/ml	Milligramme par millilitre
SM	Solutions mères
BDE	Énergie de dissociation des liaisons

OH•	Radical hydroxyle
ArOH	Phénol
ArO•	Aryloxy
Abs	Absorbance.
HAT	Transfert d'atome d'hydrogène
AI	Interactions avec le solvant
SI	Interactions sans le solvant
Energie (Kcal/mol)	les énergies des états fondamentaux
H (Kcal/mol)	Des enthalpies
α (u.a)	Polarisabilités
μ (Debey)	Moment dipolaire
S (cal/mol-K)	Des entropies
ΔPol	Écart de polarisabilité
ΔS	Écart de l'entropie
ΔE	Écart d'énergie

Introduction générale

La modélisation moléculaire, est une application des méthodes théoriques et des méthodes de calcul, afin de résoudre des problèmes impliquant la structure moléculaire et la réactivité chimique. Ces méthodes peuvent être relativement simples et utilisables rapidement ou au contraire elles peuvent être extrêmement complexes et demander des centaines d'heures de temps d'ordinateur. Différentes approches sont envisageables dans le cadre des outils de modélisation moléculaire. Nous avons choisi, dans le cadre de cette étude, une des méthodes quantiques à savoir la théorie de la fonctionnelle de la densité, cette dernière est capable de calculer les propriétés électroniques des systèmes.

Ainsi, notre étude repose sur l'étude quantique de la relation structure – activité antioxydante des composés phénoliques suivants : le carvacrol, le thymol, le 2-naphtol et le BHT et leur comparaison à celle des composés non phénoliques comme le menthol et le p-cymène. Aussi, cette étude se fera selon deux approches. Dans la première approche les interactions, des substances étudiées avec le solvant employé, seront prises en considération dans les calculs théoriques. Dans la seconde approche ces interactions seront négligées.

Nous allons aussi, déterminer la somme des enthalpies électroniques et thermiques, des conformations optimisées de chaque molécule, à l'état fondamental et radicalaire.

Enfin, l'énergie de la bonde de dissociation de la liaison O-H des différentes molécules étudiées sera calculée selon les deux approches déjà mentionnées. Cette dernière est largement décrite dans la littérature comme facteur clé dans l'évaluation du pouvoir antiradicalaire des substances chimiques.

Ainsi, le travail de ce mémoire peut être divisé en trois parties importantes.

- La première partie est une recherche bibliographique succincte sur les antioxydants et les méthodes de calcul théorique.
- La deuxième partie regroupe les méthodes employées pour la réalisation de notre travail expérimentale à savoir la mesure des IC_{50} et les méthodes de calcul adoptées.
- La troisième partie présente tous les résultats obtenus ainsi que leurs discussions.

Enfin, en terminera par une conclusion générale qui présentera les résultats importants de notre travail

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES ANTIOXYDANT

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES ANTIOXYDANT

. Définition des antioxydants

Les antioxydants sont définis par HALLIWELL comme « toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat »[1].

Les antioxydants piègent les radicaux libres en inhibant les réactions à l'intérieur des cellules provoquées par les molécules de dioxygène et de peroxyde, aussi appelées espèces oxygénées radicalaires (EOR) et espèces azotées radicalaires[1].

Les antioxydants sont largement présents dans nos aliments, soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire[1].

Classification des antioxydants

I.1. Classification des antioxydants par rapport à leurs mécanismes d'action

Il y a deux options pour retarder la réaction d'oxydation :

- Soit intercepter les radicaux libres responsables de la réaction en chaîne.
- Soit éviter la décomposition des hydro peroxydes dans les radicaux libres.

Ces deux options fournissent la base de classification des antioxydants sous forme primaire ou secondaire selon leur mécanisme d'action[1].

I.2. Classification des antioxydants suivant la nature chimique dans les aliments

Les antioxydants sont classés dans trois catégories différentes (naturelles, synthétiques et synergiques).

a) **Antioxydants naturels**

Les antioxydants naturellement sont présents dans presque toutes les plantes, tous les micro-organismes, les champignons et même dans les tissus animaux. Le groupe le plus important d'antioxydants naturel comprend la vitamine E (tocophérol), les flavonoïdes et autres composés végétaux[2].

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES ANTIOXYDANT

b) Antioxydants synthétiques

Il existe des nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels. Pour une utilisation pratique, les antioxydants doivent remplir les conditions suivantes : Ils ne doivent pas être toxiques, ils doivent être hautement actifs à des faibles concentrations (0.01-0.02%) et doivent être présents à la surface ou dans la phase grasse de l'aliment[3].

c) Antioxydants synergiques

Les antioxydants synergiques sont des substances qui ne sont guère actives en tant qu'antioxydants, et dont les propriétés apparaissent surtout en présence des autres antioxydants. Il en est ainsi des lécithines, des acides citrique et tartrique, des acides aminés, de certains flavonoïdes. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatants de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants. Certains produits ont un effet inhibiteur de la décomposition des hydro peroxydes, et d'autres semblent régénérer des antioxydants, comme les tocophérols ou les dérivés de l'acide ascorbique à partir de leurs formes oxydées[1].

I 2.1-Les antioxydants naturels

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif [4].

I.2.1.1. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (La superoxydes dismutases, la catalase, le glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS[5].

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES ANTIOXYDANT

a) Les superoxydes dismutases (SOD)

Les **SOD** sont des métalloprotéines, qui permettent l'élimination des anions superoxydes(O_2^-) ou tout au moins de les maintenir à un niveau de concentration assez bas, par dismutation en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en une molécule d'oxygène (O_2)[6].

b) La glutathion peroxydase (GSHPx)

La **GSHPx** est localisée dans les milieux extracellulaires, le cytosol et les mitochondries. Ces enzymes réduisent le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (**GSH**) sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (**GSSG**)[7].

c) La Catalase (CAT)

La catalase est une enzyme qui contient du fer. Elle est concentrée dans le foie et les érythrocytes. Elle réduit le peroxyde d'hydrogène en libérant de l'oxygène et de l'eau et leurs rôles est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier[8].

I.2.1.2- Les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non-enzymatiques sont des molécules qui possèdent dès la capacité de piéger les radicaux libres et les désactiver[9].

a) La vitamine E

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature : les α -, β -, γ - et δ -tocophérols et tocotriénols. Elle intervient directement au niveau des membranes biologiques où elle piège les radicaux libres avant qu'ils n'atteignent leurs cibles[10].

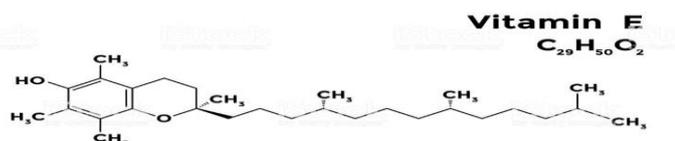


Figure 1 :structure d la vitamine E[11].

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES ANTIOXYDANT

b) La vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C est un antioxydant puissant (fig. 2). Elle participe dans les réactions avec la vitamine E et l'enzyme glutathion peroxydase pour neutralisation des radicaux libres. La vitamine C entre en synergie avec vitamine E au niveau des compartiments hydrophiles de la cellule où elle est trouvée capable de réduire l'anion superoxydes ainsi que les radicaux hydroxyles. Il est présent dans les légumes, le chou, le poivron, les agrumes. Elle joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E[12].

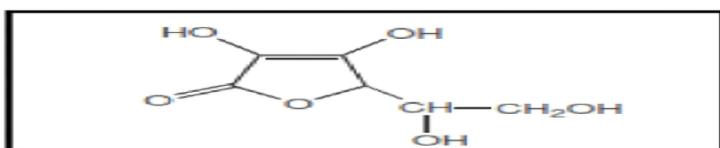


Figure 2 :structure de l'acide ascorbique[13].

C) Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments fabriqués par les végétaux. Les plus importants sont le bêta-carotène, l'alpha-carotène, la lutéine, la zéaxanthine et le lycopène. Ce sont eux qui donnent aux fruits et légumes des couleurs orange, rouge et jaune. Leur fonction essentielle est de protéger les plantes.

La plupart des caroténoïdes ont une propriété antioxydante [3]. Comme ils le font pour les plantes, ils ont des effets bénéfiques sur notre santé [14]. Ce sont d'excellents piègeurs d'espèces radicalaires particulièrement vis-à-vis de la lipoperoxydation des phospholipides membranaires grâce à leurs structures[3].

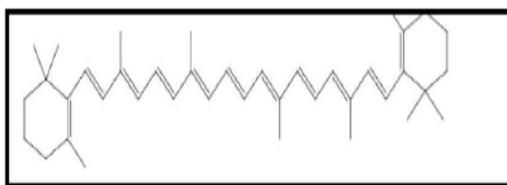


Figure 3 :structure de la B-carotène[15].

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES ANTIOXYDANT

I.3-Méthode d'étude d'activité des antioxydants.

I.3.1- le test de piégeage du radical DPPH

Principe

Cette analyse simple dans son application, Le radical DPPH^+ (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) est stable à température ordinaire et présente une coloration violette bien caractéristique. Les antioxydants présents dans l'échantillon le réduisent entraînant une décoloration facilement mesurable par spectrophotométrie à 517 nm. La méthode est généralement standardisée par rapport au Trolox[16].

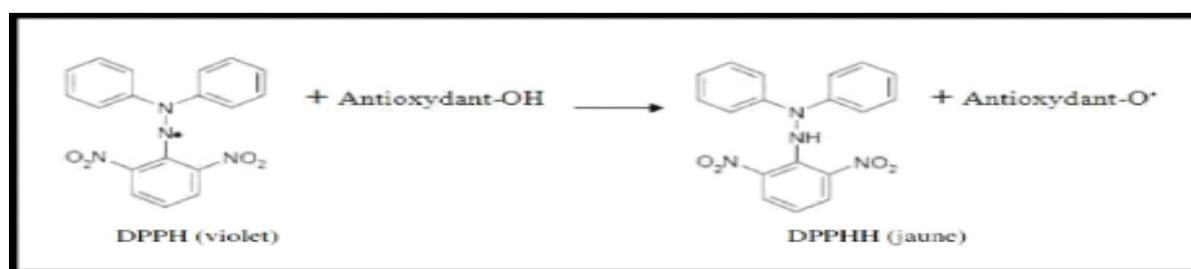


Figure 4 :piégeage du radical libre DPPH[17].

Mode opératoire

Un volume de 100 μl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 100 μl du méthanol avec 1ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Des standards de référence (acide ascorbique et BHA) ont également été analysés en respectant la même procédure.[18].

Le pourcentage de neutralisation du radical de DPPH est calculé selon la formule suivante :

$$\text{AA}\% = [(\text{Abs control} - \text{Abs test}) / \text{Abs control}] \times 100$$

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES ANTIOXYDANT

I.3.2-Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power)

Principe

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par OYAIZ (1986). La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleue selon la figure 5.[19]

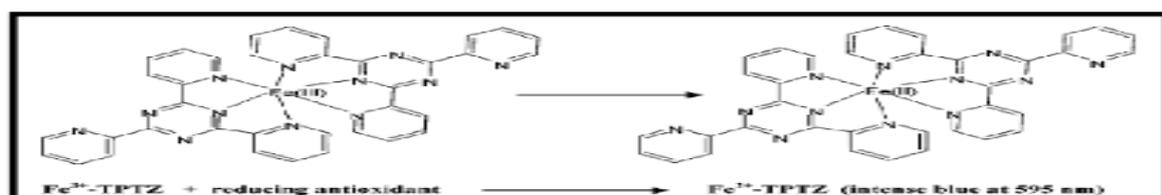


Figure 5 :Schéma sur la réaction de test FRAP[20].

Dosage :

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0,007à 2,5mg/ml) est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2,5ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. Un aliquote (2,5ml) de surnageant est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 (Chlorure ferrique) à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS). Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.[1],Le pourcentage de pouvoir réducteur de fer est calculé par la réaction suivant :[19]

$$\text{Pouvoir réducteur de fer (\%)} = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100$$

A₀ : est l'absorbance de FeCl_3 .

A₁ : est l'absorbance de FeCl_3 solution en présence de l'extrait.

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES ANTIOXYDANT

I.3.3-Test qualitatif au β -carotène

Principe :

Le β -carotène subit une décoloration rapide en l'absence d'antioxydant. Ceci est dû à l'oxydation couplée du β -carotène et de l'acide linoléique, qui génère des radicaux libres. Le radical libre d'acide linoléique formé par l'abstraction d'un atome d'hydrogène d'un de ses groupes méthylène dialylique attaque les molécules de β -carotène hautement insaturées. En conséquence, le β -carotène est oxydé et décomposé ; par la suite, le système perd son chromophore et sa couleur orange caractéristique, qui est surveillée par spectrophotométrie à $\lambda = 470\text{nm}$. En présence d'un agent antioxydant, les radicaux vont être neutralisés, et le β -carotène va conserver la couleur orange[21].

