



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية عاوم الطبيعة و الحياة

Département : Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

قسم : الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Intitulé :

Synthèse, Analyse Structurale et Criblage Biologique de Nouveaux Complexes Organométalliques

Présenté et soutenu par : *BOUKERZAZA Ghada*

Le : 26/06/2019

BOUABELLOU Menal

Jury d'évaluation :

Président du jury : *NECIB Youcef* (Pr - UFM Constantine 1).

Rapporteur : *MOUAS Toma Nardjes* (MCA - UFM Constantine 1).

Co-encadreur : *DJEDOUANI Amelle* (Pr - ENS Constantine 3).

Examineurs : *LEMOUI Redouane* (MCB - ENS Constantine 3).

*Année universitaire
2018 - 2019*

Remerciements

Nous remercions en premier lieu Allah, de nous avoir donné la force, la santé, la patience et la volonté.

Nous tenons particulièrement à remercier notre encadrant Mme MOUAS T. Nardjes, MCA à L'Université Frères Mentouri (UFM) Constantine 1, pour sa gentillesse, son aide, sa disponibilité et sa patience. Nous lui sommes profondément reconnaissantes pour le soutien qu'elle nous a apporté au cours de ces mois, pour son dévouement exemplaire et pour ses compétences qu'elle a su nous inculquer.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à Mme DJEDOUANI Amel, Professeur à L'Ecole Normale Supérieure (ENS) Constantine, pour son suivi, son énorme soutien et la confiance qu'elle nous a accordée pour mener à bien ce travail.

Aussi, nous tenons à remercier Monsieur BENSOUICI Chawki, MCB au Centre De Recherche En Biotechnologie (CRBt) Constantine, pour son encadrement de grande qualité, sa disponibilité et ses grandes qualités humaines.

Nos remerciements vont également au Président et membres du jury pour avoir bien voulu examiner et juger cet humble travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude très spéciale aux membres de nos familles respectives.

Enfin, nous voudrions associer à nos remerciements toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail de mémoire.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES SCHEMAS

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE 1

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : Généralités et données bibliographiques

I. Généralités sur l'acide déhydroacétique.....	3
I.1. L'acide déhydroacétique.....	3
I.2. Synthèse, structure et réactivité de l'acide déhydroacétique.....	3
I.2.1. Synthèse.....	3
I.2.2. Structure.....	4
I.2.3. Réactivité	5
II. Les métaux de transition.....	5
II.1. Généralités sur le nickel (Ni).....	6
II.2. Généralités sur le cobalt (Co).....	6
II.3. Généralités sur le zinc (Zn).....	6
II.4. Généralités sur le manganèse (Mn).....	7
III. Les complexes métalliques.....	7
III.1. Définition d'un complexe	7
III.2. Classification des complexes métalliques	7

IV. Ligand (coordinat)	8
V. Acide déhydroacétique et pouvoir complexant	9
VI. Revue bibliographique sur les applications biologiques de l'acide déhydroacétique et ses dérivés	11
VII. Revue bibliographique sur les applications biologiques des complexes de métaux de transition.....	14

Chapitre II : Rappels théoriques sur les différentes applications testées

I. Introduction.....	17
II. Le stress oxydatif	17
III. Les espèces réactives de l'oxygène	18
IV. Les cibles biologiques des EOA	19
IV.1. Peroxydation lipidique	19
IV.2. Oxydation des protéines	20
IV.3. Oxydation de L'ADN	21
V. Les antioxydants	22
VI. Activités antioxydantes	23
VI.1. Activité de piégeage du radical ABTS	23
VI.2. Activité de blanchiment du β -carotène.....	24
VI.3. Activité de chélation de fer par UV-Visible	24
VI.4. Activité de la chélation des ions de fer	25
VI.5. Activité de chélation de cuivre	25
VII. Evaluation de l'activité enzymatique anti-uréase	26
VII.1. Introduction.....	26
VII.2. Définition de l'uréase.....	26

Chapitre III : Rappels théoriques sur les techniques spectroscopiques d'analyses structurales utilisées: UV et IR

I. La spectroscopie	29
I.1. La spectroscopie d'absorption Ultra Violette Visible UV-Visible.....	29
I.1.a. Le principe	29
I.1.b. Le but	30
I.2. La spectroscopie Infrarouge IR	31
I.2.a. Le principe	31
I.2.b. Le but	31

PARTIE PRATIQUE

Chapitre I : Matériel et méthodes

I. Matériel et consommable utilisé	33
I.1. Matériel	33
II. Synthèse chimique des complexes	34
II.1. Mode opératoire	35
II.2. Synthèse générale des complexes	35
II.2.a. Synthèse du complexe de nickel.....	35
II.2.b. Synthèse du complexe de cobalt.....	35
II.2.c. Synthèse du complexe de zinc.....	35
II.2.d. Synthèse du complexe de manganèse.....	36
III. Méthodes physico-chimiques et d'analyses spectroscopiques	36
III.1. Point de fusion	36
III.2. La spectroscopie « IR »	37
III.3. La spectroscopie Ultraviolet-visible « UV-Vis ».....	37

IV. Valorisation biologique	37
IV.1. Protocole de l'activité de piégeage du radical ABTS.....	37
IV.2. Protocole de l'activité de blanchiment du β -carotène.....	38
IV.3. Protocole de l'activité de chélation du fer par UV-Vis.....	38
IV.4. Protocole de l'activité de chélation des ions de fer	38
IV.5. Protocole de l'activité de chélation du cuivre.....	39
IV.6. Protocole de l'activité anti-uréase.....	39

Chapitre II : Résultats et discussion

I. Résultats de la synthèse chimique et analyses spectrales.....	40
I.1. Propriétés physico-chimiques des complexes synthétisés.....	40
I.2. Analyse spectrale des complexes synthétisés.....	40
I.2.1. Analyse infra rouge « IR ».....	40
I.2.2. Analyse par UV-Vis.....	45
II. Résultats et discussion des activités biologiques <i>in vitro</i>	46
II.1. Activités antioxydantes.....	46
II.1.1. Activité de piégeage du radical ABTS	46
II.1.2. Activité de blanchiment du β -carotène	48
II.1.3. Activité de chélation des ions de fer par UV-Vis.....	51
II.1.4. Activité de Chélation du fer	52
II.1.5. Activité de chélation du cuivre.....	54
II.2. Activité enzymatique	56
II.2.1. Activité inhibitrice de l'uréase.....	56

III. Relation structure-activité RSA.....	58
III.1. Activités antioxydantes.....	58
III.2. Activité enzymatique.....	61
Conclusion générale.....	66
Références bibliographiques.....	68
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les différentes voies de synthèse du DHA (Gilchrist, 1985).....	4
Figure 2: Structure de l'acide déhydroacétique (DHA) (Rassweiler et Adams, 1924).....	4
Figure 3: Les différents centres réactifs de l'acide déhydroacétique (Stephen.J.F et al, 1969).....	5
Figure 4: La classification des complexes métalliques (Fenanir. F, 2011).....	8
Figure 5: Complexe du DHA avec le cadmium (Monica Zucolotto Chalça et al, 2002)....	9
Figure 6: Structure 3D du complexe [Cu(DHA) ₂ .2DMSO] (Djedouani.A et al., 2010).....	10
Figure 7: Structure du complexe [Cd(DHA) ₂ .2DMSO] (Djedouani.A et al., 2010).....	10
Figure 8: Structure 3D du complexe [Zn(DHA) ₂ .2DMSO] (Djedouani.A et al., 2010).....	10
Figure 9: Structure du complexe [Ni(DHA) ₂ .2DMSO] (Djedouani.A et al., 2009).....	11
Figure 10: Les trois composés bases de Schiff synthétisées par Ullah et al. (2012)	12
Figure 11: Structure des complexes de Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) synthétisés en utilisant le DHA (Nisha. B et Jai. D, 2015).....	13
Figure 12: Synthèse de complexes de métaux de transition (Co, Ni, Cu et Zn) à partir de trois ligands différents (Malik, M-A et al, 2018).....	15
Figure 13: Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces (Pincemail, 1999).....	19
Figure 14: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Lagarde et al, 2003).....	20
Figure 15: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).....	21

Figure 16: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).....	21
Figure 17: Composés naturels ou synthétisés possédant un pouvoir antioxydant.....	23
Figure 18: Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS+• (Gülçin, 2012).....	24
Figure 19: Structure de la ferrozine (Lawrence L.S, 1970).....	25
Figure 20: Principe de la spectroscopie UV-Vis.....	30
Figure 21: Dispositif de l'appareillage infrarouge (Dar Kebira. F, 2013).....	32
Figure 22: Spectre IR du complexe DHA-Ni.....	41
Figure 23: Spectre IR du complexe DHA-Co.....	42
Figure 24: Spectre IR du complexe DHA-Zn.....	43
Figure 25: Spectre IR du complexe DHA-Mn.....	44
Figure 26: Spectres d'absorption UV-Vis du DHA et ses complexes de Co, Ni et Zn.....	45
Figure 27: Spectre d'absorption UV-Vis du complexe DHA-Mn.....	45
Figure 28 : Courbes des pourcentages d'inhibition de l'activité de piégeage du radical ABTS.....	48
Figure 29 : Valeurs des CI ₅₀ exprimées en µg /mL pour l'activité de piégeage du radical ABTS.....	48
Figure 30: Courbes des pourcentages d'inhibition de l'activité de blanchiment du β-carotène.....	50
Figure 31: Valeurs des CI ₅₀ exprimées en µg /mL pour l'activité de blanchiment du β-carotène.....	50
Figure 32: Résultats de l'activité chélatrice du fer par UV-Vis.....	51
Figure 33: Courbes des pourcentages d'inhibition de l'activité de chélation du fer.....	53
Figure 34: Valeurs des CI ₅₀ exprimées en µg/mL pour l'activité de chélation du fer.....	53
Figure 35: Courbes des pourcentages d'inhibition de l'activité de chélation du cuivre....	55

Figure 36: Valeurs des CI_{50} exprimées en $\mu\text{g} /\text{mL}$ pour l'activité de chélation du cuivre.....	55
Figure 37: Courbes des pourcentages d'inhibition de l'activité inhibitrice de l'uréase.....	57
Figure 38: Valeurs des CI_{50} exprimées en $\mu\text{g} /\text{mL}$ pour l'activité inhibitrice de l'uréase.....	58
Figure 39: Site actif de l'uréase selon le modèle de Zerner et al., (Blakeley. RL et al., 1969 ; Dixon. N-E, et al., 1975)	62
Figure 40: Modèle de Stemmler de conversion structurelle pour l'inhibition biphasique de l'uréase par l'acide hydroxamique (Amutul. Z et al., 2002).....	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Spectre des radiations électroniques IR (Aribat, 2001).....	31
Tableau 2: Matériel chimique utilisé pour la synthèse chimique.....	33
Tableau 3: Consommables utilisés pour les activités biologiques.....	34
Tableau 4: Données analytiques des complexes obtenus.....	36
Tableau 5: Caractéristiques physico-chimiques des complexes organométalliques synthétisés.....	40
Tableau 6: Données spectrales du complexe DHA-Ni par analyse IR.....	41
Tableau 7: Données spectrales du complexe DHA-Co par analyse IR.....	42
Tableau 8: Données spectrales du complexe DHA-Zn par analyse IR.....	43
Tableau 9: Données spectrales du complexe DHA-Mn par analyse IR.....	44
Tableau 10: Données spectrales des complexes organométalliques par analyse UV-Vi...	45
Tableau 11: Résultats de l'activité de piégeage du radical ABTS.....	47
Tableau 12: Résultats de l'activité de blanchiment du β -carotène.....	49
Tableau 13: Résultats de l'activité de chélation des ions de fer.....	52
Tableau 14: Résultats de l'activité de chélation du cuivre.....	54
Tableau 15: Résultats de l'activité inhibitrice de l'uréase.....	56
Tableau 16: Configuration électronique des différents métaux de transition chélatés...	61

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1: Séquence réactionnelle pour la synthèse d'une base de Schiff.....	11
Schéma 2: Synthèse de complexes de métaux de transition (Mn, Co, Ni et Cu) avec une base de schiff (H ₂ L) (Bendre. R-S et al, 2017).....	14
Schéma 3: Action de l'uréase sur l'urée (Amutul.Z et al., 2002).....	27
Schéma 4: Structure générale des complexes de l'acide déhydroacétique.....	34
Schéma 5: Réaction de complexation de l'enzyme (E) avec l'inhibiteur (I) : E•I = Complexe Enzyme-inhibiteur , E•I* = complexe enzyme-inhibiteur stable (Amutul. Z et al., 2002).....	63

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique.
ADN	Acide désoxyribonucléique.
BHA	Hydroxyanisol butylé
BHT	Butylhydroxytoluène.
CO	Cobalt.
CU	Cuivre.
DHA	Acide déhydroacétique
DMF	Diméthylformamide.
DMSO	Diméthylsulfoxyde.
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique.
EOA	Espèces oxygénées activées.
ERO	Espèce réactive de l'oxygène.
Fe	Fer.
IC50	Concentration d'inhibition 50.
IR	Infrarouge.
LDL	Lipoprotéines de basse densité.
Mn	Manganèse.
Ni	Nickel.
Rdt	Rendement.
RX	Rayons X
T_f	Température de fusion.
UV-vis	Ultraviolet-visible.
Zn	Zinc
°C	Degrés Celsius

De nombreux composés ont des effets significatifs quand ils sont introduits dans le corps, mais seulement une petite fraction d'entre eux a le potentiel de devenir un médicament utile.

Le développement de médicaments est l'une des interfaces les plus importantes entre la biochimie et la médecine. Dans la plupart des cas, les médicaments agissent en se fixant sur des récepteurs spécifiques ou des enzymes et en inhibant ou en modulant de quelque manière leur activité, ce qui nous confronte à de gigantesques défis.

Les éléments inorganiques jouent un rôle fondamental dans le processus vital. Les propriétés physico-chimiques et biologiques des ligands et des métaux de transition sont démultipliées lorsqu'on associe ces deux entités au sein des complexes, les possibilités sont tellement vastes que cette chimie et ses applications biologiques ne cessent de se développer.

L'acide déhydroacétique ou DHA (3-acetyl-4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone) est un produit industriel, largement utilisé dans la technologie alimentaire en tant qu'agent conservateur, de plus c'est un agent fongicide et bactéricide. En raison de son excellente capacité de chélation, le DHA et ses dérivés ont une grande utilité dans le domaine de la synthèse organique des composés de coordination qui sont sujet de nombreuses applications et porteurs de nouveaux projets (**Lei Shi et al., 2009 ; Dhanraj.C.J, Nair.M.S, 2009; Tarafder.M.T.H.T et al., 2009; Hadjipalu.L et al., 1998**).