Dosage :

Le protocole expérimental a été basé des travaux de Marco (1968), Miller (1971) et Silvia Taga et al. (1984) avec modifications. Une solution de β -carotène a été préparée dans le chloroforme avec une concentration de 0,5mg/ml, puis 1 ml de cette solution est mélangé avec 20 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 20. Le chloroforme est ensuite évaporé sous vide à 45°C pendant 3 minutes, puis 75ml d'eau distillée a été ajouté à l'émulsion pour former le réactif final. Pour chaque expérience une solution fraîche du réactif a été préparée. 2ml de ce réactif est mélangé ensuite avec 200 μ l de dilution des huiles essentielles préparées dans l'éthanol, une incubation dans un bain marie à 50°C a été faite par la suite et ceci pour 2 heures. L'absorba de chaque dilution a été faite à 470nm. Un control a été préparé dans les mêmes conditions en remplaçant les extraits par le solvant.

Les résultats ont été exprimés en pourcentages d'inhibitions calculés comme suit :[21]

$$I(\%) = \left(\frac{A_{E(120)} - A_{C(120)}}{A_{C(0)} - A_{C(120)}} \right) \times 100$$

Où :

$A_{E(120)}$: est l'absorbance de la solution en présence de l'huile essentielle à $t=120\text{min}$.

$A_{C(120)}$: est l'absorbance du control à $t=120\text{min}$.

$A_{C(0)}$: est l'absorbance du control à $t=0\text{min}$.

**CHAPITRE II : RELATION ACTIVITÉ
ANTIOXYDANT _ STRUCTURE
CHIMIQUE**

II.1-Généralité

L'un des défis les plus importants auxquels font face les chimistes, dans plusieurs domaines, aujourd'hui est la conception de nouvelles formulations (cosmétiques, détergents, pesticides et médicaments) ayant des propriétés améliorées et des effets secondaires diminués. Les chimistes ont commencé le processus en prenant une structure principale du principe actif, puis en trouvant des analogues présentant les propriétés structurales et fonctionnelles préférées telles que les activités biologiques pour les médicaments[22].

La relation structure-activité (SAR) est un domaine important pour la conception de nouvelles formulations ainsi qu'à la recherche des informations relatives à l'influence de la structure chimique sur les activités de ces dernières[23].

II.2-Historique

En 1868, Crum-Brown et Fraser ont publié une équation qui est considérée comme la première formulation générale d'une relation structure-activité. Dans leurs recherches sur différents alcaloïdes, ils ont reconnu que l'alkylation des atomes d'azote basiques produisait des effets biologiques significativement différents des composés d'ammonium quaternaire chargés en permanence, en comparaison avec les amines basiques. Ils ont donc supposé que "l'activité physiologique" devrait être fonction de la structure chimique (équation 1)[24].

$$\emptyset = f(C) \quad (1)$$

\emptyset : valeur d'activité biologique et physiologique.

C : la structure chimique.

En 1893, Richet a découvert que la toxicité des composés organiques suit leur solubilité dans l'eau. Une telle relation correspond à (équation 2).

$$\Delta\emptyset = f(\Delta C) \quad (2)$$

$\Delta\emptyset$: les différences dans les valeurs d'activité biologique, causées par des changements correspondants dans les propriétés chimiques et surtout physicochimiques.

II.3-Définition de SAR

Les relations structure-activité (SAR) représentent le lien entre la structure moléculaire et l'activité biologique ou les propriétés physicochimiques des composés qui sont souvent classés ensemble, car ils ont en commun des caractéristiques structurales telles que la forme, la taille, la disposition stéréochimique et la répartition des groupes fonctionnels. La structure

Chapitre II : Relation activité antioxydant_ structure chimique

moléculaire et l'activité biologique sont corrélées en observant les résultats de la modification structurelle systématique sur des paramètres biologiques définis[25].

Les relations structure-activité (SAR) sont, par exemple, les pratiques traditionnelles de la chimie médicinale qui tentent de modifier l'effet (c'est-à-dire l'activité) ou la puissance de composés chimiques bioactifs en modifiant leur structure chimique. Les chimistes utilisent des techniques de synthèse chimique pour insérer des nouveaux groupes fonctionnels dans les composés biomédicaux. Cette méthode a été ensuite affinée pour construire des relations mathématiques entre une structure chimique et son activité biologique[23].

L'hypothèse de base de la SAR est que les molécules similaires ont des activités similaires. Le paradoxe fait référence au fait que ce n'est pas le cas que toutes les molécules similaires ont des activités similaires, puisque la similarité est un terme subjectif, et qu'il existe une grande diversité dans le type et l'étendue des similarités[25].

. Le problème sous-jacent est donc de savoir comment définir une petite différence au niveau moléculaire, puisque chaque type d'activité, par ex. La capacité de réaction, la capacité de biotransformation, la solubilité, l'activité cible, etc., peut dépendre de cette différence[25].

Pour uniformiser la signification du terme « similarité », des relations mathématiques entre une structure chimique et son activité biologique ont été établies, elles sont connues sous le nom de relation quantitative structure activité (QSAR). La relation quantitative structure activité (QSAR) est le processus par lequel la structure chimique est corrélée quantitativement avec un processus bien défini, tel que l'activité biologique ou la réactivité chimique[25].

L'activité biologique peut être exprimée quantitativement par la concentration d'une substance requise pour donner une certaine réponse biologique. L'expression mathématique peut être alors utilisée pour prédire la réponse biologique d'autres structures chimiques[26].

La réactivité chimique peut être exprimée par des propriétés telles que la lipophilicite, la solubilité et la perméabilité[27].

La forme mathématique la plus générale de QSAR est :[28]

$$\text{Activité} = f(x)$$

X : propriétés physico-chimiques et / ou propriétés structurelles

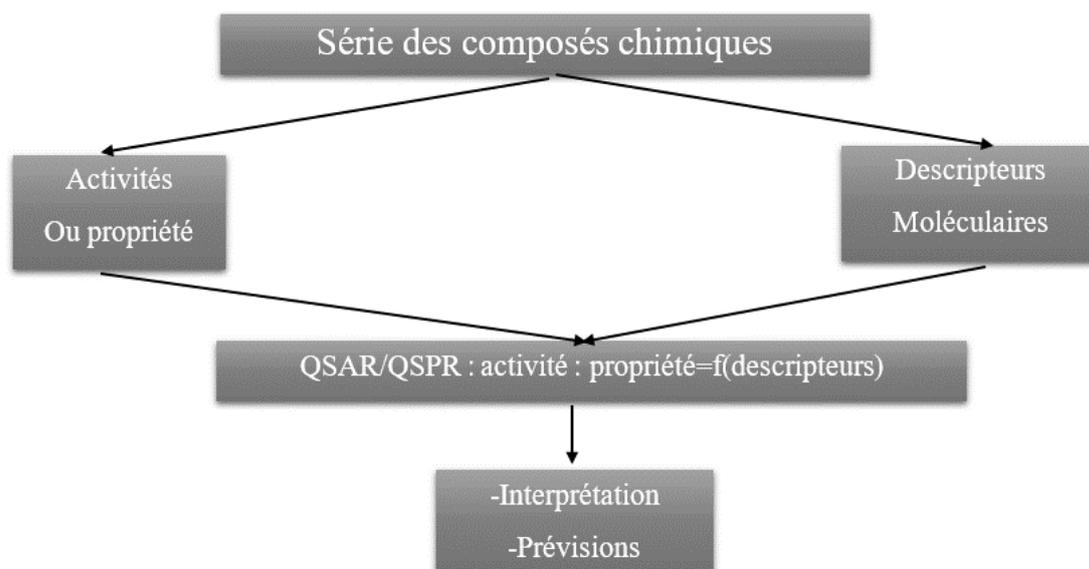


Figure 6: Modelé de l'étude de relation structure activité[28].

L'hypothèse fondamentale de QSAR est que les variations de l'activité biologique d'une série de substances chimiques qui ciblent un mécanisme d'action commun sont corrélées avec les variations de leurs propriétés structurales, physiques et chimiques.

Ces propriétés peuvent être déterminées par des moyens expérimentaux ou informatiques beaucoup plus efficacement que son activité biologique en utilisant des approches *in vitro* ou *in vivo*[29].

II.4- Descripteur moléculaire

Les descripteurs moléculaires sont des représentations mathématiques formelles d'une molécule, obtenues par un algorithme bien défini et appliquées à une représentation moléculaire définie ou à une procédure expérimentale bien définie : le descripteur moléculaire est le résultat final d'une procédure logique et mathématique qui transforme l'information chimique codée dans une représentation symbolique d'une molécule en un nombre utile ou le résultat d'une expérience standardisée[30].

L'information codée par les descripteurs dépend généralement du type de représentation moléculaire et de l'algorithme défini pour son calcul. La classification des descripteurs moléculaires est établie en fonction :

- Leur origine (constitutionnel, géométrique, topologique, thermodynamique, quantique).
- Leur dimensionnalité (1D, 2D, 3D ou 4D).

II.4.1-Les descripteurs 3-D

Les relations structure activité quantitatives en trois dimensions (3D QSAR) sont des modèles qui établissent une relation entre une activité biologique et les paramètres structuraux (descripteurs moléculaires) calculés dans l'espace tridimensionnel pour un groupe de molécule[24].

On distingue plusieurs familles de descripteurs 3D :

▪ Descripteurs géométriques

Sont issus de la structure tridimensionnelle de la molécule, et sont évalués à partir des positions relatives des atomes d'une molécule dans l'espace, ainsi que des rayons et des masses atomiques. En général, les descripteurs géométriques sont calculés soit à partir de la géométrie moléculaire optimisée par modélisation moléculaire soit à partir des coordonnées cristallographiques (coordonnées cartésiennes x, y, z des atomes de la molécule)[31].

Plusieurs classes de descripteurs peuvent être distinguées dans l'ensemble des descripteurs géométriques[32].

▪ Descripteurs électroniques

Sont d'une importance critique dans la détermination des types de forces intermoléculaires qui modulent les interactions des récepteurs médicamenteux, ils décrivent l'influence d'un certain groupe ou d'un substituant sur la distribution de la densité électronique (polarité des molécules)[33], quelques descripteurs sont montrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1: quelques descripteurs électroniques[34].

Descripteur	Définition
L'énergie HOMO (E_{HOMO})	Est le niveau d'énergie le plus élevé dans la Molécule qui contient des électrons
L'énergie LUMO (E_{LUMO})	Est le niveau d'énergie le plus bas dans la molécule qui ne contient pas d'électrons.
Le moment dipolaire (μ)	Mesure la polarité nette moléculaire, qui résulte S'il y a une différence d'électronégativité entre les atomes de molécule.
L'électronégativité (χ)	$\chi = -\mu = -\left(\frac{\partial E}{\partial N}\right)_{v(r)} = -\frac{(E_{LUMO} + E_{HOMO})}{2}$

▪ Descripteurs physicochimiques

Ce sont les propriétés physiques et chimiques d'une molécule qui peuvent être estimées par l'examen de sa structure. Ces propriétés ont un rôle majeur sur l'efficacité des médicaments, le profil de sécurité, et dans la découverte de médicaments en optimisant les composés sélectionnés.

➤ Solubilité

Une solubilité aqueuse adéquate est d'une importance primordiale puisque la dissolution du principe actif dans les fluides dicte la manière de son utilisation. La solubilité aqueuse, à son tour, dépend de plusieurs facteurs tels que la taille et la forme de la molécule, l'hydrophobicité, la liaison hydrogène et l'état cristallin / amorphe[35].

➤ pKa

La prédiction du pKa à partir de la structure moléculaire est un domaine de recherche intense.

➤ Lipophilicite

La lipophilie, fait référence à la capacité d'un composé à se dissoudre dans les graisses, les huiles, les lipides et les solvants non polaires tels que l'hexane ou le toluène[36].

Un log P calculé (Clog P) est couramment utilisé comme une évaluation de la lipophilie

Le coefficient de partage Octanol/Eau :

Il est défini par la formule suivante :[33]

$$\text{Log P} = \log\left[\frac{\text{[Octanol]}}{\text{[Eau]}}\right]$$

[Octanol] : concentration du soluté dans l'Octanol

[Eau] : concentration du soluté dans l'eau.

II.5- Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)

Historiquement, les premiers à avoir exprimé l'énergie en fonction de la densité furent Thomas (1927), Fermi (1927, 1928) et Dirac (1930) sur le modèle du gaz uniforme d'électrons non interagissant. Le but des méthodes DFT est de déterminer des fonctionnelles qui permettent de relier la densité électronique à l'énergie [37].

Cependant, la DFT a véritablement débuté avec les théorèmes fondamentaux de Hohenberg et Kohn en 1964 [38] qui établissent une relation fonctionnelle entre l'énergie de l'état fondamental et sa densité électronique.

Dans le cadre de l'approximation de Born-Oppenheimer, l'hamiltonien peut s'écrire sous la forme :

$$H_{el} = T_e + V_{eN} + V_{ee}$$

Puisque tous les opérateurs peuvent être une fonction de la densité, l'énergie d'un système s'écrit :

$$E = T(\rho) + E_{eN}(\rho) + E_{ee}(\rho)$$

Avec $T(\rho)$ représentant l'énergie cinétique et $E_{eN}(\rho)$ et $E_{ee}(\rho)$ représentant respectivement les énergies d'interactions électrostatiques entre les noyaux et électrons d'un côté et entre électrons pour le deuxième terme. En référence avec la méthode Hartree-Fock, le terme $E_{ee}(\rho)$ peut se décomposer en une partie coulombienne $J(\rho)$ et une partie définissant l'échange $K(\rho)$ [39].

Les méthodes de la DFT se sont popularisées après que Kohn et Sham aient proposé un développement faisant intervenir la notion d'orbitale. L'idée sous-jacente de Kohn-Sham était de séparer l'énergie cinétique en deux parties, l'une pouvant être calculée exactement, T_s , et l'autre apparaissant comme une petite correction à apporter à l'énergie. Dans ce deuxième terme, apparaît alors la corrélation électronique[39].

L'énergie totale DFT s'écrit alors :

$$E_{DFT}(\rho) = T_s(\rho) + E_{eN}(\rho) + J(\rho) + E_{xc}(\rho)$$

L'énergie DFT (EDFT) atteindra l'énergie exacte si et seulement si le terme E_{xc} (énergie d'échange-corrélation) est calculé exactement. Tout le but des développements récents dans le cadre des méthodes de la Fonctionnelle de la Densité est donc de calculer au mieux cette partie d'échange-corrélation[40].

Chapitre II : Relation activité antioxydant_ structure chimique

Il existe plusieurs fonctionnelles qui permettent le calcul par DFT

Fonctionnelle hybride B3LYP :

La fonctionnelle hybride B3LYP (Becke 3-parameters Lee-Yang-Parr) consiste à une hybridation (mélange) de plusieurs fonctionnelles de différentes méthodes.

Il est fort intéressant de noter que n'importe quelle fonctionnelle d'échange (ou de corrélation) d'une méthode peut être combiné avec n'importe quelle fonctionnelle d'échange (ou de corrélation) d'une autre méthode. Ainsi, dans notre travail nous allons effectuer un calcul DFT avec la fonctionnelle d'échange de Becke et la fonctionnelle de corrélation de Lee-Yang-Parr, avec les orbitales de Kohn et Sham développées sur base gaussienne de type 6-311G (d, p)[41].

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODE

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODE

Dans ce chapitre nous allons présenter l'essentielle du matériel utilisé pour réaliser nos expériences ainsi que les méthodes de travail choisies pour déterminer l'activité antioxydante des produits naturels et synthétiques étudiés, bien sûr en précisant la méthode théorique employée pour mettre en relief la relation structure-activité.

Tout cela a été réalisé au niveau des laboratoires pédagogiques du département de chimie de la faculté des sciences de l'université Saad Dahleb-Blida.

III.1- matériels et produits

III.1.1 matériels

- ✓ Le suivi de la variation de l'absorbance de nos échantillons, par spectrophotométrie UV-visible, a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre, JASCO, type v-630 à double faisceau.
- ✓ L'utilisation d'une balance analytique de marque PERKIN 550 pour effectuer les pesées avec une plus grande précision.
- ✓ Les représentations tridimensionnelles, des conformations les plus stables des molécules étudiées, ont été faites grâce au logiciel GaussView6.0
- ✓ La partie théorique et quantique de ce travail a été effectuée par le logiciel Gaussian09W.



Figure 7: spectrophotométrie UV-visible[42].

III.1.2 produits chimiques

Le tableau 2 Regroupe l'ensemble des produits chimiques utilisés pour la réalisation de notre travail expérimental.

Tableau 2: liste des produits chimiques utilisés et leurs origine.

Réactifs chimiques	Origine
BHT	fluka
2-naphtol	fluka
Carvacrol	fluka
thymol	fluka
menthol	fluka
p-cymène	fluka
DPPH	fluka
éthanol	Sigma

III.2-1 Test de piégeage du radical DPPH

Un nombre important d'études théoriques, sur la relation structure – activité antioxydante, ont choisie comme test de piégeage des radicaux celui du radical libre et stable 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH). Ce fut notre cas aussi.

Le principe du test a été décrit par LE BOIS et all, en 1958[43], il consiste à additionner une solution du radical DPPH à une solution éthanolique (ou méthanolique) contenant un composé potentiellement antioxydant et pouvant céder un atome d'hydrogéné, ce qui entraine une diminution de la coloration violette caractéristique du DPPH sous sa forme radicalaire et l'apparition de la forme réduite de DPPH, c'est-à-dire la forme DPPH₂ de coloration jaune. Comme le montre le schéma figure 8.

La réduction du DPPH est facilement mesurée par spectrophotométrie à 517 nm, 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

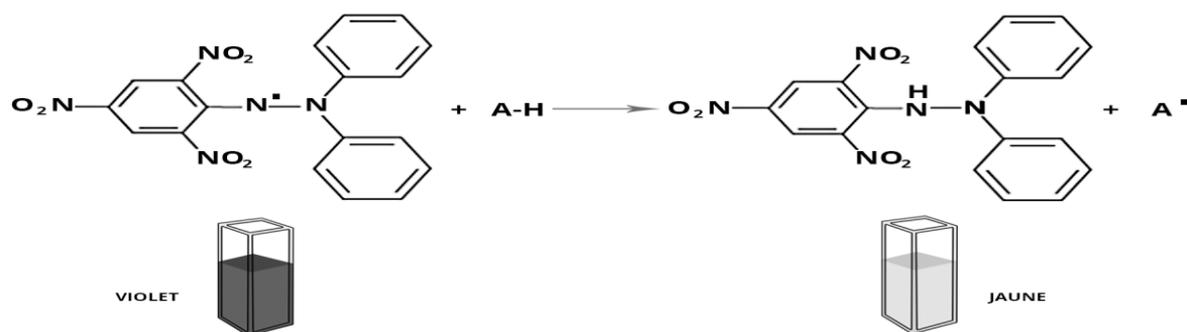


Figure 8: réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant[44].

III.2.1.1-Mode opératoire

- Préparation des solutions mères : on pèse les masses des composés purs à savoir le BHT, le Carvacrol, le thymol, le menthol, le p-cimène et le 2-naphtol qu'on solubilise dans l'éthanol sous agitation jusqu'à miscibilité totale (chaque produit dans un bécher).
- La solution de DPPH est préparée au préalable dans l'éthanol à raison de 4 mg/100 ml d'éthanol (au moins 3 à 4 heures) car sa solubilisation est difficile.
- Différents volumes, en μl , de la solution mère de chaque produit, ont été transvasés dans des tubes à essai et complétés par de l'éthanol jusqu'à atteindre le volume total de 1 ml. Les solutions formées représentent les solutions diluées nommées solutions filles.
- Pour chaque solution fille le test est répété trois fois.
- Les solutions filles sont additionnées de 1ml de la solution de DPPH. La réaction est réalisée dans un volume total de 2 ml.
- On incube à la température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes, l'absorbance est mesurée à 517 nm.
- L'activité antioxydante est estimée selon l'équation suivante :

$$AA \% = \frac{[(ABS_{\text{control}} - ABS_{\text{échantillon}})]}{ABS_{\text{control}}} * 100$$

Soit :

ABS control : absorbance à la longueur d'onde de 517nm de la solution de DPPH dans l'éthanol.

ABS échantillon : absorbance à 517 nm de chaque échantillon.

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODE

Le tableau 3 Englobe les concentrations ainsi que les volumes de chaque échantillon.

Tableau 3: concentration des solutions mères, différents volumes et concentrations des solution filles testées.

Composés	SM(mg/ml)	V(μ l)	[C] (mg/ml)
Carvacrol	10 (mg/ml)	0	0
		20	0,1
		40	0,2
		60	0,3
		80	0,4
		100	0,5
		120	0,6
		150	0,75
		200	1
		400	2
		500	2,5
Menthol	500 (mg/ml)	0	0
		100	25
		150	37,5
		200	50
		300	75
		400	100
		500	125
		700	175
2-Naphtol	10 (mg/ml)	0	0
		2	0,01
		10	0,05
		15	0,075
		20	0,1
		40	0,2
		60	0,3
		80	0,4
		100	0,5
		120	0,6

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODE

		150	0,75
		200	1
		400	2
BHT		5	0,0005
		20	0,002
		40	0,004
		60	0,006
		80	0,008
		100	0,01
		200	0,02
		300	0,03
		400	0,04
		500	0,05
P-Cymène	0,2 (mg/ml)	0	0
		20	5
		50	12,5
		100	25
		150	37,5
		200	50
		300	75
		400	100
		500	125
		600	150
Thymol	10 (mg/ml)	0	0
		20	0,1
		40	0,2
		60	0,3
		80	0,4
		100	0,5
		120	0,6
		150	0,75
		200	1
		500	2,5

III.2.1.2- Etude théorique des composés phénoliques par la méthode de DFT

La modélisation moléculaire est une application des méthodes théoriques et des méthodes de calcul pour résoudre des problèmes impliquant la structure moléculaire et la réactivité chimique. Ces méthodes peuvent être relativement simples et utilisables rapidement ou au contraire elles peuvent être extrêmement complexes et demander des centaines d'heures de temps d'ordinateur. Différentes approches sont envisageables dans le cadre des outils de modélisation moléculaire. Nous avons choisi, dans le cadre de cette étude, une des méthodes quantiques à savoir la théorie de la fonctionnelle de la densité, cette dernière est capable de calculer les propriétés électroniques des systèmes.

Ainsi, notre étude repose sur l'étude quantique de la relation structure – activité antioxydante des composés phénoliques suivants : le Carvacrol, le thymol, le 2-naphtol et le BHT et leur comparaison à celle des composés non phénoliques comme le menthol et le p-cymène. Aussi, cette étude se fera selon deux approches. Dans la première approche les interactions, des substances étudiées avec le solvant employé, seront prises en considération dans les calculs théoriques. Dans la seconde approche ces interactions seront négligées.

La méthodologie générale d'une étude relation structure - activité est la suivante :

- Constituer la base de données structure – activité à partir de mesures quantitatives, fiables pour chaque composé.
- Sélectionner des descripteurs moléculaires en relation avec l'activité cible afin de traduire de manière numérique la structure des molécules.
- Les géométries d'équilibre ont été optimisées au niveau du calcul B3LYP/6-3111G+ en utilisant le programme Gaussian09 W et les structures ont été visualisés avec GaussView6.0.
- Les énergies et les enthalpies ont été calculées avec les formules dérivant de la thermodynamique statistique standard et les fréquences de vibration calculées au niveau B3LYP /6-3111G+ caractérisées par des valeurs positives (pas de fréquences imaginaires) afin de confirmer la stabilité des géométries optimisées (minimum absolu).
- L'effet du solvant a été pris en compte dans la première approche et négligé dans la deuxième approche.

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODE

Ainsi, nous allons déterminer la somme des enthalpies électroniques et thermiques, des conformations optimisées de chaque molécule, à l'état fondamental et radicalaire. Enfin, l'énergie de la bonde de dissociation de la liaison O-H des différentes molécules étudiées sera calculée selon les deux approches déjà mentionnées.

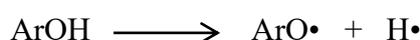
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Notre travail expérimental visé essentiellement, dans une première étape, à déterminer le pouvoir antioxydant de substances phénoliques naturelles et synthétiques, tel que le Carvacrol, le thymol, le 2-naphtol et le BHT. Ceci nous a permis de calculer les IC₅₀ de ces derniers et de les classer par ordres croissants de leurs pouvoirs antioxydants.

Dans une deuxième étape, nous avons réalisé une étude théorique sur la réaction de piégeage du radical libre DPPH[•], par les composés étudiés.

Aussi, il est décrit dans la littérature que la réaction de piégeage du DPPH[•] par les composés phénoliques étudiées suit un mécanisme de transfert de proton 'HAT' [45], comme l'indique le schéma ci-dessous :



Ce mécanisme est gouverné par l'énergie de dissociation homolytique de la bonde O-H 'BDE' du groupement phénolique. Cette énergie a été calculée par la relation ci-dessous :

$$\text{BDE} = \text{H}(\text{ArO}^{\bullet}) + \text{H}(\text{H}^{\bullet}) - \text{H}(\text{ArOH})$$

H(ArOH) : Enthalpie électronique et thermique de la molécule neutre.