Au cours de la réalisation de ce travail de recherche, une série de quatre complexes du DHA avec des métaux de transition d'intérêt tels que: Zn, Co, Ni et Mn a été synthétisée et identifiée, différents tests biologiques ont été également initiés afin d'évaluer leurs potentiels antioxydant et anti enzymatique. Pour présenter ces résultats, le présent manuscrit se scinde en deux parties :

- Une partie théorique composée de trois chapitres :

Le premier chapitre comprend des généralités et des données bibliographiques sur le DHA, les métaux de transition et les complexes métalliques, leurs propriétés, ainsi que les différentes applications biologiques effectuées sur l'acide déhydroacétique, ses dérivés et sur les métaux de transition.

Le deuxième chapitre présente des rappels théoriques sur les différentes applications biologiques testées.

Le troisième chapitre est consacré à la description des méthodes spectroscopiques d'analyses structurales utilisées (UV, IR).

- Une partie pratique qui comprend deux chapitres :

Introduction générale

Un chapitre qui expose le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de la synthèse chimique ainsi que les différents tests biologiques.

Et un autre qui présente les résultats obtenus, leur discussion et leur interprétation.

Une conclusion générale ainsi que des perspectives de recherche pour terminer.

Chapitre I

*Généralités et données
bibliographiques*

Généralités sur l'acide déhydroacétique

I.1. L'acide déhydroacétique

L'acide dehydroacétique (DHA=3-acetyl-4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone) est un produit commercial utilisé comme fongicide, bactéricide et aussi comme matière première importante dans la synthèse organique (**Casabo.J et al., 1986**).

Il est connu également comme étant un ligand attrayant pour la chélation des métaux de transition, d'ailleurs, il a été démontré que ses complexes avec les cations Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} sont plus actifs que le DHA seul ou les sels inorganiques purs (**Zouchoune.F et al., 2010**).

Il nous a donc paru intéressant de poursuivre les recherches dans ce domaine sur les complexes du DHA et de comparer leur potentiel thérapeutique avec la molécule mère.

I.2. Synthèse et structure de l'acide déhydroacétique

I.2.1. Synthèse

L'acide déhydroacétique (DHA) est préparé selon trois différentes voies qui sont les suivantes: (**Gilchrist, 1985**)

- ✓ La polymérisation de quatre molécules de cétènes.
- ✓ La déshydratation de l'acide acétyl-acétique-2,4-diacétyl.
- ✓ La condensation de deux molécules de l'acétoacétate d'éthyle (par l'intermédiaire d'un catalyseur basique), c'est la voie la plus utilisée ; mais en utilisant un acide comme catalyseur, l'auto condensation donne l'iso acide déhydroacétique : 4,6-diméthyl-2H-pyran-2-one-5-acide carboxylique (Figure1).

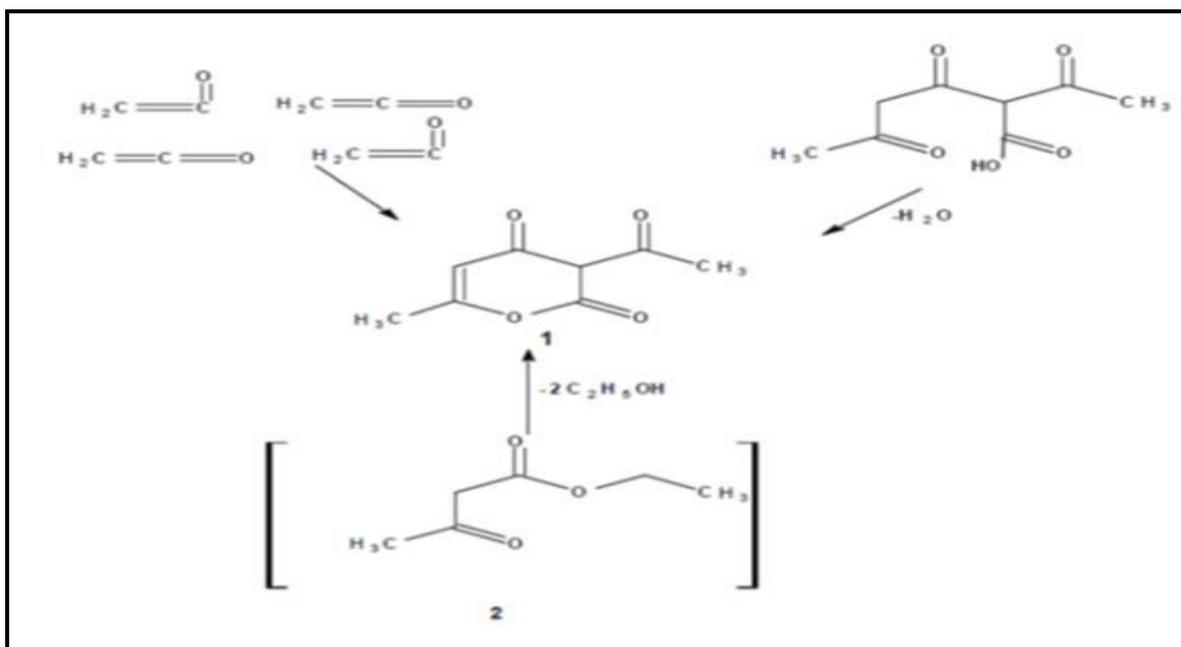


Figure 1: Les différentes voies de synthèse du DHA (Gilchrist, 1985).

I.2.2. Structure

La structure de l'acide déhydroacétique a été identifiée depuis **1924** par **Rassweiler et Adams**. En effet, ils ont caractérisé la structure de l'acide déhydroacétique par analyse RMN, UV et par Infrarouge (Figure 2).

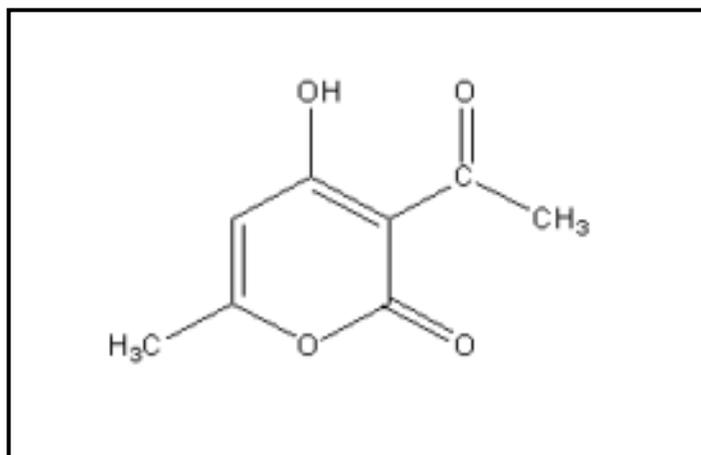


Figure 2: Structure de l'acide déhydroacétique (DHA) (Rassweiler et Adams, 1924).

I.2.3. Réactivité

L'acide déhydroacétique présente plusieurs centres réactifs. La position C3 étant hautement nucléophile. Il présente donc le siège d'attaque électrophile avec la conservation de la structure pyronique. , présentant ainsi une réactivité caractéristique des énols. Contrairement aux positions C2, C4 et C6, qui sont fortement nucléophiles. Procéder à des attaques nucléophiles des centres C2 et C6 conduit généralement à l'ouverture du cycle suivie de différentes cyclisations, aboutissant à de nouveaux systèmes hétérocycliques ou à des benzènes substitués. Le centre C5 est tout à fait inerte (Figure 3) (Stephen.J.F *et al*, 1969).

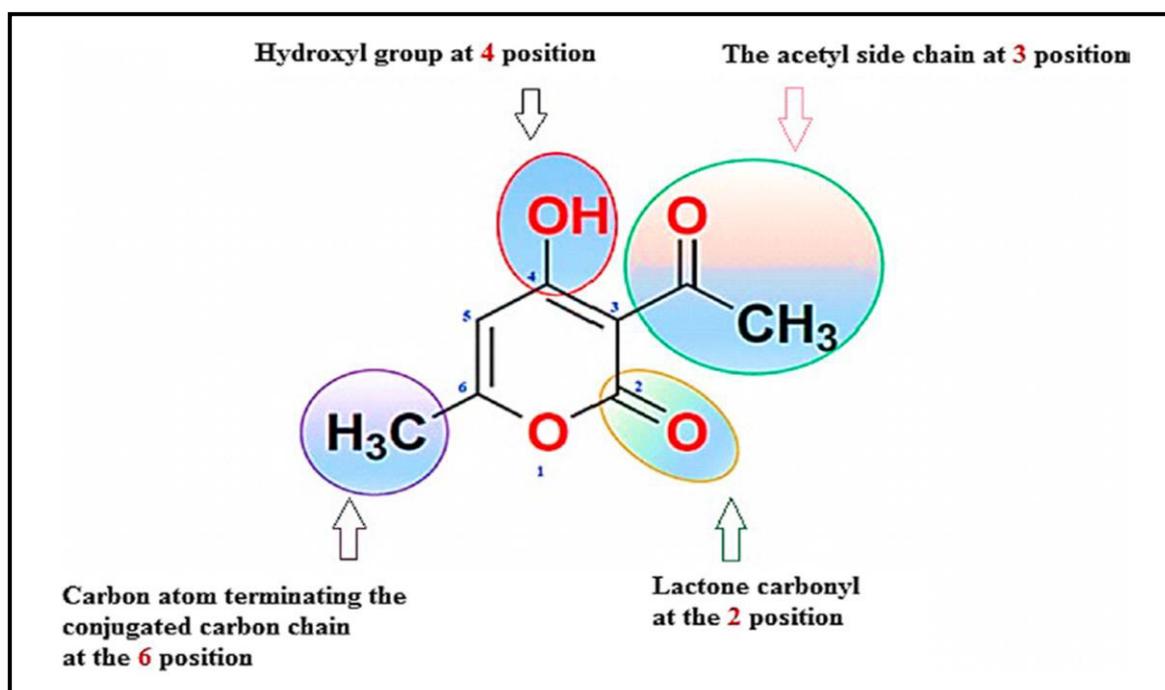


Figure 3: Les différents centres réactifs de l'acide déhydroacétique (Stephen.J.F *et al*, 1969).

II. Les métaux de transition

Les métaux de transition sont appelés ainsi car ils assurent la transition entre les éléments à caractère métallique et les non-métaux. Ils ont une sous couche (d) incomplète, ce qui permet d'avoir des transitions électroniques. Ces métaux sont regroupés par Mendeleïev dans un tableau, ceux qui sont dans la même rangée présentent des propriétés chimiques analogues alors qu'elles varient d'un groupe à l'autre (Quarrie et Rock, 1992).

La plupart de ces métaux sont colorés et se caractérisent par des masses volumiques et des points de fusion élevés.

II.1. Généralités sur le Nickel (Ni)

Le nickel pur est un métal dur, gris-blanc, classé en 24^{ème} place selon le degré d'abondance dans la nature (**Fay.M et al., 2005**) et il est le septième élément de transition le plus abondant (**Lancashire, 2006**). Dans la nature, il se trouve combiné avec l'oxygène ou le soufre comme principalement des oxydes ou des sulfures,

Le nickel est un élément dont l'intérêt biologique ne cesse d'accroître, d'ailleurs divers complexes à base de nickel ont été utilisés avec succès comme agent antiépileptique et anticonvulsif. D'autres complexes de Ni (II) présentent une activité antibactérienne, antimicrobienne et aussi anti-cancéreuse (**Skyrianou K. C et al., 2011**).

II.2. Généralités sur le Cobalt (Co)

Le cobalt est un métal argenté-blanc, on le trouve dans les roches, le charbon, sols et en concentrations de trace chez les animaux et les plantes. Il est considéré comme un élément essentiel pour certaines plantes et animaux (vitamine B12). Le cobalt est utilisé dans la fabrication des alliages qui ont montré une haute résistance à la corrosion et à l'oxydation à une température élevée. Ainsi le cobalt-60 radioactif est utilisé dans la radiothérapie et aussi dans la stérilisation des produits alimentaires (**Pradyot, 2003**).

II.3. Généralités sur le Zinc (Zn)

Ce métal a été découvert en Inde au 13^{ème} siècle, il est largement répandu dans la nature, son abondance dans la croûte terrestre est d'environ 70 mg/kg et sa concentration moyenne dans l'eau de mer est d'environ 10 µg/L.

Les applications importantes du zinc comprennent la galvanisation de l'acier, utilisé également comme additif chimique dans le caoutchouc et les peintures, dans la fabrication des électrodes et en tant qu'agent réducteur (**Pradyot, 2003**).

II .4. Généralités sur le Manganèse (Mn)

Le manganèse est très répandu dans la nature, principalement sous forme d'oxyde, de silicate et des minerais carbonatés. C'est le douzième élément le plus abondant de la croûte terrestre avec une concentration de 0,095 %. Le manganèse est largement utilisé dans l'industrie ainsi que dans les applications chimiques, électrochimiques, alimentaires et pharmaceutiques.

En outre c'est un élément qui constitue un rôle crucial pour les plantes et les animaux d'ailleurs sa carence dans le sol peut provoquer une chlorose ou autrement dit un manque de chlorophylle chez les plantes, se manifestant par l'apparition de traînées jaunes ou grises sur les feuilles. C'est un activateur de certaines enzymes végétales, telles que la décarboxylase et l'oxalosuccinique lors de l'oxydation des glucides. De plus, l'épuisement du manganèse chez les animaux provoque une déformation des os (**Pradyot, 2003**).

III. Les complexes métalliques

III.1. Définition d'un complexe

On appelle complexe toute entité formée par l'association de deux ou plusieurs éléments chimiques indépendants : ions ou molécules. Toute fois les complexes les plus importants dans la pratique sont ceux qui associent un cation métallique et une ou plusieurs entités chélatantes appelées coordinats (ligands), qui peuvent être des molécules organiques, inorganiques, des anions ou rarement des cations comme l'ion Nitrosyle NO^+ .

La stéréochimie des complexes est déterminée en grande partie par le nombre de coordination (**Guermiche. A, 1996**).

III.2. Classification des complexes métalliques

La classification des complexes se fait en se basant sur le nombre d'ions (ou d'atomes) centraux qu'ils comportent. Les complexes dont les formules sont organisées autour d'un seul ion central sont appelés complexes **monométalliques** (on dit aussi mononucléaires). Dans le cas où l'entité complexe comporte deux ou plusieurs ions métalliques on la désigne par les termes **bimétalliques** (binucléaire), **trimétallique** (trinucléaire), **polymétallique** (polynucléaire). Lorsque les ions métalliques sont éloignés les uns des autres les complexes seront représentés comme montré dans l'exemple ci-dessous (**Fenanir. F, 2011**).

L'exemple suivant montre le cas où la distance entre ces métaux diminue, il va y avoir formation des liaisons métal-métal et le complexe formé est appelé « Agrégat » (**Fenanir. F, 2011**).