H(ArO[•]) : Enthalpie électronique et thermique du radical.

Dans ces calculs, l'enthalpie de l'atome d'hydrogène H(H[•]) est prise de la littérature elle est égale à -313,7515 kcal/mol[45].

On note que, lorsque la valeur de la BDE diminue la rupture homolytique de la bonde O-H devient plus facile, il s'ensuit un pouvoir antiradicalaire plus important[46]. C'est ce que nous avons essayé de vérifier dans la troisième étape de notre travail.

On a discuté la corrélation entre l'étude purement expérimentale, c'est-à-dire la détermination des IC₅₀, et l'étude théorique à savoir les BDE calculées et les différents descripteurs globaux correspondants.

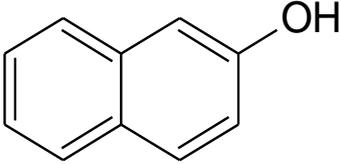
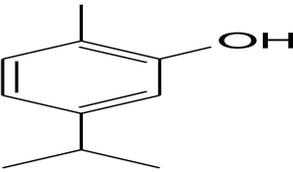
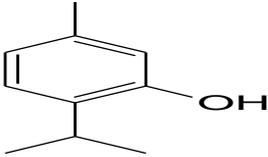
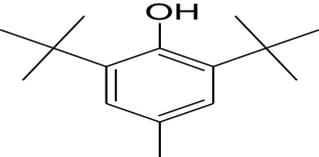
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Nous signalons aussi que la deuxième et la troisième étape ont été réalisées selon deux approches. Selon la première approche, nous avons négligé les interactions des molécules étudiées avec le solvant utilisé dans le test DPPH. Alors que, dans la deuxième approche l'effet du solvant a été pris en compte.

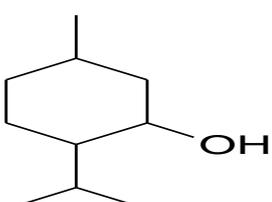
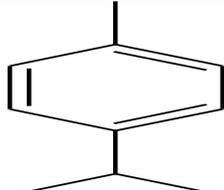
En parallèle à ce travail, nous avons essayé de mettre en évidence l'influence de la structure phénolique, c'est-à-dire l'existence de la forme 1-hydroxyphényle dans les molécules étudiées, sur l'IC₅₀ et la BDE. Pour cela, nous avons étudié selon la méthodologie précédente le menthol et le p-cymène.

Le tableau 4 regroupe l'ensemble des molécules étudiées, leurs structures chimiques, formules brutes, et leurs masses molaires.

Tableau 4: classes chimiques . Structures, formules brutes et masses molaires des composés volatiles étudiés.

composé	Structure	Formule brute	Masse molaire (g·mol ⁻¹)
2-naphtol		C ₁₀ H ₈ O	144,1699
Carvacrol		C ₁₀ H ₁₄ O	150,2176
Thymol		C ₇ H ₈ O ₂	124,1372
BHT		C ₁₅ H ₂₄ O	220,3505

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

menthol		$C_{10}H_{20}O$	156,2752
p-cymène		$C_{10}H_{14}$	134,222

IV.1-Méthode de piégeage du radical libre DPPH

En appliquant le principe de la méthode, déjà décrit précédemment, le suivi de la diminution de l'absorbance, de la forme radicalaire du DPPH, à 517 nm par spectrophotométrie UV-visible nous a permis de déterminer les IC_{50} des molécules étudiées.

Les résultats de l'analyse par spectrophotométrie UV-visible des échantillons étudiés sont regroupés dans le tableau 5.

Tableau 5: activité de piégeage du radical libre DPPH des molécules étudiées en fonction de la concentration (mg/ml) à partir de leurs absorbances à 517nm.

Composés	[C] (mg/ml)	Abs a 517 nm	Activité (%)
Carvacrol	0	0,598	0
	0,1	0,456	23,75
	0,2	0,4	33,11
	0,3	0,335	43,98
	0,4	0,301	49,67
	0,5	0,277	53,68
	0,6	0,249	58,36
	0,75	0,231	61,37
	1	0,187	68,73
2-naphtol	0	0,57	0
	0,05	0,369	35,26
	0,075	0,349	38,77
	0,1	0,298	47,72
	0,2	0,23	59,65
	0,3	0,19	66,67

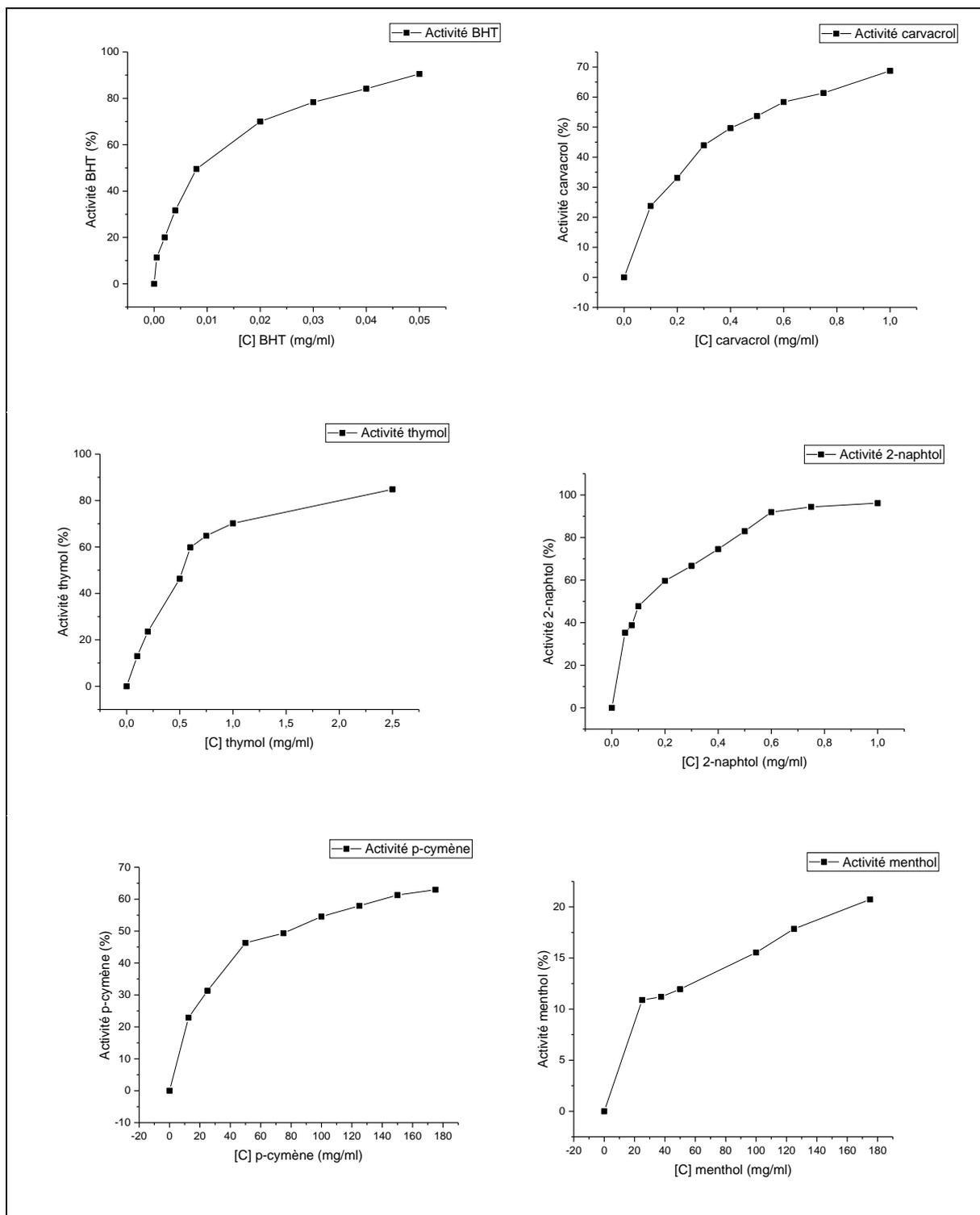
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

	0,4	0,145	74,56
	0,5	0,097	82,98
	0,6	0,046	91,93
	0,75	0,032	94,39
	1	0,022	96,14
thymol	0	0,54	0
	0,1	0,47	12,96
	0,2	0,413	23,52
	0,5	0,29	46,30
	0,6	0,217	59,82
	0,75	0,19	64,82
	1	0,161	70,19
	2,5	0,082	84,82
Menthol	0	0,661	0
	25	0,589	10,89
	37,5	0,587	11,20
	50	0,582	11,95
	100	0,559	15,54
	125	0,543	17,85
	175	0,524	20,73
p-cymène	0	0,594	0
	12,5	0,458	22,9
	25	0,408	31,31
	50	0,319	46,3
	75	0,301	49,33
	100	0,27	54,55
	125	0,25	57,91
	150	0,23	61,28
	175	0,22	62,96
BHT	0	0,6	0
	0,0005	0,532	11,33
	0,002	0,48	20
	0,004	0,41	31,67
	0,008	0,303	49,5
	0,02	0,18	70
	0,03	0,13	78,33
	0,04	0,095	84,17
	0,05	0,057	90,5

Pour calculer les valeurs des IC_{50} nous avons établi les courbes représentant la variation de l'activité de piégeage du radical libre DPPH en fonction de la variation de la concentration des différentes molécules naturelles et synthétiques étudiées. Comme la montre la figure 9.

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Figure 9: variation de l'activité de piégeages du radical libre DPPH en fonction de la variation de la concentration des différentes molécules étudiées.



CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Sachant que, l'IC₅₀ est définie comme étant la concentration du substrat qui induit le piégeage de 50% du radical libre DPPH, on a pu à partir des courbes précédentes déterminer, pour une activité de 50%, la concentration de chaque molécule étudiée qui correspond à cette activité. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6: valeurs des IC₅₀ des composés analysés

Composés	IC ₅₀ mg/ml
BHT	0.00829
2-naphtol	0.11723
Carvacrol	0.41436
Thymol	0.52838
p-cymène	78.58413
Menthol	> 180

Selon la définition du pouvoir antioxydant, une valeur élevée du IC₅₀ indique un pouvoir antioxydant faible de la molécule concernée et inversement. Et d'après la lecture du tableau ci-dessus on a pu classer les molécules étudiées selon leurs IC₅₀ croissants comme suit :

$$IC_{50}^{BHT} \ll IC_{50}^{2-naphtol} < IC_{50}^{carvacrol} < IC_{50}^{thymol} < IC_{50}^{p-cymène} < IC_{50}^{menthol}$$

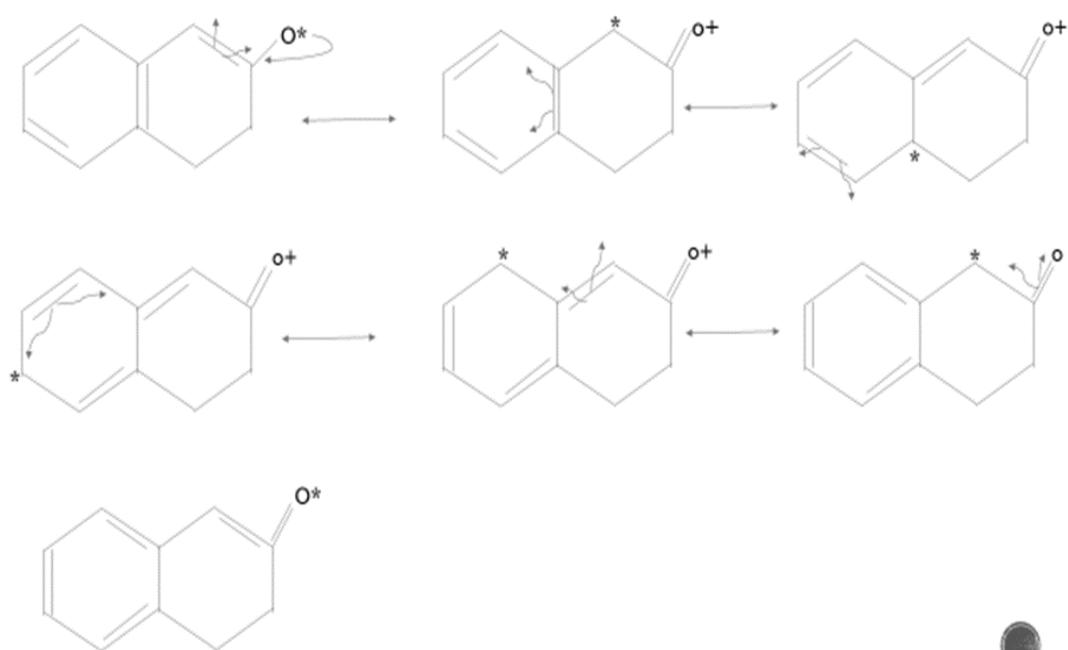
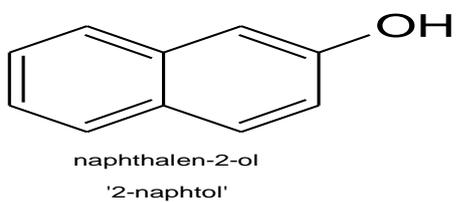
Comme l'activité est inversement proportionnelle à l'IC₅₀ on obtient l'ordre décroissant de l'activité antioxydante comme ci-dessous :

$$Activité_{50\%}^{BHT} \gg Activité_{50\%}^{2-naphtol} > Activité_{50\%}^{carvacrol} > Activité_{50\%}^{thymol} > Activité_{50\%}^{p-cymène} > Activité_{0\%}^{menthol}$$

Selon le mécanisme HAT mis en jeu, la réactivité des composés étudiés repose sur la formation et la stabilité du radical formé, à savoir le radical aryloxy (ArO·). Ainsi, plus ce dernier est stable, plus l'activité de la molécule est importante. Par ailleurs, il est bien connu, dans la littérature, que l'aryloxy stabilisé par résonance est l'un des principaux mécanismes d'actions antioxydantes des phénols.

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Selon les formules développées des molécules traitées, le 2-naphtol, avec deux noyaux benzéniques, voir la structure ci-dessous, présente un nombre plus important de forme mésomère que les molécules à un seul noyau benzénique. (Voir le schéma ci-dessous)

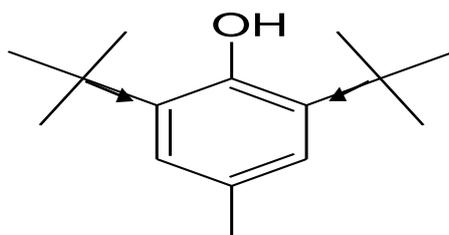


CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Ainsi, le radicale formé par le 2-naphtol est plus stable que les radicaux formés par le cavacrol et le thymol. Ceci est vérifié expérimentalement puisque $l'EC_{50}^{2\text{-naphtol}}$ (0.11723 mg/ml) est plus faible que $l'EC_{50}^{\text{carvacrol}}$ (0.41436 mg/ml) et $l'EC_{50}^{\text{thymol}}$ (0.41436 mg/ml).

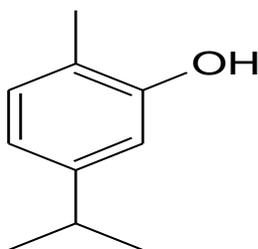
Toutefois, $EC_{50}^{\text{BHT}} \ll EC_{50}^{2\text{-naphtol}}$ ce qui le rend le plus actif parmi les molécules traitées.

Selon la structure développée du BHT comme la montre la structure ci-dessous :

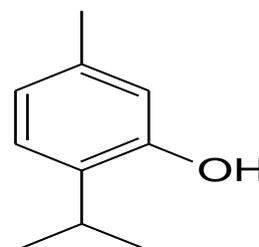


On peut supposer que les groupements tertibutyles, en position ortho et donneurs par effets inductifs, renforcent la délocalisation de l'électron célibataire de l'oxygène sur le noyau aromatique, ce qui augmentera la stabilité du radical correspondant et par conséquent son activité antiradicalaire.

Aussi, nous constatons que $l'activité_{50\%}^{\text{carvacrol}} > l'activité_{50\%}^{\text{thymol}}$. Si nous comparons les formules développées de ces deux molécules phénoliques. Voir les structures ci-après.



2-methyl-5-(propan-2-yl)phenol
' carvacrol '



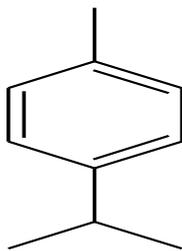
5-methyl-2-(propan-2-yl)phenol
' thymol '

On remarque que ces deux composés forment des isomères de position de la fonction hydroxyle. Ceci indique que la position 2-méthyle 5-isopropyl des substituants sur le noyau phénolique est plus favorable à la formation du radical aryloxy que la position 5-méthyle 2-isopropyle.

Enfin, nous constatons une synergie structurale positive sur l'activité antiradicalaire, entre la fonction hydroxyle et le noyau benzénique car, l'étude de l'activité antioxydante à montrer que la présence du noyau benzénique seul dans une structure semblable à celle du

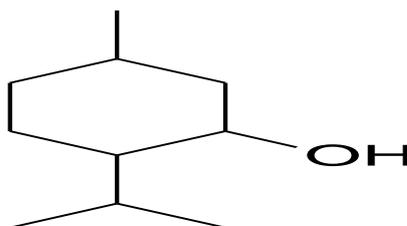
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

thymol à savoir le p-cymène augmente l'IC₅₀ de 0.41436 mg/ml à 78.58413 et du coup l'activité diminue considérablement. Voir la structure qui suit.



1-methyl-4-(propan-2-yl)benzene
'p-cymène'

De même, dans le cas du menthol la présence de la fonction hydroxyle en absence du noyau benzénique (absence de l'aromaticité) augmente l'IC₅₀ à une valeur supérieure à 180 mg/ml, ce qui le rend moins actif de tous les composés étudiés. Voir la structure.



Ces constatations, qui relient entre les structures chimiques de nos produits étudiés et leurs pouvoirs antioxydants, nous ont amené à entreprendre une étude théorique quantique qui traite la relation structure - activité de ces derniers. Les résultats de cette étude sont présentés dans ce qui suit.

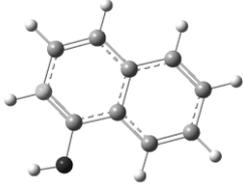
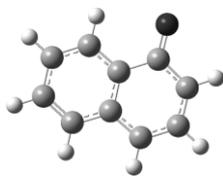
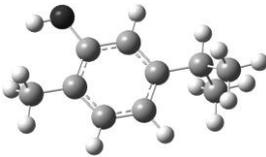
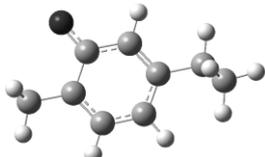
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.2-Application de la méthode DFT

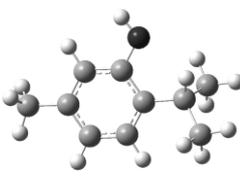
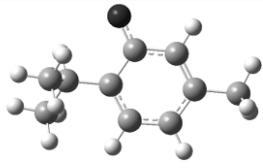
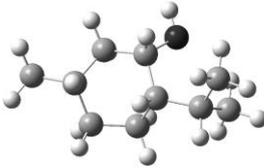
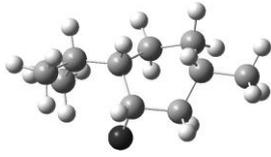
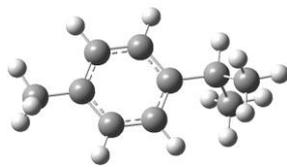
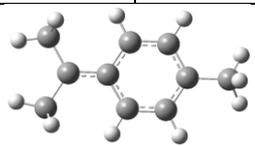
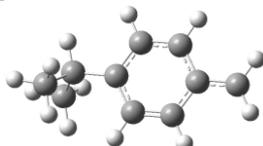
L'étape de l'optimisation ou la recherche des conformations les plus stables de nos molécules étudiées, ainsi que, l'étude des fréquences vibrationnelles par le programme Gaussian09W, en utilisant la méthode DFT et la base de calcul 6-311G+, nous a permis, en premier lieu, de déterminer la conformation optimisée de l'état moléculaire fondamental et de l'état moléculaire radicalaire du 2-naphtol, du BHT, du carvacrol, du thymol, du p-cymène et du menthol. Ainsi que, les énergies des états fondamentaux et radicalaires, des enthalpies électroniques et thermiques H, des polarisabilités α , des moments dipolaires μ et des entropies S. Et cela en en prenant en considération les interactions avec le solvant (**AI**) utilisé dans le test DPPH, à savoir l'éthanol, dans une première approche, et en négligeant ces interactions (**SI**) dans une deuxième approche. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le tableau 7.

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 7: conformation optimisées de l'état neutre et radicalaire et propriétés thermo-physiques.

	Conformation optimisée de l'état moléculaire fondamental		Conformation optimisée de l'état moléculaire radicalaire	
2-naphtol				
	Avec interaction avec le solvant	Sans interaction avec le solvant	Avec interaction avec le solvant	Sans interaction avec le solvant
Energie (Kcal/mol)	-289352,7765	-289347,5124	-288957,5073	-288951,2674
H (Kcal/mol)	-289252,0547	-289246,7875	-288864,8082	-288858,6298
α (u.a)	164,345667	118,678333	171,462	120,154333
μ (Debey)	1,923924	1,419161	6,364143	4,388083
S (cal/mol-K)	87,229	87,426	87,992	87,896
BHT				
	Avec interaction avec le solvant	Sans interaction avec le solvant	Avec interaction avec le solvant	Sans interaction avec le solvant
Energie (Kcal/mol)	-414951,8625	-414948,6704	-414560,9306	-414557,7969
H (Kcal/mol)	-414716,9636	-414713,3705	-414333,1357	-414329,6274
α (Kcal/mol)	236,707333	179,02	243,841667	181,896
μ (Debey)	2,09153	1,53246	5,278854	3,61074
S (cal/mol-K)	134,016	134,426	135,603	135,549
Carvacrol				
	Avec interaction avec le solvant	Sans interaction avec le solvant	Avec interaction avec le solvant	Sans interaction avec le solvant
Energie (Kcal/mol)	-291624,9492	-291616,4666	-291222,9099	-291217,4606
H (Kcal/mol)	-291477,8173	-291472,8964	-291087,4634	-291081,9395
α (Kcal/mol)	156,495333	119,767333	162,506667	121,517667
μ (Debey)	2,176447	1,695471	5,896671	4,160124
S (cal/mol-K)	105,048	104,956	105,578	105,729

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

	Conformation optimisée de l'état moléculaire fondamental		Conformation optimisée de l'état moléculaire radicalaire	
thymol				
	Avec interaction avec le solvant	Sans interaction avec le solvant	Avec interaction avec le solvant	Sans interaction avec le solvant
Energie (Kcal/mol)	-291620,514	-291616,2551	-291222,0565	-291216,8181
H (Kcal/mol)	-291476,9444	-291472,5507	-291086,5096	-291081,1777
α (Kcal/mol)	156,94	119,762667	162,674	121,268333
μ (Debey)	2,092709	1,674373	5,824157	4,008105
S (cal/mol-K)	106,653	107,877	108,536	107,517
Menthol				
	Avec interaction avec le solvant	Sans interaction avec le solvant	Avec interaction avec le solvant	Sans interaction avec le solvant
Energie (Kcal/mol)	-293878,7887	-293875,8608	-293464,7986	-293461,8274
H (Kcal/mol)	-293690,5642	-293687,293	-293284,9048	-293281,6198
α (Kcal/mol)	153,881667	118,898333	158,592333	120,519333
μ (Debey)	2,662602	2,040882	3,59061	2,607172
S (cal/mol-K)	107,476	106,958	108,651	108,64
p-cymène			R1-	
			R2-	
	Avec interaction avec le solvant	Sans interaction avec le solvant	Avec interaction avec le solvant	Sans interaction avec le solvant
Energie (Kcal/mol)	-244418,1595	-244416,3542	R1 : -244014,9725 R2 : -244010,6465	R1 : -244012,92 R2 : -244008,5877
H (Kcal/mol)	-244277,7482	-244275,7603	R1 : -243883,7453 R2 : -243878,8615	R1 : -243881,4876 R2 : -243876,6828
α (Kcal/mol)	150,693333	114,923	R1 : 162,707 R2 : 162,902	R1 : 122,133667 R2 : 121,799333
μ (Debey)	0,068703	0,061082	R1 : 0,436522 R2 : 0,978902	R1 : 0,283921 R2 : 0,705254
S (cal/mol-K)	102,68	101,892	R1 : 101,461 R2 : 98,199	R1 : 99,561 R2 : 98,407