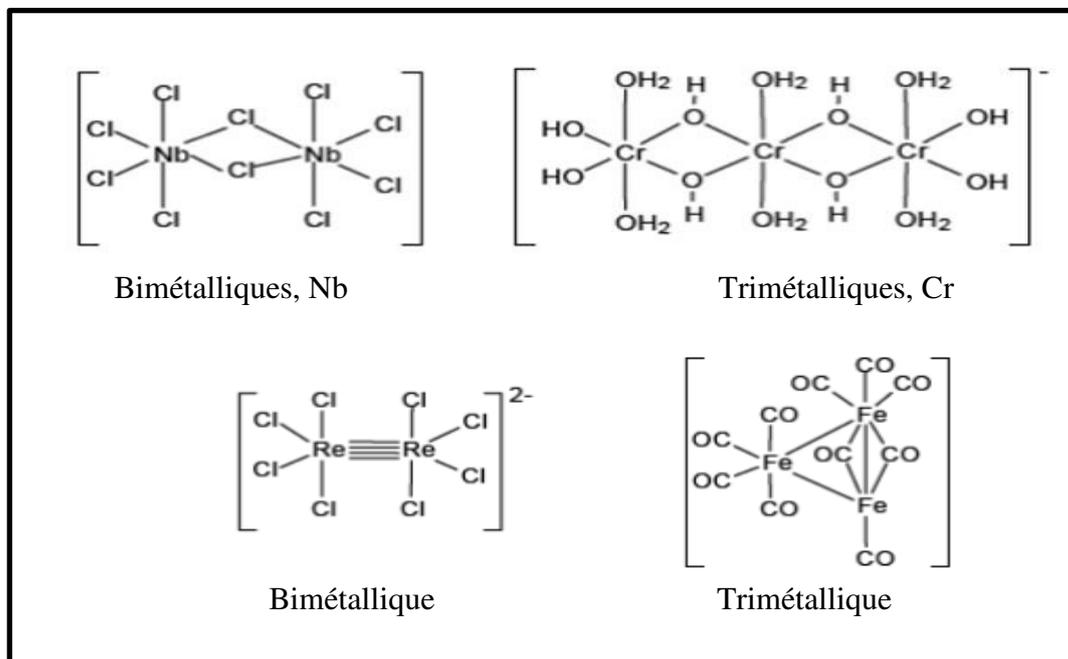


Figure 4: La classification des complexes métalliques (**Fenanir. F, 2011**).

IV. Ligand (coordinat)

C'est une molécule ou ion lié à l'atome central d'un complexe par des liaisons de coordination.

On appelle coordination unidentée, un coordinat fixé à un seul point à l'ion métallique. Dans le cas de deux, trois, quatre liaisons ou plus, elles sont bidentées, tridentées, quatridentées et plus généralement multidentées.

Le nombre des atomes donneurs liés à l'ion métallique définit le nombre de coordination de l'atome métallique central.

Un métal peut présenter plusieurs nombres de coordination caractéristiques de la valence de l'atome central et de la nature du coordinat envisagé.

Les ligands qui peuvent se lier à l'atome central par au moins deux groupes donneurs, sont des agents chélatants. Les complexes qui en résultent portent le nom de chélates et sont d'une grande stabilité (**Brumas.V, 1991**).

V. Acide déhydroacétique et pouvoir complexant

L'acide déhydroacétique est connu, aussi, pour son pouvoir chélatant, il contribue à la synthèse de nombreux complexes qui ont des activités biologiques importantes.

Monica Zucolotto Chalça et ses collaborateurs (2002), ont synthétisé et caractérisé de nouveaux complexes $[Zn(DHA) 2.2H_2O]$, $[Zn(DHA)2.2DMSO]$, $[Cd(DHA) 2.2DMSO]$, $[Cd(DHA) 2.2H_2O]$ (figure 5), L'acide déhydroacétique agit comme ligand bidentat et s'associe avec deux molécules d'eau ou de diméthylsulfoxyde (DMSO) pour former des complexes à champ octaédrique. Toutefois, le complexe du Zinc (II) a une grande tendance à former une coordination tétraédrique.

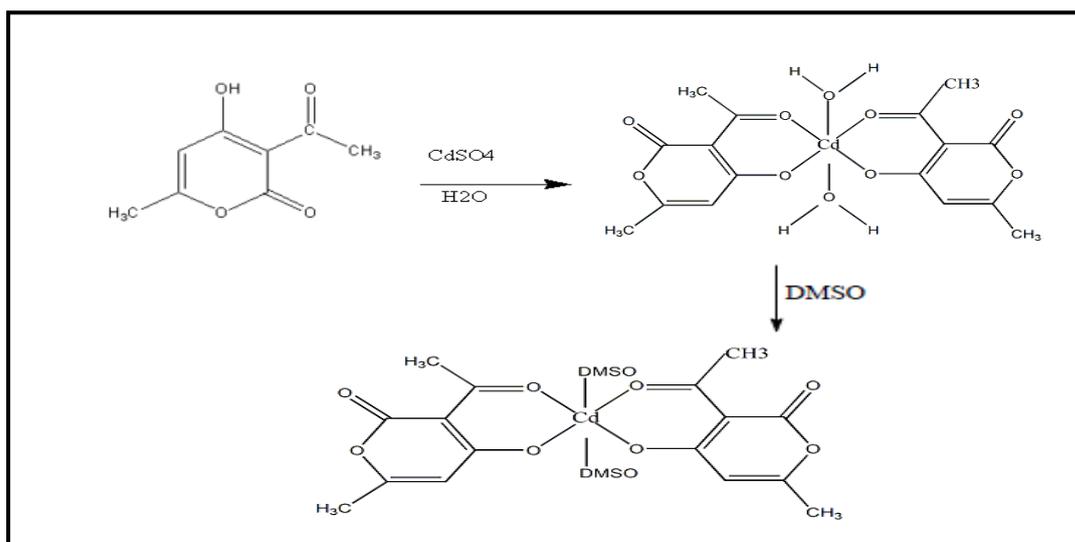


Figure 5: Complexe du DHA avec le cadmium (**Monica Zucolotto Chalça et al, 2002**).

D'autres chercheurs qui sont intéressés par la chélation de l'acide déhydroacétique avec les métaux de transitions comme **Djedouani.A et al., (2010)** ont synthétisé les complexes $[Cu(DHA)2.2DMSO]$ (figure 6), $[Cd(DHA)2.2DMSO]$ (figure 7), $[Zn(DHA)2.2DMSO]$ (figure 8) ainsi que le complexe $[Ni(DHA)2.2DMSO]$ (figure 9) en 2009, et ont caractérisé leurs structures par DRX.

Les résultats montrent que la structure de chaque complexe est constituée d'un octaèdre légèrement déformé centré par un métal de transition avec des ligands bidentés de DHA situés dans des positions équatoriales et les molécules de solvant en positions axiales.

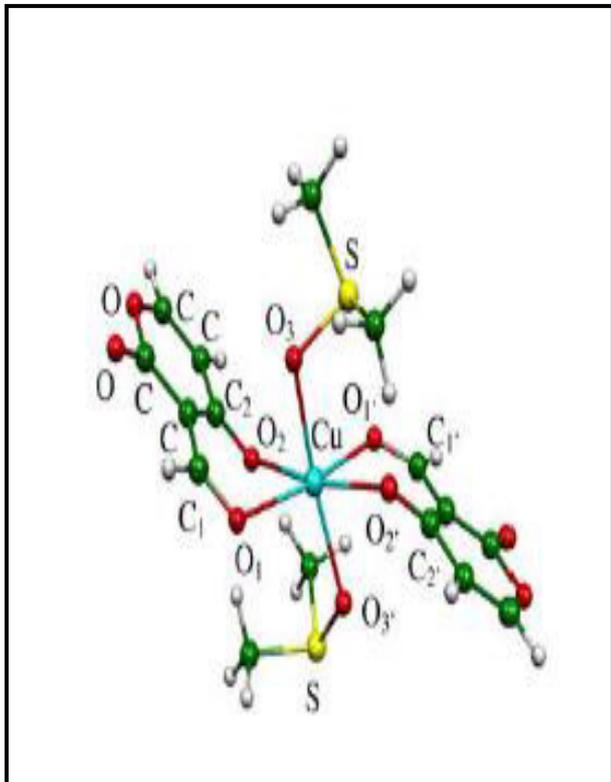


Figure 6: Structure 3D du complexe $[\text{Cu}(\text{DHA})_2 \cdot 2\text{DMSO}]$ (Djedouani.A et al., 2010).

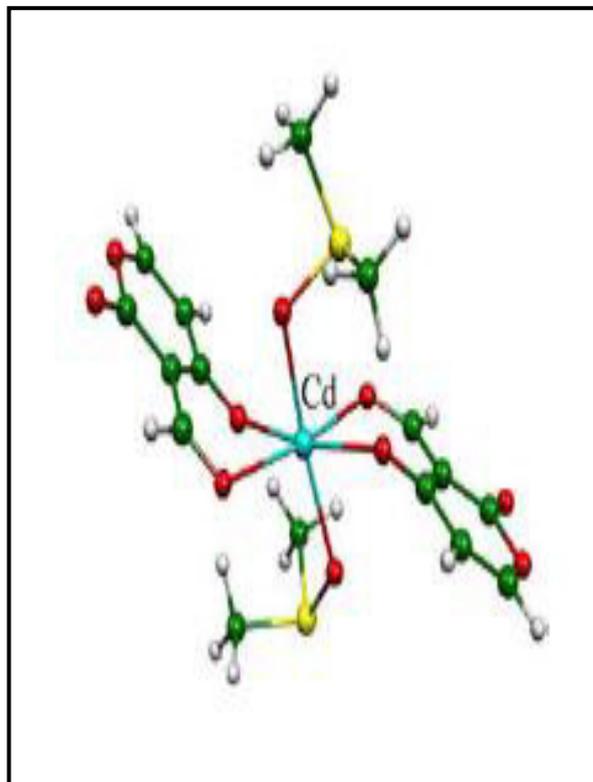


Figure 7: Structure du complexe $[\text{Cd}(\text{DHA})_2 \cdot 2\text{DMSO}]$ (Djedouani.A et al., 2010).

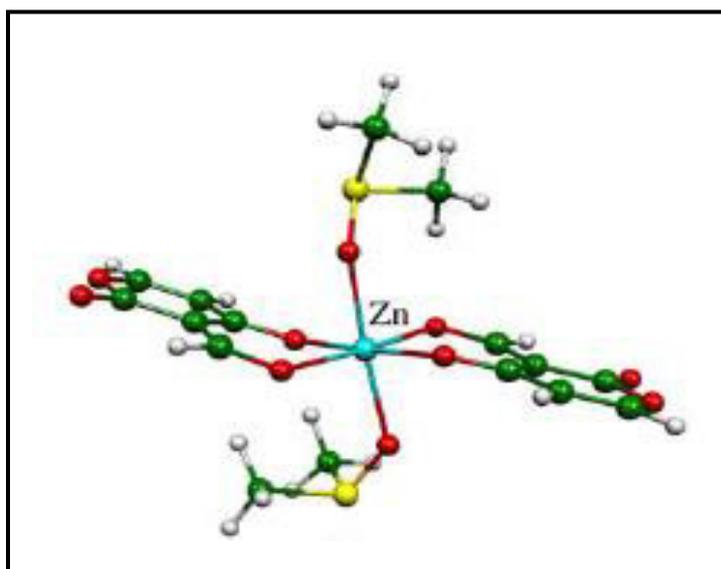


Figure 8: Structure 3D du complexe $[\text{Zn}(\text{DHA})_2 \cdot 2\text{DMSO}]$ (Djedouani.A et al., 2010).

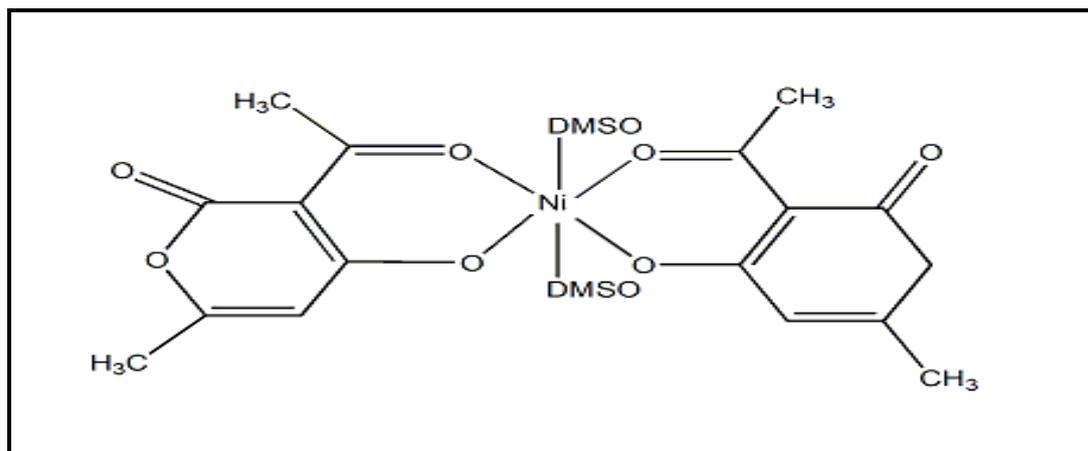


Figure 9: Structure du complexe $[\text{Ni}(\text{DHA})_2 \cdot 2\text{DMSO}]$ (Djedouani.A et al., 2009).

VI. Revue bibliographique sur les applications biologiques de l'acide déhydroacétique et ses dérivés :

Le DHA, est un composé industriel connu par ses propriétés bactéricides et fongicides, il est également utilisé dans la préparation d'une grande variété de produits cosmétiques notamment les produits de soin de la peau ainsi que des cheveux et des ongles, les crèmes solaires et les parfums. C'est un composé biologiquement actif. Diverses approches ont montré que c'est un agent antiseptique très fort lorsqu'il est en solution aqueuse, de plus il est largement utilisé pour augmenter la stabilité de la vitamine C (Gualda, 2017).

Parmi les dérivés du DHA qui ont connu un rôle intéressant dans le domaine chimique et biologique : **Les bases de Schiff**, ces derniers, portent le nom de leur inventeur Hugo Schiff (1834-1915) qui fut le premier chimiste à synthétiser ce type de composés en 1864 (Tidwell. T.T, 2008), ces composés résultent de l'addition d'une amine primaire avec un aldéhyde ou une cétone suivie par l'élimination d'une molécule d'eau (schéma 1).

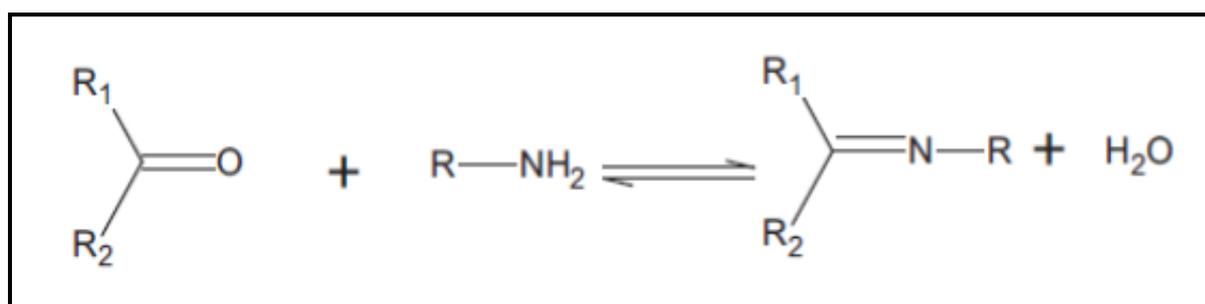


Schéma 1: Séquence réactionnelle pour la synthèse d'une base de Schiff.