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

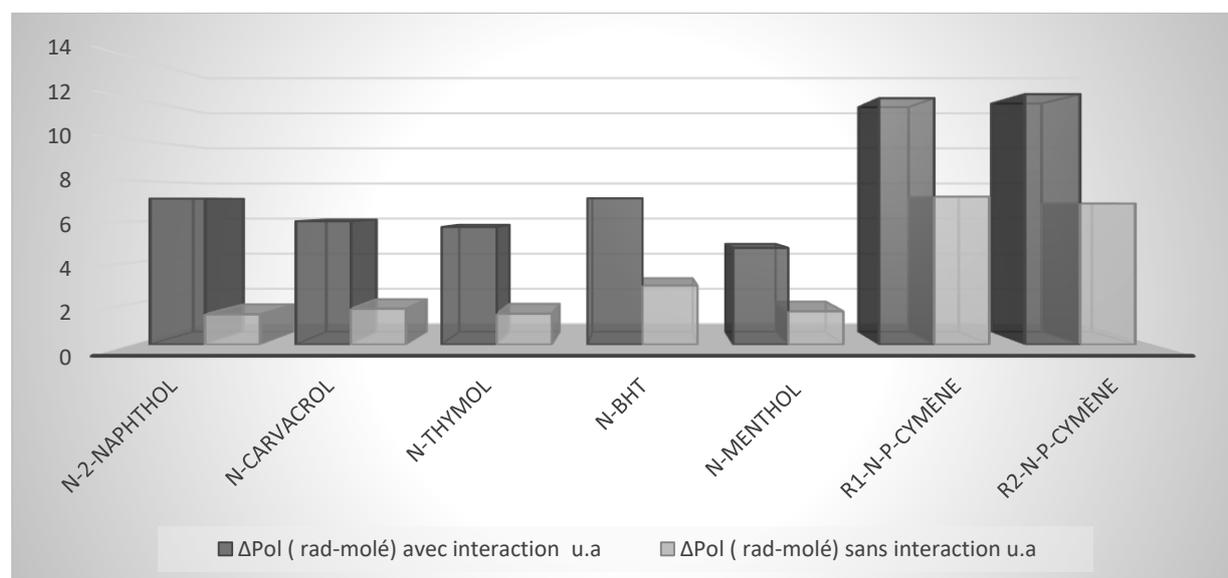
IV.3.1-Influences des interactions avec le solvant sur la polarisabilité

La lecture du tableau 7 montre une influence importante des interactions avec le solvant sur la polarisabilité de l'état fondamental et radicalaire. Comme le montrent le tableau 8 et l'histogramme 1 ci-dessous :

Tableau 8: Influence du solvant sur l'écart de polarisabilité entre la forme neutre et radicalaire selon les deux approches de notre étude

composé	ΔPol (rad-molé) avec interaction u.a	ΔPol (rad-molé) sans interaction u.a
2-naphthol	7,116333	1,476
Carvacrol	6,011334	1,750334
thymol	5,734	1,505666
BHT	7,134334	2,876
menthol	4,710666	1,621
R1 -p-cymène	12,013667	7,210667
R2 -p-cymène	12,208667	6,876333

Histogramme 1 Indique clairement l'augmentation de la polarisabilité avec les interactions avec le solvant.



Histogramme 1: Comparaison de l'écart de polarisabilité entre la forme neutre et radicalaire selon les deux approches de notre étude.

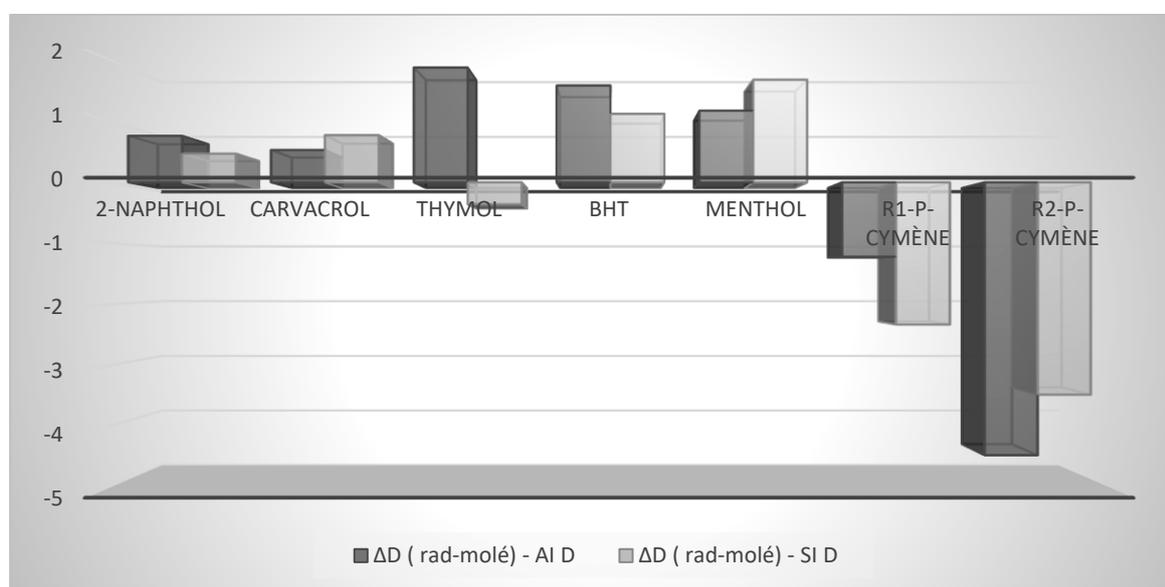
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.3.2-Influence des interactions avec le solvant sur l'entropie

Dans le cas de l'entropie S, l'influence des interactions avec le solvant sur le désordre semblent être mitigées entre une augmentation pour quelques-uns et une diminution pour les autres. Comme le montrent le tableau 9 et l'histogramme 2.

Tableau 9: Influence du solvant sur l'écart de l'entropie entre la forme neutre et radicalaire selon les deux approches de notre étude

composé	ΔS (rad-molé) - AI	ΔS (rad-molé) - SI
2-naphthol	0,763	0,47
Carvacrol	0,53	0,773
thymol	1,883	-0,36
BHT	1,587	1,123
menthol	1,175	1,682
R1-p-cymène	-1,219	-2,331
R2-p-cymène	-4,481	-3,485

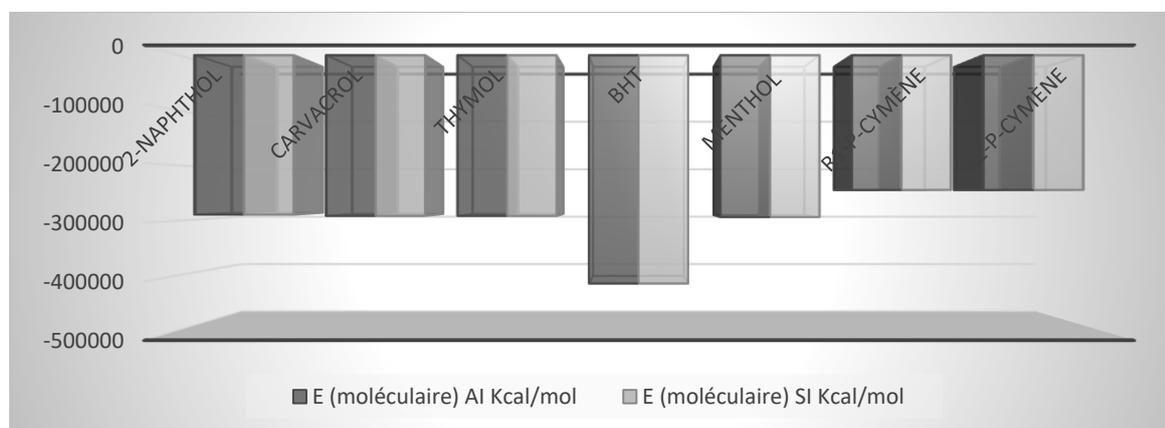


Histogramme 2: Comparaison de l'écart de l'entropie entre la forme neutre et radicalaire selon les deux approches de notre étude.

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.3.3-Influence des interactions avec le solvant sur l'énergie moléculaire à l'état fondamental

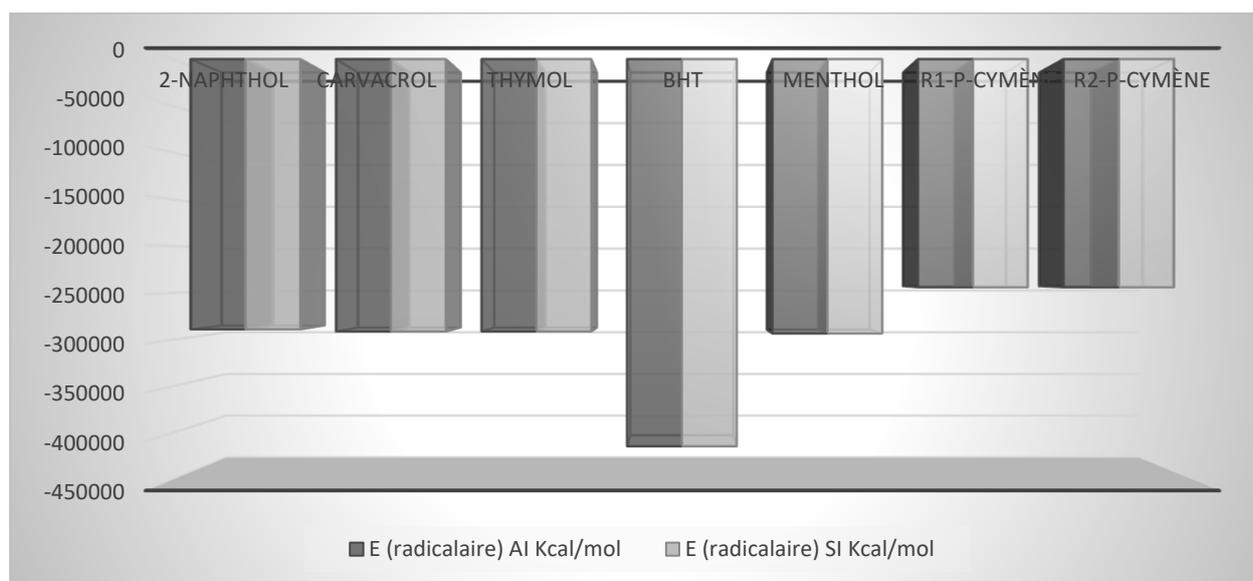
D'après les résultats du tableau 7 il n'y a pas une influence sensible des interactions avec le solvant sur l'énergie de l'état moléculaire fondamental comme le montre l'histogramme 3.



Histogramme 3: Comparaison des énergies moléculaire de l'état neutre selon les deux approches de notre étude.

IV.3.4-Influence des interactions avec le solvant sur l'énergie moléculaire à l'état radicalaire

De même que précédemment l'énergie de l'état moléculaire radicalaire n'est pas affectée par les interactions avec le solvant. Voir l'histogramme 4 ci-dessous :



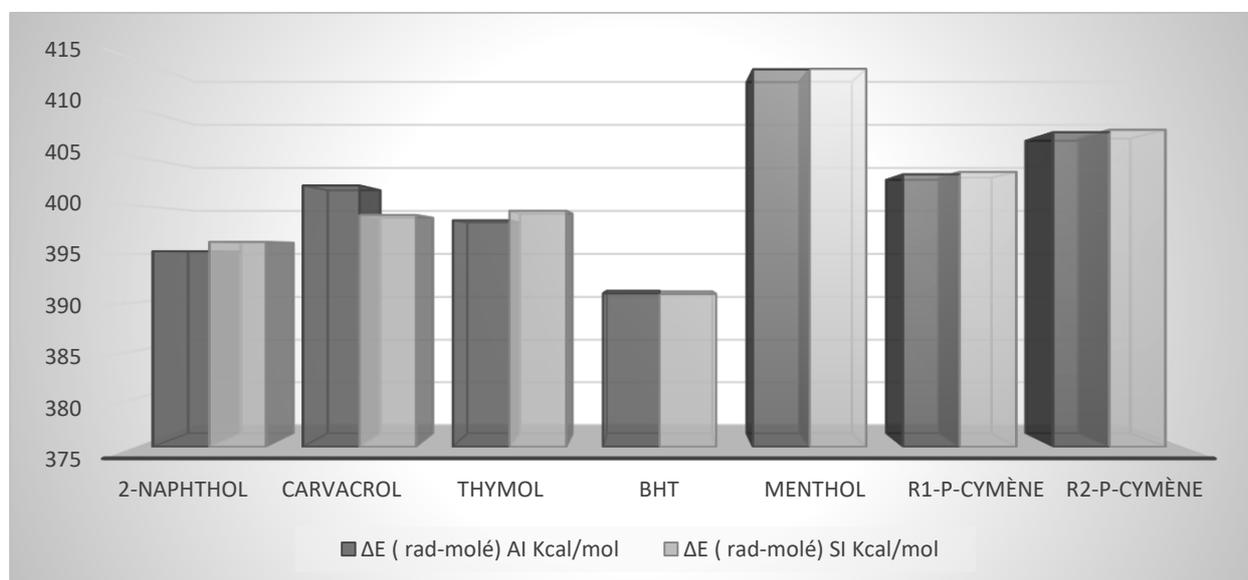
Histogramme 4: Comparaison des énergies moléculaire de l'état radicalaire selon les deux approches de notre étude

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 10 et histogramme 5 donnent l'influence des interactions avec le solvant sur la différence d'énergie entre l'état moléculaire fondamental et radicalaire.

Tableau 10: Influence du solvant sur l'écart d'énergie entre la forme neutre et radicalaire selon les deux approches de notre étude

composé	ΔE (rad-molé) AI Kcal/mol	ΔE (rad-molé) SI Kcal/mol
2-naphthol	395,2691597	396,2449269
carvacrol	402,0392896	399,0059401
thymol	398,4575025	399,4370347
BHT	390,931859	390,8735012
menthol	413,9900842	414,0333819
R1-p-cymène	403,1869926	403,4342288
R2-p-cymène	407,5129983	407,7665095



Histogramme 5: Comparaison de l'écart d'énergie entre la forme neutre et radicalaire selon les deux approches de notre étude

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

La lecture de l'histogramme ci-dessus montre clairement la faible influence des interactions avec le solvant sur la barrière énergétique entre la forme moléculaire à l'état fondamental et radicalaire.

IV.4-Calcul de l'énergie de dissociation de la bonde O-H

Selon la relation $BDE = H(ArO\cdot) + H(H\cdot) - H(ArOH)$ nous avons calculé la BDE pour les deux approches

IV.4.1-Calcul de la BDE cas de la première approche

Le tableau ci-dessous résume les résultats trouvés.

Tableau 11: Valeurs de la BDE (AI) en considérant les interactions molécule - solvant

composé	H(RO \cdot) AI Kcal/mol	H(R-OH)b AI Kcal/mol	H(H.) Kcal/mol	BDE AI (Kcal/mol)
2-naphthol	-288864,8082	-289252,0547	-313,7515	73,49503387
Carvacrol	-291087,4634	-291477,8173	-313,7515	76,60242872
thymol	-291086,5096	-291476,9444	-313,7515	76,68337661
BHT	-414333,1357	-414716,9636	-313,7515	70,07639752
menthol	-293284,9048	-293690,5642	-313,7515	91,9078544
R1-p-cymène	-243883,7453	-244277,7482	-313,7515	80,25135867
R2-p-cymène	-243878,8615	-244277,7482	-313,7515	85,13521452

Pour vérifier la corrélation entre l'énergie de dissociation de la bonde O-H et l'activité antioxydante nous avons établi la courbe de variation de la BDE et du IC₅₀ en fonction des molécules étudiées, voir la Figure 10.

Tableau 12 regroupe les valeurs de la BDE et des IC₅₀ des composés phénoliques.

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 12: Valeurs de la BDE (AI) en considérant les interactions molécule – solvant et les IC₅₀ correspondants

composé	BDE AI (Kcal/mol)	IC ₅₀ mg/ml	100* IC ₅₀ mg/ml
thymol	76,6833766	0.52838	52.838
Carvacrol	76,6024287	0.41436	41.436
2-naphthol	73,4950339	0.11723	11.723
BHT	70,0763975	0.00829	0.829

Nous multiplions les valeurs des IC₅₀ par 100 à fin d'homogénéiser l'ordre de grandeur des deux variables.

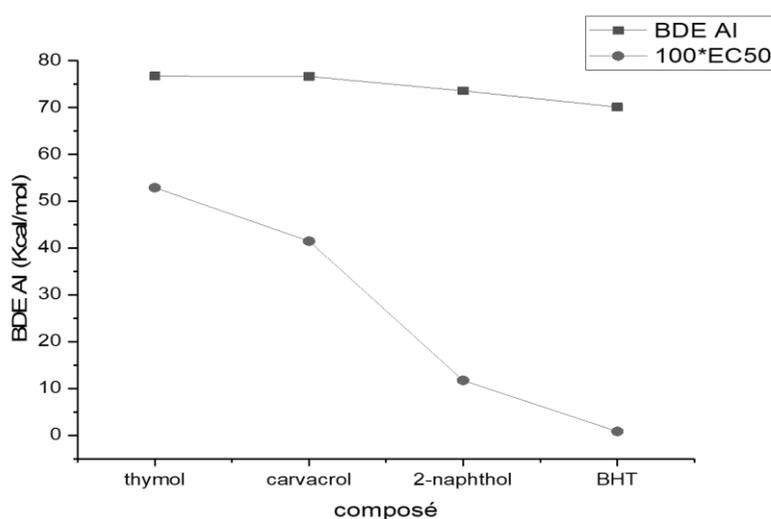


Figure 10: variation de la BDE (AI) et du IC₅₀ selon la molécule étudiée.

La lecture de cette courbe montre sans équivoque que la BDE et l'IC₅₀ sont en parfait accord. Aussi, si en tient compte du menthol et du p-cymène cette corrélation reste toujours exacte puisque la BDE des deux radicaux possibles du p-cymène (R1 : 80,25135867 Kcal/mol et R2 : 85,13521452 Kcal/mol) et celle du thymol (91,9078544 Kcal/mol) sont plus élevées que celle des molécules phénoliques.

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.4.2-Calcul de la BDE cas de la deuxième approche :

Dans ce cas les interactions avec le solvant ont été négligées. Le tableau ci-dessous résume les résultats trouvés pour le calcul de la BDE.

Tableau 13: Valeurs de la BDE (SI) en négligeant les interactions molécule - solvant

composé	H (RO·) SI Kcal/mol	H (R-OH) SI Kcal/mol	H(H·) Kcal/mol	BDE SI (Kcal/mol)
2-naphthol	-288858,6298	-289246,7875	-313,7515	74,40616822
carvacrol	-291081,9395	-291472,8964	-313,7515	77,20545911
thymol	-291081,1777	-291472,5507	-313,7515	77,6214936
BHT	-414329,6274	-414713,3705	-313,7515	69,99168462
menthol	-293281,6198	-293687,293	-313,7515	91,92165946
R1-p-cymène	-243881,4876	-244275,7603	-313,7515	80,52118496
R2-p-cymène	-243876,6828	-244275,7603	-313,7515	85,32597543

De même que précédemment le tableau 14 résume les valeurs de la BDE et des IC₅₀ des composés phénoliques dans le cas de la deuxième approche.

Tableau 14: Valeurs de la BDE (SI) en négligeant les interactions molécule – solvant et les IC₅₀ correspondants

composé	BDE SI (Kcal/mol)	IC ₅₀ mg/ml	100*IC ₅₀ mg/ml
2-naphthol	74,40616822	0.11723	11.723
carvacrol	77,20545911	0.41436	41.436
thymol	77,6214936	0.52838	52,838
BHT	69,99168462	0.00829	0. 829

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

La courbe représentant la variation de la BDE en fonction du IC_{50} est donnée par la figure 11 ci-après :

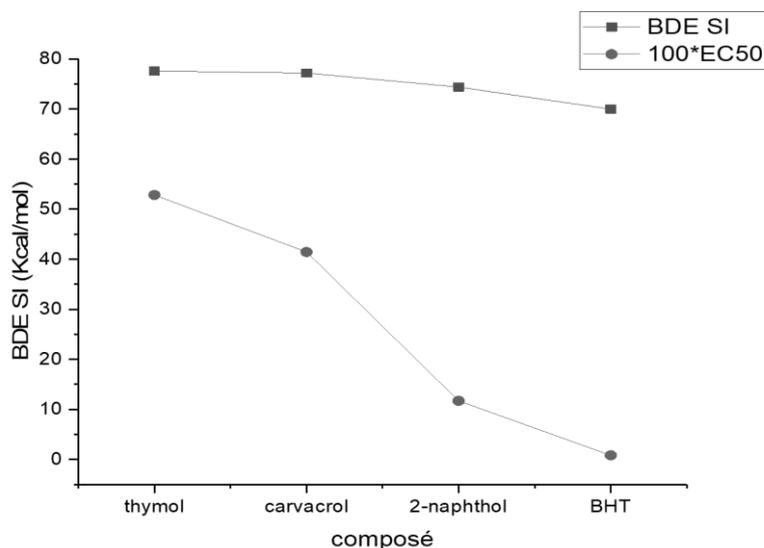


Figure 11: variation de la BDE (SI) et du IC_{50} selon la molécule étudiée.

Comme pour la première approche la variation de la BDE suit celle du IC_{50} , quand l'activité antiradicalaire augmente la BDE décroît.

IV.4.3-Influence des interactions avec le solvant sur la BDE

En comparant les BDE des deux approches on obtient la courbe de la figure ci-dessous :

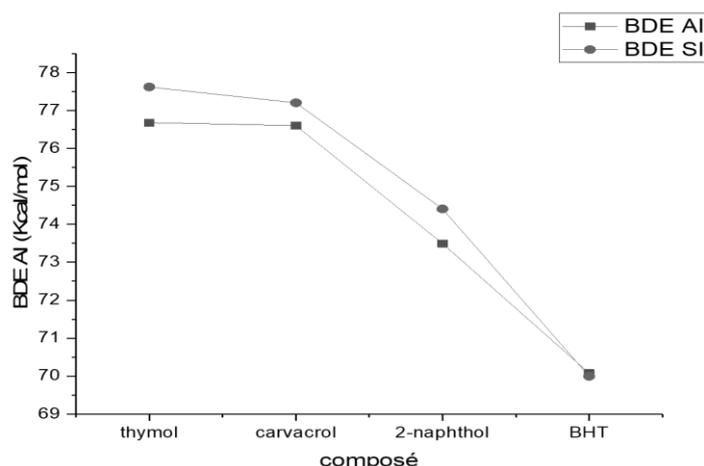
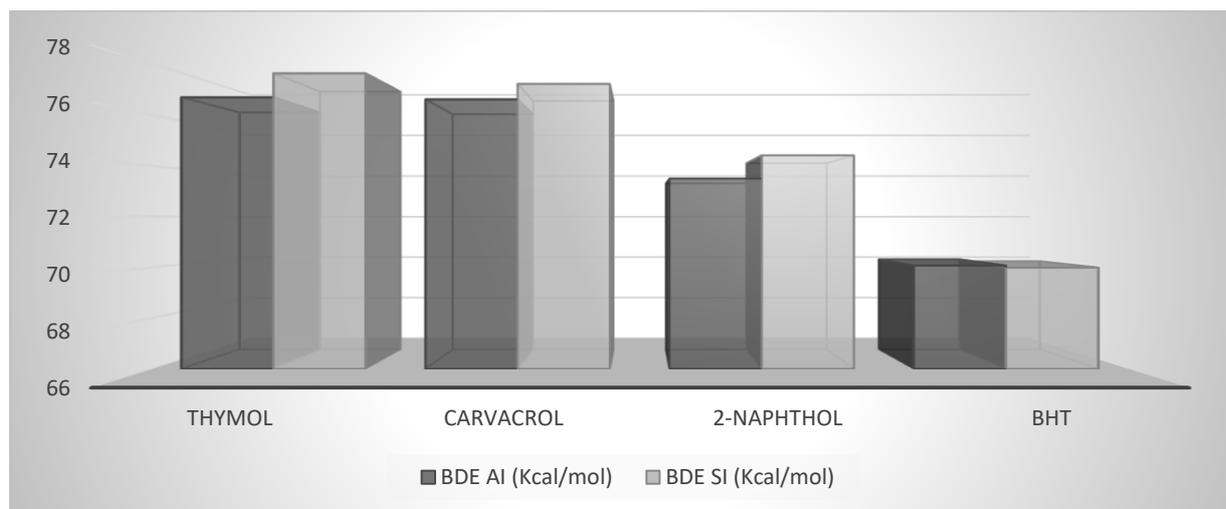


Figure 12: comparaison des BDE calculées en considérant et en négligeant les interactions des molécules avec le solvant à savoir l'éthanol

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Cette courbe indique que les interactions avec le solvant n'affectent pas la proportionnalité entre la BDE et l'activité. Toutefois, la barrière énergétique représentée par la BDE devient plus faible avec le solvant polaire et protique (éthanol).

Aussi, selon l'histogramme 6 ci-dessous l'écart entre les BDE des deux approches dans le cas du BHT est presque négligeable, ceci est probablement dû aux deux groupements tertio-butyles adjacents à la fonction 1-hydroxy, et qui diminuent la surface de solvation du BHT.

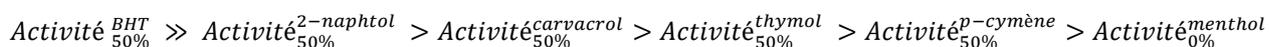


Histogramme 6 : Comparaison des BDE obtenues par les deux approches de notre étude

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de mémoire se veut être un pont entre l'expérimentation et la théorie en chimie, en adoptant une nouvelle approche du travail expérimentale au laboratoire. Ceci ne pouvait se réaliser qu'ont jumelons entre la pratique et la théorie.