Ces ligands sont des composés ayant toujours un doublet libre d'électrons porté par l'atome d'azote qui lui confère un caractère nucléophile très fort, ce qui lui permet d'attaquer facilement les centres actifs de faible densité électronique, comme l'atome de carbone de groupement carbonyle et les ions des métaux de transition citant comme exemples : Zn, Cu, Cd, Ni, Co.

Afin de synthétiser des bases de schiff, **Ullah et al. (2012)** ont fait réagir l'acide déhydroacétique avec différentes anilines mono ou di substituées dans le méthanol et sous agitation. Ils ont obtenu trois composés (bases de Schiff) qui sont :

4-hydroxy-3-(*N*-(4 méthoxyphényl) éthanimidoyl-6-méthyl-2Hpyran-2-one (1) , la 4-hydroxy-3-(*N*-(3,4 dichlorophényl)éthanimidoyl-6-méthyl-2H-pyran-2-one (2) et la 4-hydroxy-3-(*N*-(2,3 diméthylphényl)éthanimidoyl-6-méthyl-2H-pyran-2-one (3) (Figure 10).

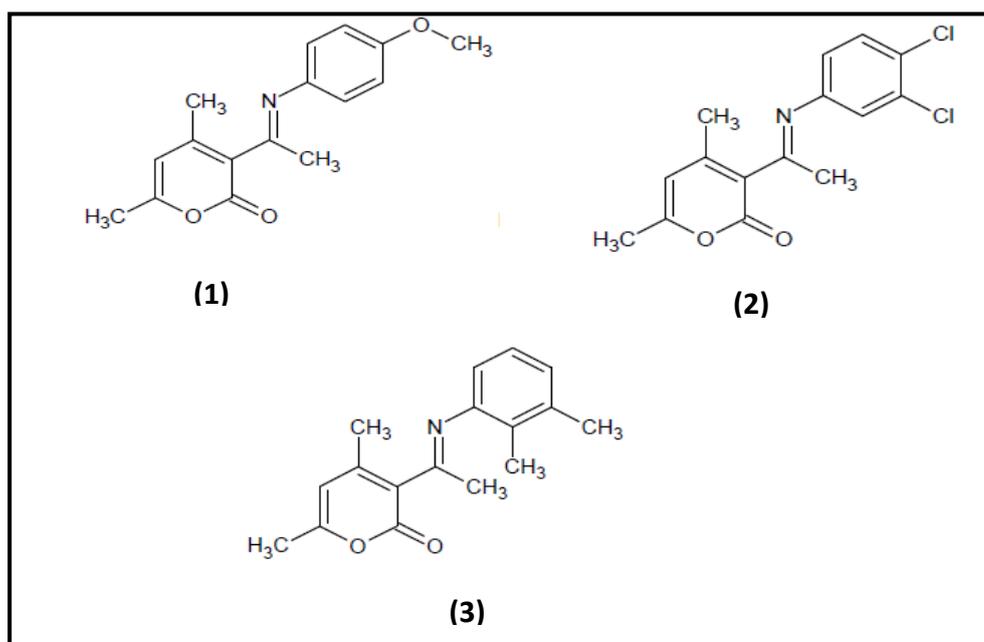


Figure 10: Les trois composés bases de Schiff synthétisées par **Ullah et al. (2012)**.

L'évaluation de l'effet de ces trois bases de schiff synthétisées a montré qu'ils ont des activités antibactériennes potentielles contre quatre souches de bactéries qui sont les suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aureginosa*.

Mane et al (2001) ont contribué à la préparation des bases de Schiff dérivées de l'acide déhydroacétique et l'aniline, *p*-chloroaniline, *p*iodoaniline et *p*-phénétidine , ils ont

chélaté ces bases de Schiff à des métaux de transition qui sont le Mn(II), le Co(II), le Ni(II) et le Cu(II). Le test de l'activité fongicide du ligand ainsi que celle de ces complexes métalliques contre l'*Aspergillus niger* a montré que le pourcentage d'inhibition des complexes métalliques était considérablement accru par rapport à celui de leurs ligands seuls.

En 2015, Nisha. B et Jai. D, ont utilisé l'acide déhydroacétique comme l'un des composants pour la préparation du ligand à base de Schiff puis ce dernier a été complexé aux métaux suivants Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) (Figure 11). Les résultats de cette étude ont montré que ces complexes possèdent une activité antibactérienne faite *in vitro* contre certaines bactéries à Gram positif qui sont : *Bacillus subtilis* *Micrococcus luteus*, et d'autres bactéries à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina*, et des champignons *Verticillum dahliae*.

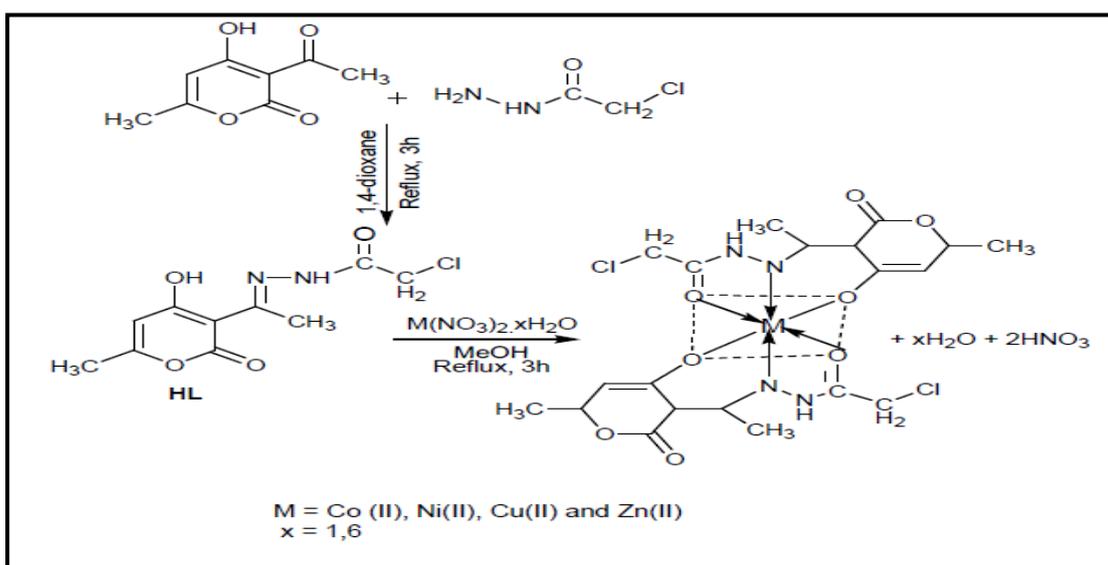


Figure 11: Structure des complexes de Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) synthétisés en utilisant le DHA (Nisha. B et Jai. D, 2015).

Des réactions de l'acide déhydroacétique, par condensation avec des amines aliphatiques, aromatiques ou hétérocycliques (Maiti, 1998), avec des dérivés pyranopyrazoliques (Riyad.B-Y et al., 1989), ou des esters aromatiques (Harris. T-M et al. 1968), ont permis la synthèse d'un nombre impressionnant de composés possédant des propriétés biologiques intéressantes, comme antibactériens (Marisson.L-R et al., 2002 ; Marisson.L-R et al., 2003), antifongiques, anticancéreux (Maiti, 1998).

VII. Revue bibliographique sur les applications biologiques des complexes de métaux de transition :

En 2017, Bendre. R-S et al ont synthétisé et caractérisé, par des méthodes physico-chimiques et spectroscopiques, une série de complexes d'un ligand 6,6'-((1E,1'E) (ethane1,2diylbis (azanylylidene)) bis (methanylylidene)) bis (5isopropylmethylphenol) base de schiff (H₂L) avec des métaux de transition : manganèse (III), cobalt (II), nickel (II) et cuivre (II). (Schéma 2)

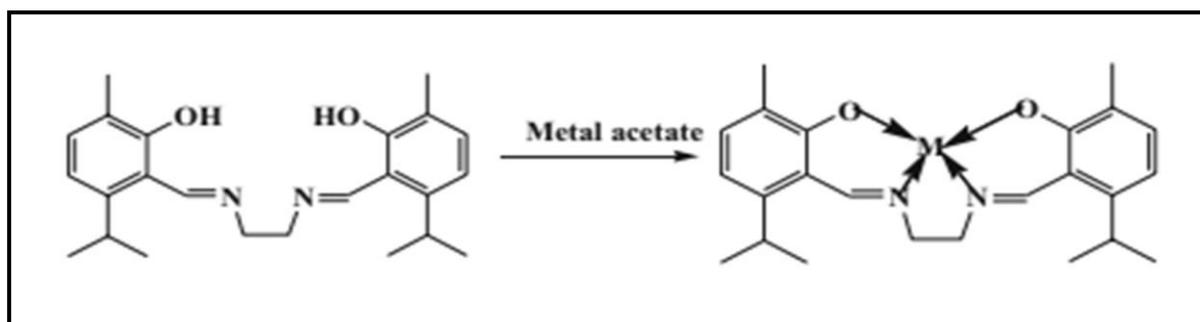


Schéma 2: Synthèse de complexes de métaux de transition (Mn, Co, Ni et Cu) avec une base de schiff (H₂L) (Bendre. R-S et al, 2017).

Le ligand de base de Schiff libre et ses complexes ont été testés pour l'activité antibactérienne contre des bactéries à Gram négatif (*P. aeruginosa*) et des bactéries à Gram positif (*B. subtilis* and *S. aureus*). Les résultats indiquent que :

- La base de Schiff possède une activité contre *B. subtilis* et *S. aureus* comparable à celle du standard l'ampicilline.
- Tandis que le complexe de manganèse (III) montre une excellente activité contre *B. subtilis*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*.
- Cependant, tous les autres complexes montrent des activités médiocres par rapport à la ciprofloxacine et à la streptomycine.

L'activité antioxydante du ligand et ses complexes de métaux de transition a été testée par leur capacité à piéger le radical DPPH par rapport aux standards l'hydroxytoluène butylé (BHT), l'acide ascorbique et l' α -tocophérol. Les résultats obtenus indiquent que :

- Le ligand libre (H₂L) montre une faible activité antioxydante.

- Cependant, plusieurs de ses complexes, notamment les complexes de Ni (II) et de Cu (II), possèdent une activité meilleure que celle du BHT et comparable à celle de l'acide ascorbique et l' α -tocophérol.
- En revanche, le complexe de Mn (III) présente une faible activité antioxydante. (Bendre, R-S et al, 2017).

Des complexes de Co (II), Ni (II), Cu (II) et Zn (II) avec trois ligands différents de la base de Schiff ont été synthétisés (Figure12) et caractérisés par diverses techniques spectroscopiques. Les ligands 1,2 et 3 ont été obtenus par la réaction de condensation de 3-amino-1H-1,2,4-triazole avec le pyrrol-2-carboxaldéhyde, le 4-bromo-thiophène-2-carboxaldéhyde et 5-iodo-2-hydroxybenzaldéhyde, respectivement. Tous les complexes montrent une activité efficace contre toutes les souches bactériennes testées :

- Les bactéries à Gram positif à savoir *B. subtilis* et *S. aureus*.
- Les bactéries à Gram négatif comme *E. coli*, *S. sonnei*, *P. aeruginosa* et *S. typhi*. (Malik, M-A et al, 2018)

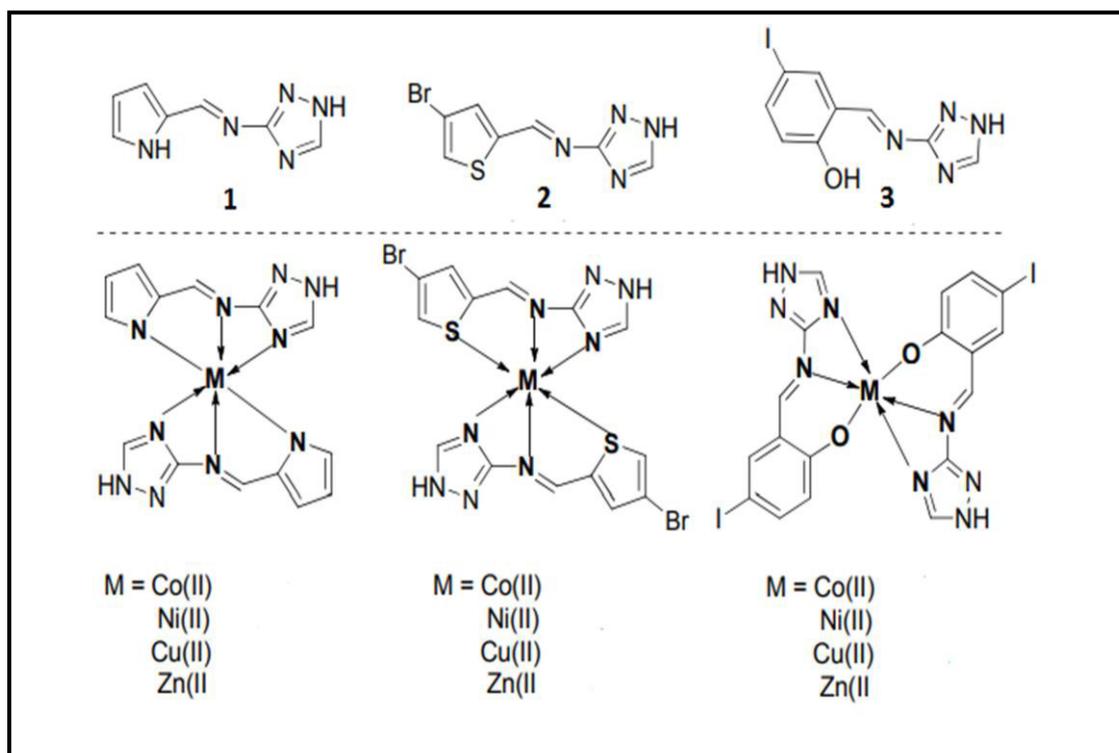


Figure 12: Synthèse de complexes de métaux de transition (Co, Ni, Cu et Zn) à partir de trois ligands différents (Malik, M-A et al, 2018).

Toutes ces données bibliographiques montrent l'importance et les diverses utilisations de l'acide déhydroacétique, il représente un maillon important dans l'édifice de la chimie hétérocyclique, ainsi qu'une richesse exceptionnelle, tant du point de vue synthétique, réactivité, que de ses applications biologiques. Ses multiples centres réactifs lui donnent la qualité d'un précurseur de choix pour la synthèse de nouvelles molécules hétérocycliques bioactives.

Chapitre II

*Rappels théoriques sur les
différentes applications testées*

I. Introduction

Certaines recherches scientifiques ont mis en évidence l'existence des facteurs responsables du vieillissement ainsi que des maladies liées au stress oxydant citant comme exemple le cancer, les maladies cardio-vasculaires, les maladies neuro-dégénératives (Parkinson et Alzheimer) et aussi certaines allergies et autres maladies chroniques, ces diverses maladies auraient, entre autres, la même composante qui permet au bois de brûler, à l'huile de rancir, à l'aliment d'altérer ou au fer de rouiller. L'une des principales causes de tout cela est « l'oxydation » (**Le Cren.F, 2004**). Quand la cellule utilise l'oxygène, il se passe un grand nombre de réactions d'oxydation, ce qui résulte la production d'énergie, mais aussi de différents sous-produits appelés espèces réactives de l'oxygène (**Migdal.C et al., 2011**).

Il est estimé qu'une cellule normale produit 2×10^{10} d' $O_2 \cdot^-$ et de H_2O_2 par jour, l'équivalent de $3,3 \times 10^{-14}$ moles par jour (**Ames.B.N et al, 1994**). Le vieillissement des organismes est essentiellement attribué au contact constant des constituants cellulaires, y compris le matériel génétique et leurs réactions avec ces espèces réactives (**Harman.D, 1956**).

L'organisme est équipé pour lutter contre ces derniers par un système de défense. Cependant, ce système est parfois dépassé, surtout quand les agressions sont multipliées sous l'effet des radicaux libres d'origine endogènes et exogènes, cela peut entraîner ce qu'on appelle le : Stress oxydatif (**Le Cren.F, 2004**).

II. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. La réduction univalente de l'oxygène résulte dans la formation d'espèces oxygénées activées (EOA) dont font partie les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle), le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet. Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent inactiver des protéines, induire des cassures au sein de l'acide désoxyribonucléique (ADN) avec, comme conséquence, une altération du message génétique, dégrader les sucres, oxyder les lipoprotéines et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés. En situation normale, les EOA sont produites en permanence par notre organisme (rôle physiologique) mais un système efficace de défenses antioxydantes (vitamines, enzymes, oligoéléments) permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif. Dans certaines conditions, une surproduction d'EOA due à

l'activation de divers mécanismes biochimiques peut submerger rapidement les défenses antioxydantes : c'est le stress oxydatif. Celui-ci est de plus en plus impliqué pour expliquer les dégâts cellulaires observés dans les états inflammatoires aigus, le vieillissement, le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires (**Pincemail, 1999**).

III. Les espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène est un radical libre peu réactif, présent le plus souvent sous forme de dioxygène. Physiologiquement et dans certaines circonstances, il est à l'origine de la formation de dérivés plus réactifs appelés espèces réactives oxygénées (ERO) (**Ichai et al, 2011**). Chaque cellule aérobie a le potentiel de former l'ion superoxyde. C'est le point de génération initial des autres ERO (**Bhattacharyya.J et al, 2004**). Ces molécules sont très nombreuses, de forme radicalaire (contenant un électron non apparié) ou non. Il existe de très nombreuses ERO mais les plus importantes sont l'ion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'hypochlorite et le peroxyde d'azote. L'ion superoxyde est formé spontanément ou par certaines enzymes comme les oxydases ou les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Peroxyde d'hydrogène par l'enzyme superoxyde dismutase. Cette molécule est plus stable que l'ion superoxyde. Elle est dégradée en eau et oxygène par la catalase et la glutathion peroxydase. En présence de métaux de transition sous forme libre (fer et cuivre), elle peut donner naissance au radical hydroxyle qui est la plus réactive et donc la plus toxique des ERO (**Ichai et al, 2011**). Tandis que le radical superoxyde semble peu réactif. Cela dit, il demeure une espèce potentiellement toxique via sa réaction avec le peroxyde d'hydrogène ou le monoxyde d'azote, générant respectivement des radicaux hydroxyles et des anions peroxyde d'azote, tous deux très délétères vis-à-vis des macromolécules (**Gardès-Albert.M et al, 2003**) (Figure 13).

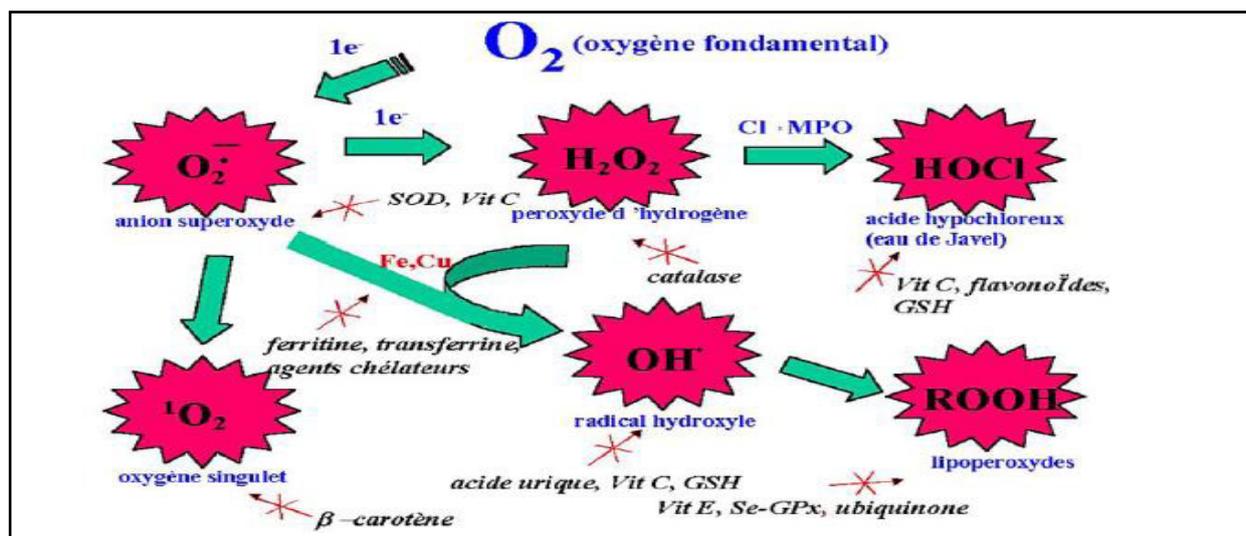


Figure 13: Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces (Pincemail, 1999).

IV. Les cibles biologiques des EOA

Les radicaux libres sont très réactifs et réagissent souvent avec les matériaux biologiques les plus proches comme les lipides membranaires, les protéines et enzymes, nucléotides ou toute autre macromolécule initiant des processus biochimiques conduisant à une altération profonde des fonctions cellulaires, qui sont généralement dommageables. Il s'agit de la peroxydation lipidique, de la dénaturation des protéines, de l'oxydation de l'ADN et de la déstabilisation des structures cellulaires et interstitielles (Bhattacharyya.J et al, 2004).

IV.1. Peroxydation lipidique

Les lipides sont les constituants les plus susceptibles aux réactions oxydatives radicalaires. Cette instabilité est due à leur teneur en acides gras polyinsaturés (AGPI), les triacylglycérols et les phospholipides (Branen et al, 2002).

Les acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique ou arachidonique sont les cibles privilégiées des EOA et plus particulièrement des radicaux libres (Pincemail, 1999). En raison de son abondance *in vivo*, l'acide linoléique est le plus étudié et son oxydation aboutit à des produits simples (Niki.E et al, 2005).

Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui, captées par des

macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (**Favier, 2003**).

La peroxydation lipidique se fait en trois étapes : (Figure 14).

- L'initiation : le radical libre arrache un atome d'hydrogène d'un groupement méthylène (-CH₂-) adjacent à deux doubles liaisons. Le radical formé est stabilisé par résonance.
- La propagation : débute lorsqu'une molécule d'O₂ attaque le radical acide gras polyinsaturé (AGPI•) pour former un radical peroxyde (AGPI-OO•) qui peut arracher un H• à un autre donneur RH et créer un nouveau radical, qui s'oxydera et ainsi de suite.
- La terminaison : consiste en la recombinaison de deux radicaux pour former des composés plus ou moins stables (**Lagarde et al, 2003**).

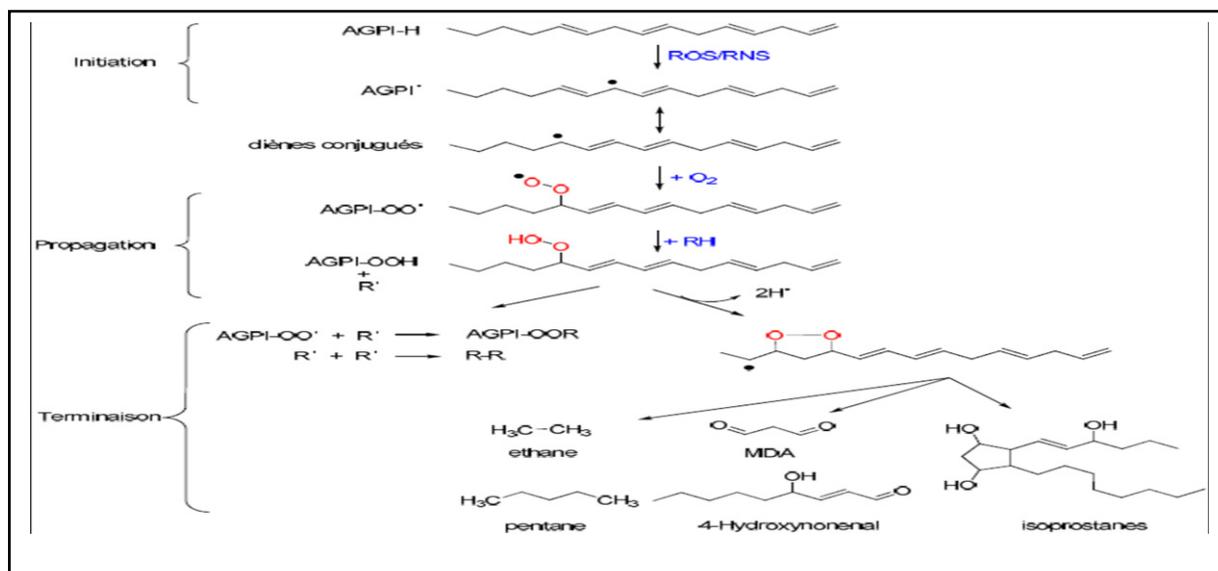


Figure 14: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (**Lagarde et al, 2003**).

IV.2. Oxydation des protéines

Les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les EOA sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés (**Pincemail, 1999**).

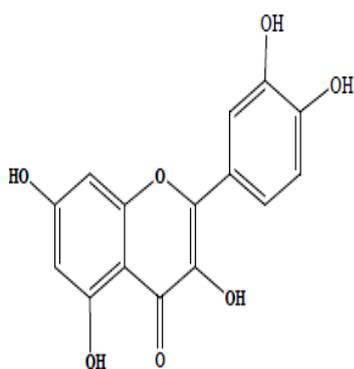
V. Les Antioxydants

Les antioxydants sont des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (Yaacoub, 2009 ; Hellal, 2011).

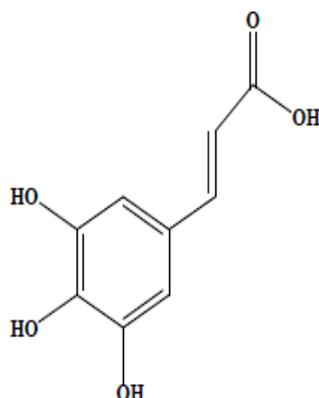
Les antioxydants sont capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation d'un composé par la libération d'un ou plusieurs électrons. Certains antioxydants sont produits par l'organisme comme les enzymes, d'autres proviennent de l'alimentation telle que les vitamines et les minéraux (Pokorny *et al.*, 2001). Ainsi, ces antioxydants sont classés soit en composés exogènes (naturels ou synthétiques) ou endogènes, responsables de limiter les dommages dûs aux radicaux libres, des ERO ou de leurs précurseurs (Valko *et al.*, 2006).

Au cours de cette étude, cinq activités antioxydantes ont été testées afin d'évaluer le potentiel antiradicalaire des complexes synthétisés.

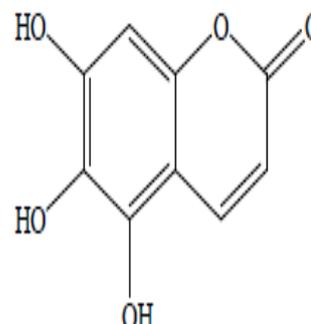
Parmi les antioxydants les plus connus : le β -carotène (provitamine A), les composés phénoliques, ainsi que l'acide ethylenediaminetetraacétique (EDTA) et comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), α -tocophérol (vitamine E) et les antioxydants synthétiques tel que le BHA (Butyl-hydroxy-anisol) et le BHT (butyl-hydroxy-toluène) (Molyneux. P, 2004) (Figure 17).



Quercétine



Acide cinamique



Coumarine

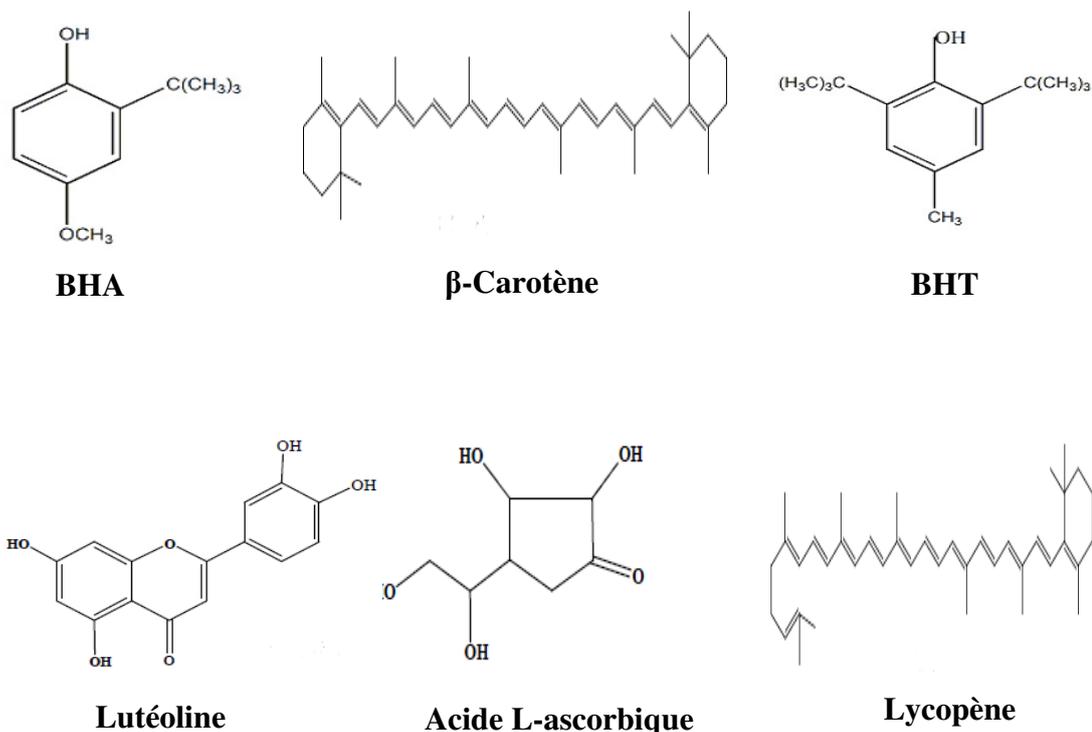


Figure 17: Composés naturels ou synthétisés possédant un pouvoir antioxydant (Branen et al, 2002).

VI. Activités antioxydantes

VI.1. Activité de piégeage du radical d'ABTS

VI.1.1. Principe

L'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (figure 18) est un radical libre et stable très utilisé pour l'évaluation du pouvoir antioxydant des fluides biologiques, des mélanges complexes ou bien des composés purs. Ce radical est capable de réagir avec des antioxydants classiques de types phénols et thiols mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron (Rice-Evans et Miller, 1994 ; Rice-Evans et al., 1995).

L'activité antioxydante totale d'un échantillon est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS \bullet^+ , ce dernier est obtenu à partir de l'ABTS. Le radical ABTS \bullet^+ préformé est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium. Cette formation se traduit par l'apparition d'une coloration vert bleu intense et en présence d'un agent antioxydant, le passage du radical ABTS à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée à une longueur d'onde de 734 nm (Re et al., 1999).

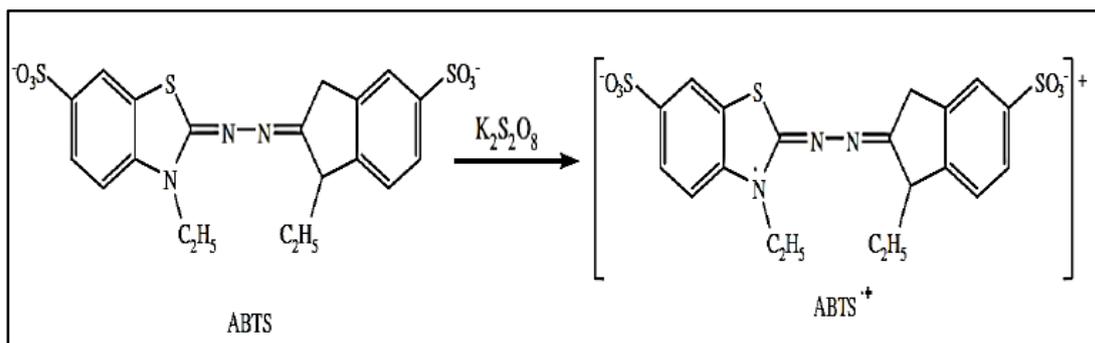


Figure 18: Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS+• (Gülçin, 2012).

VI.2. Activité de blanchiment du β -carotène

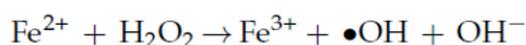
VI.2.1. Principe

Dans ce test, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (Tepe et al., 2005). Dans cette activité, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui attaquent les onze doubles liaisons du β -carotène, ce qui entraîne une décoloration de cette dernière mesurée par le spectrophotomètre à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β -carotène, L'absorbance est ainsi lue au temps 0 puis au bout de deux heures à la même longueur d'onde citée précédemment (Kubola et Siriamornpun, 2008 ; Marco.J et al., 1968). Cette méthode est largement utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydante de différents types d'échantillon.

VI.3. Activité de chélation du fer par UV-Visible

VI.3.1. Principe

Les métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}) sont essentiels pour assurer diverses fonctions physiologiques comme des composants des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes (Pietta, P-G, 2000). Néanmoins, ils peuvent contribuer à la génération



du radical $\text{OH}\bullet$ suite à la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon la réaction de Fenton (H.Xie, 2018).

La présence d'un agent chélateur du Fe^{2+} (formation d'une couleur bleue) réduit considérablement la génération de ces espèces réactives (H.Xie, 2018) et donc la complexation des ions de fer de manière à bloquer leur activité redox, est un mécanisme d'action antioxydant.

VI.4. Activité de la chélation des ions de fer

VI.4.1. Principe

La chélation des ions ferreux par les extraits à tester a été estimée par la méthode de **Dinis et ses collaborateurs (1994)**, la ferrozine (figure 19) forme avec le fer libre (ferreux ou Fe^{2+}) un complexe ferrozine- Fe^{2+} de couleur violette intense. Cependant, en présence d'agent chélateur, la formation du complexe est perturbée ce qui entraîne une diminution de la couleur violette du complexe. Donc plus la couleur de la solution contenant l'extrait à tester est claire, plus le pouvoir chélateur est important. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 562 nm.

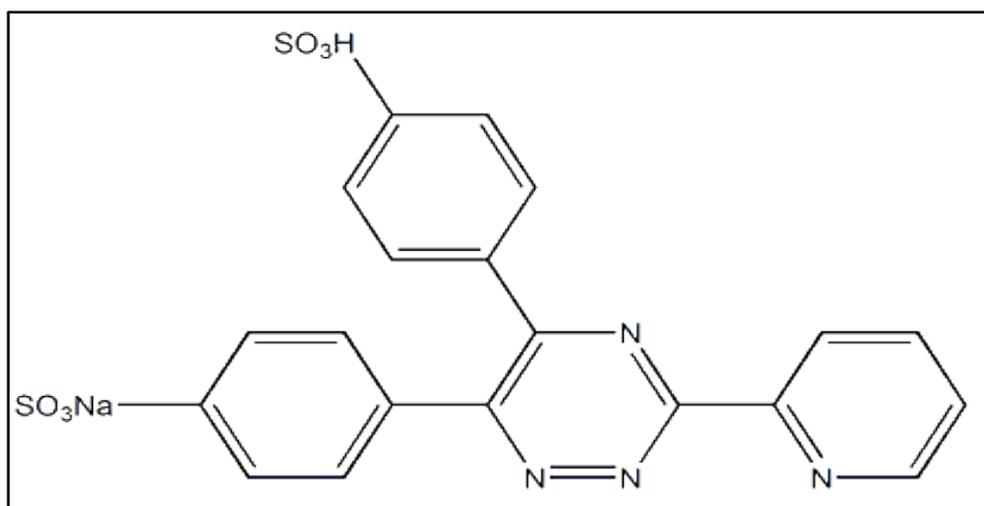


Figure 19: Structure de la ferrozine (Lawrence L.S , 1970).

VI.5. Activité de chélation du cuivre

VI.5.1. Principe

Les métaux qui subissent des réactions cycliques d'oxydo/réduction tel que le cuivre (Cu^{2+}) ont la capacité de produire des espèces réactives donc l'accumulation de ces ions métalliques résultent un stress oxydatif qui se traduit par des dommages de l'ADN, la peroxydation des lipides et les modifications des protéines.

Le cuivre (Cu^{2+}) forme avec le pyrocatechol violet (PV) un complexe Cu^{2+} -PV de couleur bleue. Cependant, en présence d'un agent chélateur de cuivre la formation du complexe est perturbée et la couleur bleue devient jaune. L'activité chélatante peut ainsi être estimée par la mesure du taux de réduction de la couleur. L'absorbance est mesurée à 632 nm (**Sánchez-Vioque. R, 2013**).

VII. Evaluation de l'activité enzymatique anti-uréase

VII.1. Introduction

L'inhibition des enzymes a attiré l'attention des scientifiques biomédicaux ces deux dernières décennies, une variété d'inhibiteurs a été découverte et utilisée pour le contrôle de diverses maladies (**Raza shah et Soomro, 2012**).

Dans ce contexte, le potentiel inhibiteur de l'uréase par les complexes synthétisés dans le présent travail a été évalué dans le but de trouver ou d'identifier de nouveaux inhibiteurs, qui peuvent aider dans le traitement ou la prévention de certaines maladies.

L'uréase bactérienne a été rapportée comme un facteur de virulence. c'est une enzyme qui contient deux atomes de nickel qui catalysent l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et en carbamate, ce dernier se décompose rapidement et spontanément produisant une seconde molécule d'ammoniac, ces réactions peuvent provoquer une augmentation significative du pH gastrique qui est responsable des effets néfastes sur la santé humaine, c'est la raison pour laquelle les inhibiteurs de l'uréase interviennent pour contrer son effet négatif dans l'organisme vivant, afin d'éviter plusieurs infections graves causées par la sécrétion de cette enzyme par *Helicobacter pylori* qui comprend des syndromes gastrique et urinaire et peut conduire à un cancer de l'estomac (**Murtaza et al., 2011 ; Raza shah et Soomro, 2012 ; Khan et al., 2014**).

VII.2. Définition de l'uréase

Les uréases (amidohydrolases urée; E.C. 3.5.1.5) sont un groupe d'enzymes très répandues dans la nature. Elles sont synthétisées par de nombreux organismes incluant les plantes, les bactéries, les champignons, les algues et les invertébrés (**Taha.M et al., 2017**), leur fonction essentielle est de permettre aux organismes d'utiliser l'urée comme source d'azote pour leur croissance (**Amutul.Z et al., 2002**). L'uréase exerce une fonction catalytique aboutissant à l'hydrolyse de l'urée en ammoniac (NH_3) et en dioxyde de carbone (CO_2). La première étape est une dégradation enzymatique de l'urée en ammoniac (NH_3) et

carbamate (NH_2COOH), ce dernier est ensuite spontanément hydrolysé formant une deuxième molécule d'ammoniac (NH_3), et du dioxyde de carbone (CO_2) (Schéma 3) (Taha.M, 2017).

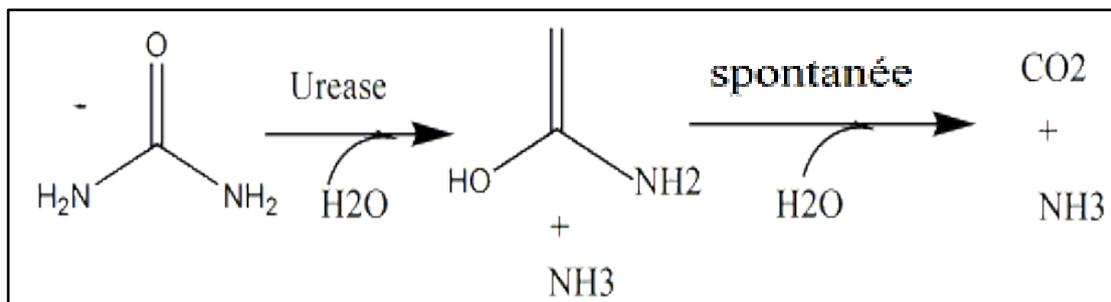


Schéma 3: Action de l'uréase sur l'urée (Amutul.Z et al., 2002).

Toutes les uréases possèdent une caractéristique commune qui est la présence de deux atomes de nickel dans le site actif qui jouent un rôle important pour son activation d'où son appellation: Métalloenzyme (Dixon et al., 1975).

Plusieurs études ont montré que les bactéries productrices d'uréase présentent un effet néfaste sur la santé humaine et sont des déterminants importants de la virulence dans la pathogénie de nombreuses affections qui touchent l'homme (Amutul.Z et al., 2002).

❖ *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori, est l'espèce dominante dans le microbiote gastrique et la responsable de multiples pathologies gastroduodénales. Cette bactérie est la principale cause de la maladie ulcéreuse, elle résiste à l'acidité gastrique grâce à la production d'uréase qui hydrolyse l'urée du liquide gastrique en ammoniac (NH_3) élevant ainsi le pH de l'estomac, l'ammoniac libéré la protège de l'environnement acide de l'estomac (Arnion, 2011), cela entrainera des infections des voies gastro-intestinales et urinaires telles que le cancer de l'estomac et l'ulcère peptique, ainsi que d'autres pathologies comme l'encéphalopathie hépatique, la lithiase urinaire, les incrustations de cathéters urinaires, la pyélonéphrite et le coma hépatique (Taha.M et al., 2017).

❖ L'ulcère gastrique

L'ulcère est une altération de la muqueuse caractérisée par des lésions qui endommagent la couche externe de l'estomac et le duodénum, ces lésions ont au moins 0.5 cm de diamètre (Kusters et al., 2006).

Il est maintenant largement reconnu que les ulcères gastriques et duodénaux sont généralement causés par l'*Helicobacter pylori* qui survit et se développe dans un milieu acide (Dunn *et al.*, 1997 ; Megraudet *al.*, 1999).

VII. 3. Principe

Le principe de cette méthode est basé sur l'inhibition de l'uréase afin d'éviter la génération d'ammoniac et par conséquent l'élévation du pH gastrique. D'ailleurs, les approches concernant l'inhibition d'uréases ont récemment attiré beaucoup d'attention dans la mesure où ils seront utilisés comme des nouveaux médicaments antiulcéreux potentiels (Amutul .Z *et al.*, 2002).

Chapitre III

*Rappels théoriques sur les
techniques spectroscopiques
d'analyses structurales
utilisées*

I. La spectroscopie

La spectroscopie est l'analyse d'une particule par un spectrophotomètre qui mesure en fonction de la longueur d'onde le rapport des valeurs d'une même grandeur photométrique relative au faisceau de rayonnement. Le faisceau de rayonnement est le type de propagation de l'énergie sous forme d'onde ou de particule (**Robert, 1996**), elle est basée sur l'étude des interactions entre la matière et un rayonnement électromagnétique. Ces interactions sont nombreuses, les plus intéressantes et les plus étudiées font appel au phénomène d'absorption, celui-ci peut être défini par sa fréquence, sa longueur d'onde et son nombre d'onde (**Chavanne et al, 1991**).

Les méthodes spectroscopiques importantes utilisées pour l'analyse qualitative et quantitative de composés organiques et inorganiques sont basées sur l'émission et l'absorption des rayonnements (**Westholler et al, 1999**), ces méthodes sont :

I.1. La spectroscopie d'absorption Ultra Violette Visible UV-Visible

Un spectre ultra-violet est une courbe, précisant les variations d'absorption d'énergie d'une substance soumise au rayonnement ultra-violet.

Le tracé de cette courbe représente en effet l'intensité de l'absorption en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence.

La région UV du spectre s'étend de 10 à 400 nm, mais l'appareil usuel ne permet le tracé des spectres que pour des longueurs d'ondes supérieures à 190 nm (**Chavanne et al, 1991**).

La production d'UV est réalisée par des lampes contenant un gaz inerte et des vapeurs de mercure. Le passage d'un courant électrique provoque l'excitation des atomes de mercure qui émettent en retour des rayons de longueur d'onde comprise entre 240-270 nm.

I.1.1. Le principe

Lorsqu'on expose les rayons UV sur une molécule, l'absorption du rayonnement électromagnétique provoque l'excitation électronique de la molécule ce qui est lié au transfert d'un électron du niveau fondamental au niveau excité, c'est-à-dire l'absorption d'énergie résulte le passage des électrons d'orbitale de faible énergie à une autre d'énergie plus élevée,

le retour des électrons de l'état excité à l'état fondamental se fait par restitution sous forme de lumière de l'énergie absorbée (Figure 20).

La structure particulière d'une molécule est liée à une absorption plus ou moins importante à chaque longueur d'onde observable (UV de 200 à 400 nm ; visible de 400 à 800 nm), ce qui peut se traduire par spectre l'établissement d'absorption.

I.1.2. Le but

La spectrométrie UV-Vis permet :

- La pureté des substances chimiques.
- La composition d'un mélange dont les composants et leurs caractéristiques sont connus.
- La structure électronique des substances inconnues (**Peifler et al, 1933**).

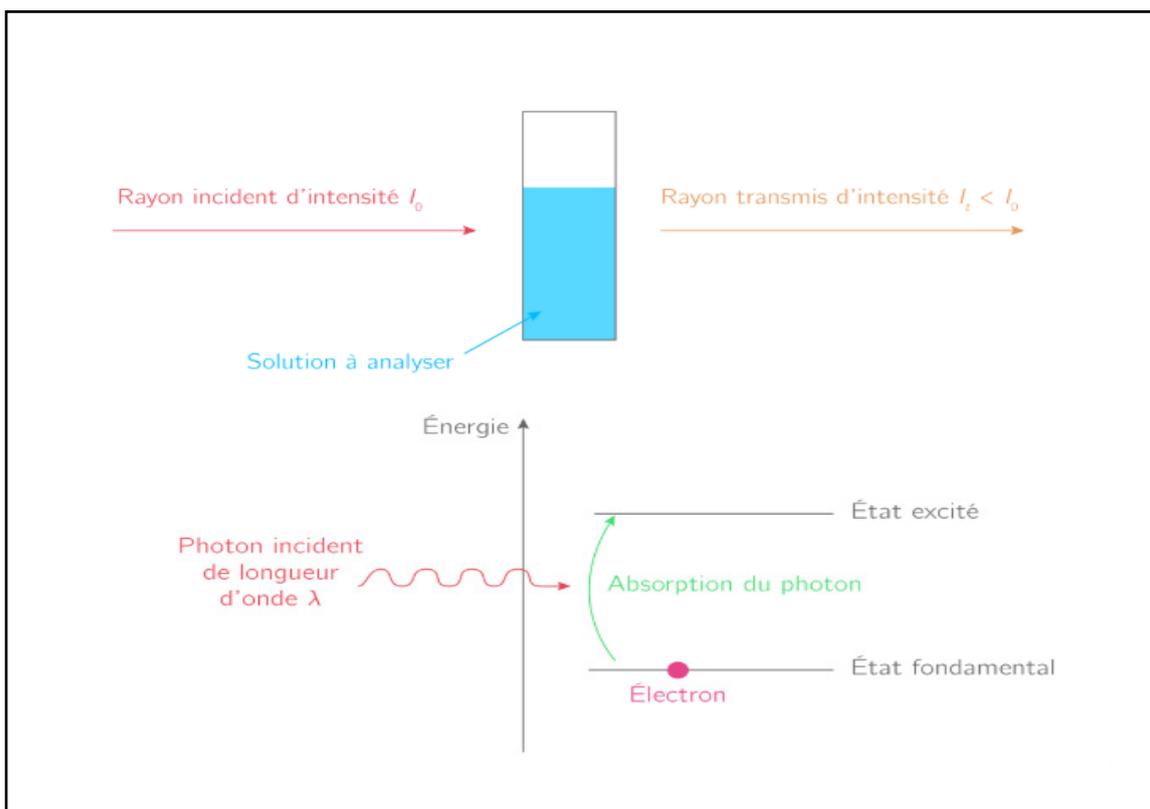


Figure 20: Principe de la spectroscopie UV-Vis.

I.2. La spectroscopie Infrarouge IR

La spectroscopie infrarouge est une méthode physique d'analyse fondée sur l'absorption des photons très énergétiques permettant de modifier l'énergie de vibration des molécules (Chial, 1991).

I.2.1. Le principe

Le rayonnement infrarouge met en vibration les atomes du corps qui l'absorbe et donc élève la température d'excitation du nuage électronique qui absorbe une partie du rayonnement polychromatique émis par la source, cette absorption varie selon les différentes longueurs d'onde pour un échantillon donné et correspond à une transition entre les différents niveaux d'énergie vibrationnelle (Figure 21).

Le rouge étant de la couleur de longueur d'onde la plus longue de la lumière visible, l'infrarouge subdivisé en IR proche, IR moyen et IR lointain.

L'IR s'étend pratiquement de $4000-600\text{ cm}^{-1}$ et certains appareils descendent jusqu'à $400-200\text{ cm}^{-1}$ et le domaine spectral est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 1: Spectre des radiations électroniques IR (Aribat, 2001).

Région	Longueur d'onde	Energie d'excitation	Type d'excitation
Infrarouge proche	0,8 – 0,2 μm	36 – 1,8 Kcal	Harmoniques des bandes de déformations.
Infrarouge	2 – 16 μm	14,3 – 1,8 Kcal	Déformations des liaisons.
Infrarouge lointain	16 – 300 μm	1,8 – 0,1 Kcal	Déformations de liaisons.

I.2.2. Le but

Les applications de l'IR sont quotidiennes dans les laboratoires de recherche qui doivent identifier les substances organiques de synthèse et donc le but de l'IR est de:

- Identifier des fonctions chimiques de la substance organique (**Bumin et al, 1992**).
- Permettre l'obtention des informations qualitatives et quantitatives sur l'échantillon étudié.
- Déterminer la présence des groupements fonctionnels dans la molécule.
- Déterminer les structures des molécules simples.

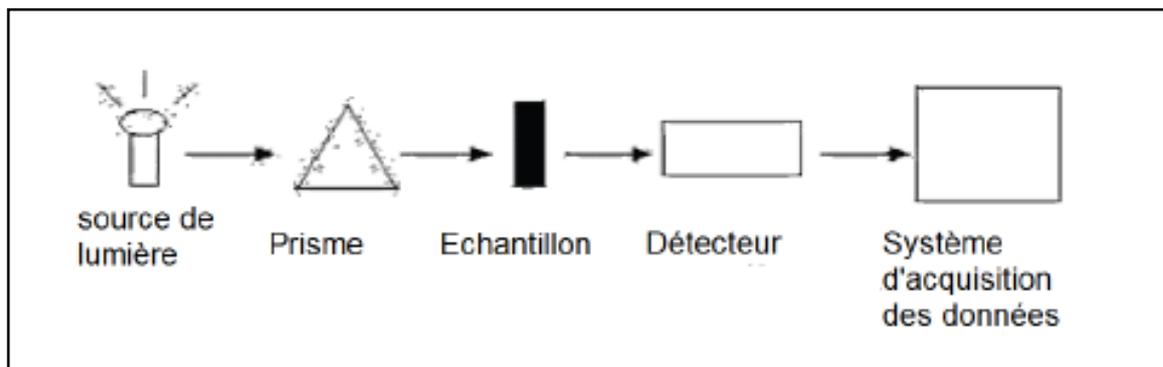


Figure 21: Dispositif de l'appareillage infrarouge (**Dar Kebira. F, 2013**).

PARTIE PRATIQUE

Chapitre I

Matériel et méthodes

La partie expérimentale du présent travail s'est déroulée au niveau du:

- Laboratoire de Physicochimie Analytique et Cristallographie des Matériaux Organométalliques et Biomoléculaires, Université Frères Mentouri Constantine 1, pour La synthèse chimique des complexes : $[\text{Ni}(\text{DHA})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, $[\text{Co}(\text{DHA})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, $[\text{Zn}(\text{DHA})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et $[\text{Mn}(\text{DHA})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.
- Et le Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine, pour les applications biologiques.

I. Matériel et consommable utilisés

I.1. Matériel

Le matériel chimique utilisé pour la réalisation de ce travail est présenté dans le tableau suivant:

Tableau 2: Matériel chimique utilisé pour la synthèse chimique.

Matière première	- Acide déhydroacétique
Précurseurs des métaux	- Le chlorure de cobalt ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) - Le chlorure de zinc ($\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - Le chlorure de nickel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) - Le chlorure de manganèse ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
Solvants	- Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) - Eau distillée (H_2O)
Réactifs	- Acétate de sodium (CH_3COONa)

Pour les activités biologiques, la liste des consommables est présentée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3: Consommables utilisés pour les activités biologiques.

Consommables	<ul style="list-style-type: none"> - Embouts bleus et jaunes. - Micropipettes de 1000 μL et 100 μL. - Eppendorfs. - Microplaques à 96 puits. - Solvants de qualité analytique.
--------------	---

II. Synthèse chimique des complexes

Les réactions de complexation sont réalisées dans l'éthanol. Après précipitation, les complexes sont isolés par filtration sous vide, puis lavés avec un peu d'eau. (les synthèses ont été réalisées en atmosphère non contrôlée et une base pour déprotoner le ligand a été ajoutée)

La réaction générale de la synthèse des complexes est représentée dans le schéma ci-dessous :

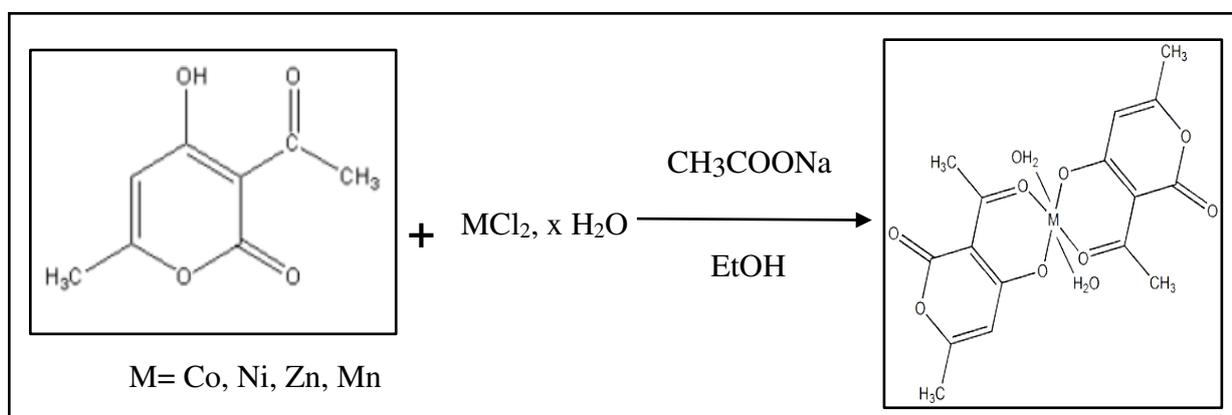


Schéma 4: Structure générale des complexes de l'acide déhydroacétique.

II.1. Mode opératoire

II.2. Synthèse générale des complexes

Les rapports stœchiométriques métal-ligand les plus fréquents sont un pour deux ou un pour un, ainsi que le temps de précipitation du produit varie d'un complexe à un autre.

Les complexes sont isolés par filtration, ensuite lavés avec un peu d'eau pour récupérer la poudre qui reste sur la paroi du papier filtre et finalement séchés puis récupérés.

II.2.1. Synthèse du complexe de nickel

Une masse de 2,512 g ; 9 mmol du DHA est dissoute dans 15 ml d'éthanol ; une solution de chlorure de nickel $\text{NiCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$, (1,6 g ; 4,5 mmol) est ajoutée, l'ensemble est laissé sous agitation magnétique, le complexe précipite après 30 min, sous forme d'une poudre verte.

II.2.2. Synthèse du complexe de cobalt

Le chlorure de cobalt hexahydraté $\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ (1,15 g ; 4,85 mmol) est dissous dans 20 mL d'éthanol. A cette solution, sont rajoutés 20 mL d'une solution d'acide déhydroacétique (1,635 g ; 9,7 mmol dans l'éthanol). Le complexe précipite après 1h 30 min d'agitation sous forme d'une poudre rose.

II.2.3. Synthèse du complexe de zinc

Ce complexe est obtenu par l'addition d'une solution d'acide déhydroacétique (1,13 g, 6,7 mmol dans 20 mL d'éthanol) à une solution du sel métallique $\text{ZnCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (0,74 g ; 3,36 mmol dans 20 mL d'éthanol), le tout est laissé sous agitation et au reflux pendant une nuit. Après refroidissement, lavage et séchage, une poudre blanche se forme, pour donner 1,38 g de complexe.

II.2.4. Synthèse du complexe de manganèse

A une quantité d'acide déhydroacétique préalablement dissoute dans l'éthanol est rajouté du chlorure de manganèse ($\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$) dissout également dans un minimum d'éthanol avec une stœchiométrie 2 : 1, la solution est laissée sous agitation pendant 8h, le complexe se dépose sous forme d'une poudre jaune (1,418 g).

Tableau 4: Données analytiques des complexes obtenus.

Composé	Couleur	Rdt %	Tf (°C)
<i>DHA</i>	Jaune	-	109-111
<i>Co(DHA)₂.2H₂O</i>	Rose	81	260
<i>Ni (DHA)₂.2H₂O</i>	Vert	72	243
<i>Zn(DHA)₂.2H₂O</i>	Blanc	91	178
<i>Mn(DHA)₂.2H₂O</i>	Jaune	43	>260

III. Méthodes physico-chimiques et d'analyses spectroscopiques

III.1. Point de fusion

Ce terme désigne le changement d'état d'un matériau quand celui-ci passe d'un état solide à un état liquide. Le point de fusion est la température exacte nécessaire à cette transformation et sa détermination est très importante puisqu'elle est hautement dépendante de la pureté du matériel testé. Cette technique est donc utilisée pour définir la qualité d'une substance (**Jensen, 2002 ; Mesplède, 2004**).

Les points de fusion ont été déterminés sur un appareil numérique banc chauffant de Banc Kofler. Il s'agit d'une plaque chauffante présentant un gradient de température, la température varie de 40°C à 260°C, sur laquelle on déplace un échantillon. La détermination du point de fusion est une donnée physique importante pour une substance.

III.2. La spectroscopie Infrarouge « IR »

Les analyses en infra-rouge ont été menées sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 1000 FT-IR à double faisceau, muni d'un système d'acquisition à transformée de Fourier, le KBr est le support utilisé pour la préparation des pastilles, les spectres sont tracés entre 450 et 4000 cm^{-1} .

III.3. La spectroscopie Ultraviolet- Visible « UV-Vis »

L'étude par absorption UV-Vis des complexes et du ligand a été conduite sur un spectrophotomètre Unicam UV-300. La cellule d'étude, en quartz, est de 1 cm d'épaisseur, le solvant adéquat pour mener cette étude est le diméthylsulfoxyde (DMSO) selon la solubilité du complexe. Les spectres électroniques sont tracés dans l'intervalle de 200 à 800 nm.

IV. Valorisation biologique

L'activité antioxydante des différents complexes synthétisés est évaluée par quatre méthodes: piégeage du radical ABTS, blanchiment du β -carotène, chélation des ions de fer et de cuivre. L'application anti-enzymatique testée est l'activité anti-uréase.

IV.1. Protocole de l'activité de piégeage du radical ABTS

L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage de l'ABTS $\bullet+$ a été déterminée selon le protocole de **Re et al, (1999)**.

Le radical ABTS $\bullet+$ est produit par réaction entre une solution aqueuse d'ABTS (19,2 mg (7 mM) ABTS + 5 mL H₂O) avec une solution de persulfate de potassium (3,3 mg (2.45 mM) (K₂S₂O₈) +5 mL H₂O), le mélange est mis à l'abri pendant 12-16h, l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par l'éthanol jusqu'à obtention d'une absorbance de $0,700 \pm 0.020$ mesurée à une longueur d'onde de 734 nm.

Une quantité de 160 μL du radical ABTS $\bullet+$ est ensuite mélangée à 40 μL de l'extrait à tester à différentes concentrations et avec cette même quantité remplacée par le méthanol pour le témoin négatif. Après incubation de 10 min dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 734 nm contre le témoin négatif, l'absorbance ainsi obtenue est comparée à celle des antioxydants de référence qui sont le BHT et le BHA à partir du pourcentage d'inhibition et de la concentration inhibitrice 50 (CI50).

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc de l'éthanol. La capacité de piégeage du radical ABTS a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{ABTS inhibition (\%)} = \frac{\text{A. Controle} - \text{A. Extrait}}{\text{A. Controle}} \times 100$$

A : Absorbance

IV.2. Protocole de l'activité de blanchiment du β -carotène

Une quantité de 0,5 mg du β -carotène est dissoute dans 1 mL de chloroforme, le mélange est ensuite mis au fond du ballon du rotavapeur avec 200 μL de Tween 40 et 25 μL d'acide linoléique. Après évaporation sous vide du chloroforme, une quantité de 50 mL d'eau oxygénée est rajoutée. L'absorbance de la solution est ajustée par de l'eau oxygénée jusqu'à obtention d'une absorbance de 0.8-0.9 nm mesurée à 470 nm.

Dans une microplaque à 96 puits, 40 μL de l'extrait à tester sont mis avec 160 μL de la solution préparée précédemment, la microplaque est mise en incubation pendant 120 min à 50 °C et la densité optique est mesurée chaque 30 min à une longueur d'onde de 470 nm. Les résultats sont comparés à ceux des antioxydants standards (BHA et BHT) (Tepe et al., 2005).

IV.3. Protocole de l'activité de chélation du fer par UV-Vis

Dans un eppendorf, 75 μL de l'extrait à tester sont mis avec 25 μL de Fe^{2+} ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 mg + 1 mL H_2O). Ensuite 400 μL du contrôle négatif (500 μL + 500 μL) sont rajoutés au mélange. Le tout est agité au Vortex puis incubé pendant 1h de temps et mesuré dans le spectrophotomètre UV-Visible en utilisant une cuve en quartz à une longueur d'onde de 200 à 900 nm (balayage) (Pietta. P-G, 2000 ; Xie.H, 2018).

IV.4. Protocole de l'activité de chélation du fer

Cette activité a été estimée par la méthode de Dinis et ses collaborateurs (1994)

Dans une microplaque à 96 puits, 40 μL de méthanol (CH_3OH) sont mis avec 40 μL des extraits et avec une même quantité de chlorure de fer (0,2 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] + 100 mL (H_2O)), ensuite une prise de 80 μL de ferrozine est rajoutée (0,5 mL ferrozine + 9,5 mL (H_2O)). Le mélange est incubé pendant 10 min et l'absorbance est mesurée à 562 nm. Le contrôle se compose du même mélange tout en remplaçant l'extrait à tester par le méthanol. Les résultats obtenus sont comparés à ceux de l'antioxydant de référence (EDTA).

Les résultats ont été donnés en pourcentage d'inhibition et l'activité a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{ABTS inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

A : absorbance

IV.5. Protocole de l'activité de chélation du cuivre

Un volume de 40 μL de l'extrait à différentes concentrations est mis dans une microplaque à 96 puits, avec 140 μL de la solution tampon (pH=6) (1.148 mL d'acide acétique (CH_3COOH) + 200 mL H_2O avec 1.64 g d'acétate de sodium ($(\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2)$ + 200 mL H_2O), une prise de 10 μL de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) (12,5 mg dans 10 mL de solution tampon (pH=6)) est ajoutée. Après incubation de 30 min, 10 μL de pyrocatechol violet (15,4 mg dans 10 mL tampon) sont rajoutés au mélange et après une deuxième incubation de 30 min l'absorbance est mesurée à 632 nm (**Sánchez-Vioque.R, 2013**).

IV.6. Protocole de l'activité anti-uréase

Dans une microplaque à 96 puits, une prise de 10 μL de l'extrait est mise avec 25 μL de l'uréase (1 mg d'enzyme dans 1 mL de la solution tampon (pH=8,2)), ensuite 50 μL du substrat (l'urée) sont rajoutés (0,2553 g Urée dans 25 mL tampon (pH=8,2)), après incubation de 15 min, 45 μL du réactif de phénol (2 g de phénol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) dans 25 mL H_2O + 25 mg $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}], 2\text{H}_2\text{O}$ dans 25 mL H_2O) sont rajoutés au mélange avec 70 μL du réactif basique (0,7125 g de NaOH dans 25 mL H_2O + 1,175 mL NaOCl, (liquide) dans 25 mL H_2O). Après une deuxième incubation de 50 min, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 630 nm contre un contrôle négatif qui se compose des mêmes réactifs cités précédemment tout en remplaçant la quantité de l'extrait par la même quantité en méthanol. Les résultats obtenus sont comparés à ceux de l'inhibiteur de référence qui est la thiourée ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$) (**Taha.M et al., 2018**).

Chapitre II

Résultats et discussion

I. Résultats de la synthèse chimique et analyses spectrales

I.1. Propriétés physico-chimiques des complexes synthétisés

Tous les complexes synthétisés sont des solides qui se présentent sous forme de poudres colorées. Dans la plupart des cas, ils sont faiblement solubles dans les solvants organiques comme l'éthanol, le méthanol, ainsi que le dichlorométhane à température ambiante. Ils précipitent même à froid. En revanche, ils sont solubles dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le DMF. De plus, ils sont insolubles dans le benzène et le toluène. Le rendement, le point de fusion et la couleur de chaque complexe synthétisé sont répertoriés dans le tableau 5.

Tableau 5: Caractéristiques physico-chimiques des complexes organométalliques synthétisés.

Composé	Couleur	Rendement%	T _f (°C)
<i>Co(DHA) 2.2H₂O</i>	Rose	81	260
<i>Ni (DHA) 2.2H₂O</i>	Vert	72	243
<i>Zn(DHA) 2.2H₂O</i>	Blanc	91	178
<i>Mn(DHA) 2.2H₂O</i>	Jaune	43	> 260

I.2. Analyse spectrale des complexes synthétisés

I.2.1. Analyse infra-rouge « IR »

D'après les spectres IR des différents complexes obtenus, une sélection des principales bandes de vibration des différents groupements fonctionnels chromophores au sein des composés synthétisés a été réalisée et discutée.

❖ Complexe DHA-Ni

La bande intense à 1300 cm⁻¹ est attribuée à la vibration du groupement C-O (OH). La bande d'absorption apparaissant à 2300 cm⁻¹ est attribuée au groupement CH₃. Tandis que celles des fonctions C=O (acétyle) et C=O (lactone) sont au voisinage de 1583 cm⁻¹ et 1667

cm^{-1} respectivement. Ainsi, la fréquence 600 cm^{-1} correspond au coordat M-O ce qui indique la présence d'un complexe métallique et que le ligand s'est bien chélaté au métal. La bande apparaissant à 3250 cm^{-1} correspond aux molécules d'eau.

Tableau 6: Données spectrales du complexe DHA-Ni par analyse IR.

Fonction	Bande d'absorption (cm^{-1})
C-O (OH)	1300
CH ₃	2300
C=O acétyle	1583
C=O lactone	1667
M-O	600
H ₂ O	3250

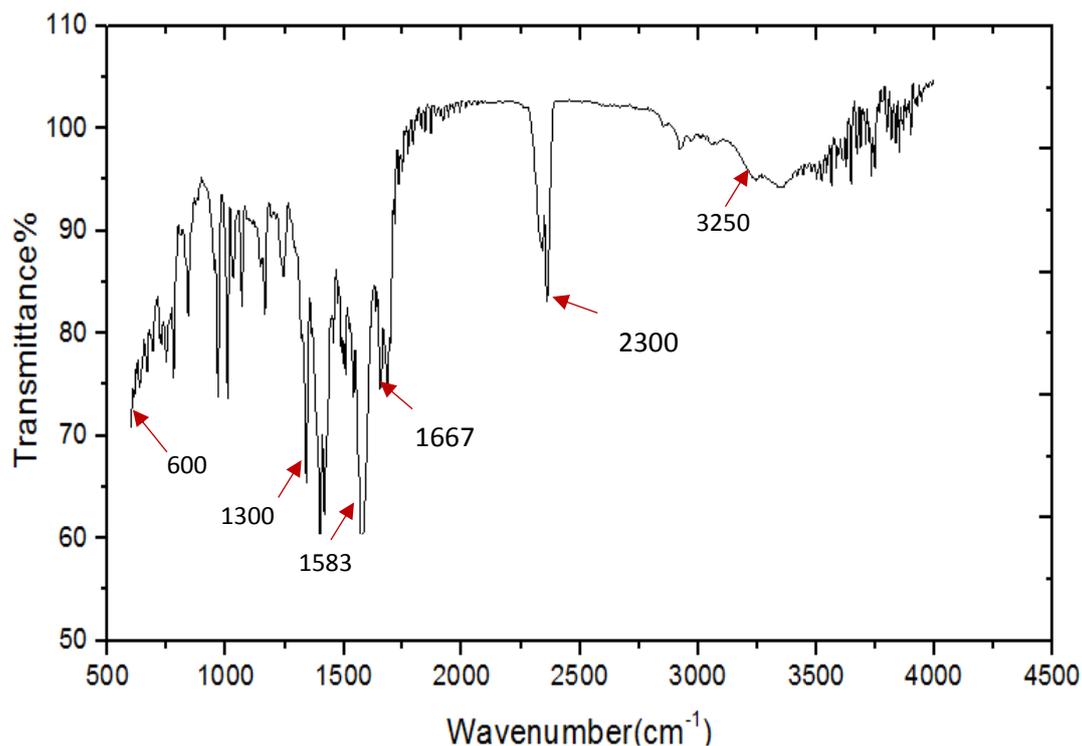


Figure 22: Spectre IR du complexe DHA-Ni.

❖ Complexe DHA-Co

Les principales fonctions de ce complexe sont la fonction C-O (OH) avec une bande d'absorption intense à 1333 cm^{-1} . Une bande apparaissant à 2300 cm^{-1} est attribuée à la fonction CH₃. Une bande observée vers 1625 cm^{-1} est attribuée à la vibration de la fonction

C=O (acétyle), ainsi la fonction C=O (lactone) correspond à la bande d'absorption 1670 cm^{-1} . Une bande d'absorption est observée vers 595 cm^{-1} qui caractérise la liaison métal-oxygène, ce qui indique qu'il s'agit bien d'un complexe métallique. Enfin une bande faible à 3250 cm^{-1} correspond aux molécules H_2O .

Tableau 7 : Données spectrales du complexe DHA-Co par analyse IR.

Fonction	Bande d'absorption (cm^{-1})
C-O (OH)	1333
CH_3	2300
C=O acétyle	1625
C=O lactone	1670
M-O	595
H_2O	3250

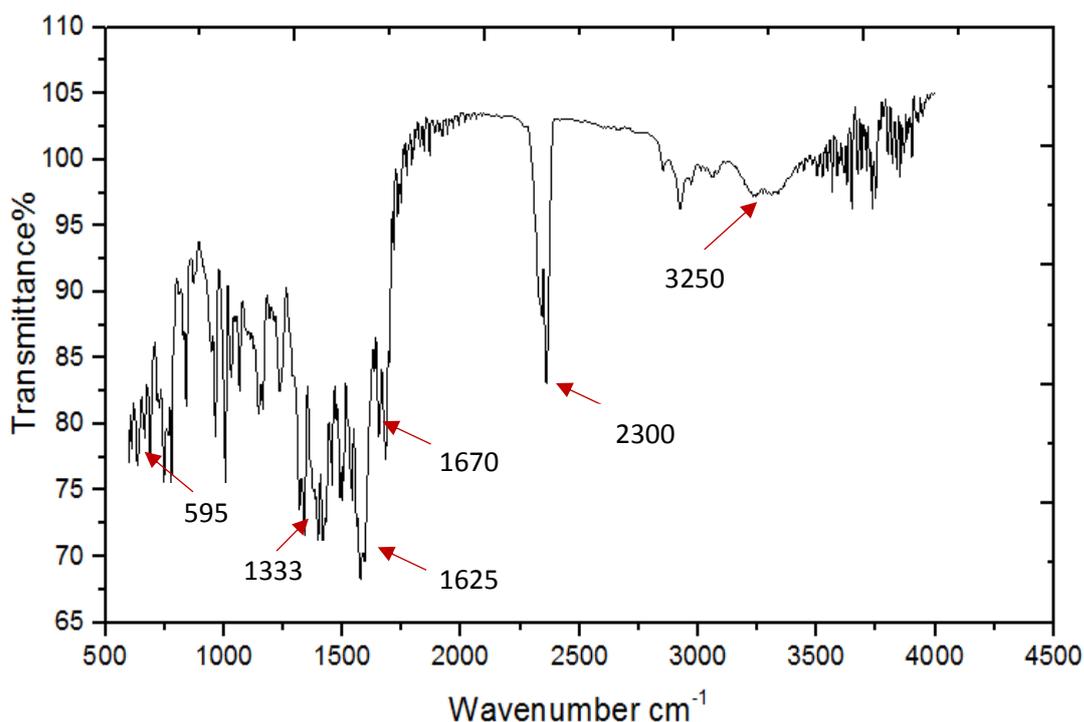


Figure 23: Spectre IR du complexe DHA-Co.

❖ Complexe DHA-Zn

Le spectre IR de ce complexe comprend une bande d'absorption forte et fine vers 1335 cm^{-1} attribuée à la fonction C-O (OH). Une bande apparaissant à 2300 cm^{-1} est attribuée à la

fonction CH_3 . Les bandes des groupements C=O acétyle et lactone apparaissent respectivement à 1575 cm^{-1} et 1670 cm^{-1} . Une large bande d'intensité faible vers 3300 cm^{-1} correspond aux molécules H_2O . Ainsi qu'une bande d'absorption caractéristique de la liaison métal-oxygène à 620 cm^{-1} .

Tableau 8: Données spectrales du complexe DHA-Zn par analyse IR.

Fonction	Bande d'absorption (cm^{-1})
C-O (OH)	1335
CH_3	2300
C=O acétyle	1575
C=O lactone	1670
M-O	620
H_2O	3300