Notre travail expérimental visé essentiellement, dans une première étape, à déterminer le pouvoir antioxydant de substances phénoliques naturelles et synthétiques, tel que le carvacrol, le thymol, le 2-naphtol et le BHT. Sur la base de la stabilité du radical aryloxy ($\text{ArO}\cdot$) formé, nous avons classé, par ordre décroissant, le pouvoir antioxydant des différentes molécules étudiées comme suit :



Il paraît clairement que les composés phénoliques (BHT, 2-naphtol, carvacrol et thymol) présentent un pouvoir de piégeage des radicaux libres largement supérieurs à celui des composés non phénoliques (p-cymène et menthol).

Toutefois, nous confirmons, ce qui est déjà décrit dans la littérature, que les composés phénoliques synthétiques comme le BHT présentent le meilleur pouvoir antioxydant.

Dans une deuxième étape, nous avons réalisé une étude théorique sur la réaction de piégeage du radical libre DPPH \cdot , par les composés étudiés. Le mécanisme de cette réaction est gouverné par l'énergie de dissociation homolytique de la bonde O-H 'BDE' du groupement phénolique. Cette étude a été réalisée selon deux approches. Selon la première approche, nous avons négligé les interactions des molécules étudiées avec le solvant utilisé dans le test DPPH. Alors que, dans la deuxième approche l'effet du solvant a été pris en compte.

On a pu constater l'influence des interactions avec le solvant sur la polarisabilité de l'état fondamental et radicalaire et sur le moment dipolaire.

Cependant, le désordre au niveau moléculaire semble être plus ou moins stable. De même pour les énergies de l'état moléculaire fondamental et radicalaire.

Aussi, on a mis en évidence la concordance entre la BDE et l'IC₅₀. Et que les interactions avec le solvant n'affectent pas la proportionnalité entre la BDE et l'activité.

Toutefois, la barrière énergétique représentée par la BDE devient plus faible avec un solvant polaire et protique (éthanol).

L'écart entre les BDE des deux approches dans le cas du BHT est presque négligeable, ceci est probablement dû aux deux groupements tertiobutyles adjacents à la fonction 1-hydroxy, et qui diminuent la surface de solvation du BHT.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] "Memoire Online - Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales - Ouafa MEDJOUJDA." [Online]. Available: <https://www.memoireonline.com/03/15/8988/Methodes-d-etudes-d-activite-des-antioxydants-des-plantes-medicinales.html>. [Accessed: 15-Dec-2019].
- [2] M. Laguerre, L. Javier López-Giraldo, J. Lecomte, M. Pina, and P. Villeneuve, " Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante ," *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, vol. 14, no. 5, pp. 278–292, Sep. 2007.
- [3] J. E. Packer, J. S. Mahood, V. O. Mora-Arellano, T. F. Slater, R. L. Willson, and B. S. Wolfenden, "Free radicals and singlet oxygen scavengers: Reaction of a peroxy-radical with β -carotene, diphenyl furan and 1,4-diazobicyclo(2,2,2)-octane," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 98, no. 4, pp. 901–906, Feb. 1981.
- [4] "Contribution-a-letude-phytochimique-et-activite-antioxydante-des-extraits-de-Myrtus-communis-L.(Rayhane)de-la-region-de-Tlemcen(Honaine).pdf." [Online]. Available: <https://studylibfr.com/doc/8071457/contribution-a-letude-phytochimique-et-activite-antioxyda...#>. [Accessed: 15-Dec-2019].
- [5] H. Sies, "Oxidative stress: From basic research to clinical application," *Am. J. Med.*, vol. 91, no. 3 SUPPL. 3, pp. S31–S38, Sep. 1991.
- [6] "3. Diabète et stress oxydant." [Online]. Available: <https://www.institut-numerique.org/3-diabete-et-stress-oxydant-526fce18a61ac>. [Accessed: 16-Dec-2019].
- [7] A. Marfak, "Leur Reactivite Avec Les Radicaux Issus Des Alcools : Formation De Depsides .," pp. 10-11., 2003.
- [8] B. A. Lindau-Shepard and J. B. Shaffer, "Expression of human catalase in acatalasemic murine SV-B2 cells confers protection from oxidative damage," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 15, no. 6, pp. 581–588, Dec. 1993.
- [9] "Étude de la Génotoxicité - ppt télécharger." [Online]. Available: <https://slideplayer.fr/slide/469774/>. [Accessed: 16-Dec-2019].
- [10] X. Wang and P. J. Quinn, "The structure and phase behaviour of α -tocopherol-rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine," *Biochimie*, vol. 88, no. 12, pp. 1883–1888, Dec. 2006.
- [11] E. Niki and K. Abe, "CHAPTER 1. Vitamin E: Structure, Properties and Functions," in *Food Chemistry, Function and Analysis*, vol. 2019-January, no. 11, Royal Society of Chemistry, 2019, pp. 1–11.
- [12] O. Fain, "Vitamin C deficiency," *La Revue de médecine interne / fondée ... par la Société nationale française de médecine interne*, vol. 25, no. 12. pp. 872–880, Dec-2004.
- [13] "vitamine C - Dictionnaire des Sciences Animales." [Online]. Available: <http://dico-sciences-animales.cirad.fr/liste-mots.php?fiche=29124&def=acide+ascorbique>. [Accessed: 23-Oct-2020].

- [14] U. Kidmose, L. P. Christensen, S. M. Agili, and S. H. Thilsted, "Effect of home preparation practices on the content of provitamin A carotenoids in coloured sweet potato varieties (*Ipomoea batatas* Lam.) from Kenya," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 8, no. 3, pp. 399–406, Sep. 2007.
- [15] A. J. Meléndez-Martínez, P. Mapelli-Brahm, D. Hornero-Méndez, and I. M. Vicario, "CHAPTER 1: Structures, Nomenclature and General Chemistry of Carotenoids and Their Esters," in *Food Chemistry, Function and Analysis*, vol. 2019-January, no. 13, Royal Society of Chemistry, 2019, pp. 3–50.
- [16] "Mesure de la capacité antioxydante - CEDEVIT." [Online]. Available: <http://labos.ulg.ac.be/cedevit/polyphenols-antioxydants/catalogue/mesure-de-capacite-antioxydante/>. [Accessed: 11-Feb-2020].
- [17] F. Haddouchi, T. M. Chaouche, and N. Halla, "Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie," *Phytotherapie*, pp. 1–9, Dec. 2016.
- [18] "antioxydante des extraits d'écorce et de pulpe de Citrus limon et Citrus." [Online]. Available: [http://www.univ-bejaia.dz/dspace/bitstream/handle/123456789/5403/Activité antioxydante des extraits d'écorce et de pulpe de Citrus limon et Citrus sinensis.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.univ-bejaia.dz/dspace/bitstream/handle/123456789/5403/Activité%20antioxydante%20des%20extraits%20d%27écorce%20et%20de%20pulpe%20de%20Citrus%20limon%20et%20Citrus%20sinensis.pdf?sequence=1&isAllowed=y). [Accessed: 30-Nov-2019].
- [19] N. Bougandoura and N. Bendimerad, "Issue_09_Art_B_03," pp. 14–19, 2013.
- [20] "Scheme 3. Reaction scheme involved in FRAP assay. | Download Scientific Diagram." [Online]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Scheme-3-Reaction-scheme-involved-in-FRAP-assay_fig2_339120803. [Accessed: 23-Oct-2020].
- [21] N. Bentabet, Z. Boucherit-Otmani, and K. Boucherit, "Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie," *Phytotherapie*, vol. 12, no. 6, pp. 364–371, Dec. 2014.
- [22] O. Deeb, "Recent Applications of Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design," in *Medicinal Chemistry and Drug Design*, InTech, 2012.
- [23] B. Hicham, K. Ayoub, and L. Jury, "E. M. Hulzebos et al., "The application of structure-activity relationships in human hazard assessment:am Khebiza Ayoub Président : Membres : Encadreur :," 2018.
- [24] "QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches - Google Livres." .
- [25] J. Jaworska Procter, S. -Bever, N. Nikolova, and J. Jaworska, "REVIEW OF METHODS FOR ASSESSING THE APPLICABILTY DOMAINS OF SARS AND QSARS PAPER 4: SAR Applicability Domain SAR applicability domain."
- [26] S. P. Bradbury, C. L. Russom, G. T. Ankley, T. W. Schultz, and J. D. Walker, "OVERVIEW OF DATA AND CONCEPTUAL APPROACHES FOR DERIVATION OF QUANTITATIVE STRUCTURE–ACTIVITY RELATIONSHIPS FOR ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS OF ORGANIC CHEMICALS," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 22, no. 8, p. 1789, Aug. 2003.

- [27] A. C. Brown and T. R. Fraser, "V.—On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action. Part. I.—On the Physiological Action of the Salts of the Ammonium Bases, derived from Strychnia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia, and Nicotia," *Trans. R. Soc. Edinburgh*, vol. 25, no. 1, pp. 151–203, 1867.
- [28] S. M. Free and J. W. Wilson, "A Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies," *J. Med. Chem.*, vol. 7, no. 4, pp. 395–399, Jul. 1964.
- [29] P. G. De Benedetti and F. Fanelli, "Multiscale quantum chemical approaches to QSAR modeling and drug design," *Drug Discovery Today*, vol. 19, no. 12. Elsevier Ltd, pp. 1921–1927, 17-Nov-2014.
- [30] Danishuddin and A. U. Khan, "Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design," *Drug Discovery Today*, vol. 21, no. 8. Elsevier Ltd, pp. 1291–1302, 01-Aug-2016.
- [31] T. Puzyn, N. Suzuki, M. Haranczyk, and J. Rak, "Calculation of quantum-mechanical descriptors for QSPR at the DFT level: Is it necessary?," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 48, no. 6, pp. 1174–1180, Jun. 2008.
- [32] "Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications - Google Livres."
- [33] "QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches - Google Livres." [Online]. Available: <https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=3uUxtRfYXgC&oi=fnd&pg=PP2&dq=+++Mannhold+R,+Krogsgaard-Larsen+P,+Timmerman+H.+QSAR:+Hansch+analysis+and+related+approaches:+John+Wiley+%26+Sons%3B+2008.+&ots=VWSNjGpIFy&sig=2FOzqjBr2Qx0poxTcguGhpST9PQ#v=onepage&q&f=false>. [Accessed: 23-Mar-2020].
- [34] Z. Zhou and R. G. Parr, "Activation Hardness: New Index for Describing the Orientation of Electrophilic Aromatic Substitution," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 112, no. 15, pp. 5720–5724, Jul. 1990.
- [35] J. Huuskonen, D. J. Livingstone, and D. T. Manallack, "Prediction of drug solubility from molecular structure using a drug-like training set," *SAR QSAR Environ. Res.*, vol. 19, no. 3–4, pp. 191–212, Apr. 2008.
- [36] J. A. Arnott, R. Kumar, and S. L. Planey, "Lipophilicity Indices for Drug Development," 2013.
- [37] J.-L. Calais, "Density-functional theory of atoms and molecules. R.G. Parr and W. Yang, Oxford University Press, New York, Oxford, 1989. IX + 333 pp. Price £45.00," *Int. J. Quantum Chem.*, vol. 47, no. 1, pp. 101–101, Jul. 1993.
- [38] P. Hohenberg and W. Kohn, "Inhomogeneous electron gas," *Phys. Rev.*, vol. 136, no. 3B, pp. B864–B871, Nov. 1964.
- [39] K. B. Lipkowitz and D. B. Boyd, *Reviews in Computational Chemistry*, vol. 7. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- [40] T. Ziegler, "Approximate Density Functional Theory as a Practical Tool in Molecular Energetics and Dynamics," *Chem. Rev.*, vol. 91, no. 5, pp. 651–667, Jul. 1991.

- [41] E. J. Baerends and O. V. Gritsenko, "Quantum chemical view of density functional theory," *J. Phys. Chem. A*, vol. 101, no. 30, pp. 5383–5403, Jan. 1997.
- [42] "Structures chimiques carbonées - La spectroscopie UV-visible." [Online]. Available: http://ressources.unisciel.fr/DAEU/chimie/structure-carbone/co/spectro_UV_visible.html. [Accessed: 08-Oct-2020].
- [43] I. F. Lawin, A. B. Fandohan, K. Gandji, A. E. Assogbadjo, and C. A. I. N. Ouinsavi, "*Cola millenii* K. Schum : Etat des connaissances et perspectives de recherche," *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, vol. 12, no. 3, p. 1494, Nov. 2018.
- [44] A. Merouane, A. Noui, H. Medjahed, K. Nedjari Benhadj Ali, and A. Saadi, "Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle," *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, vol. 8, no. 4, p. 1865, Jan. 2015.
- [45] "Présenté par Mr EL-HADJ SAID Anes ÉTUDE CHIMIE PHYSIQUE DE L'ACTIVITÉ ANTI-OXYDANTE D'UNE SERIE DE COUMARINES."
- [46] U. M. Khider -Biskra, S. Belaidi, P. Président, M. R. Ouahrani, M. Omari, and D. Barkat, "Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques."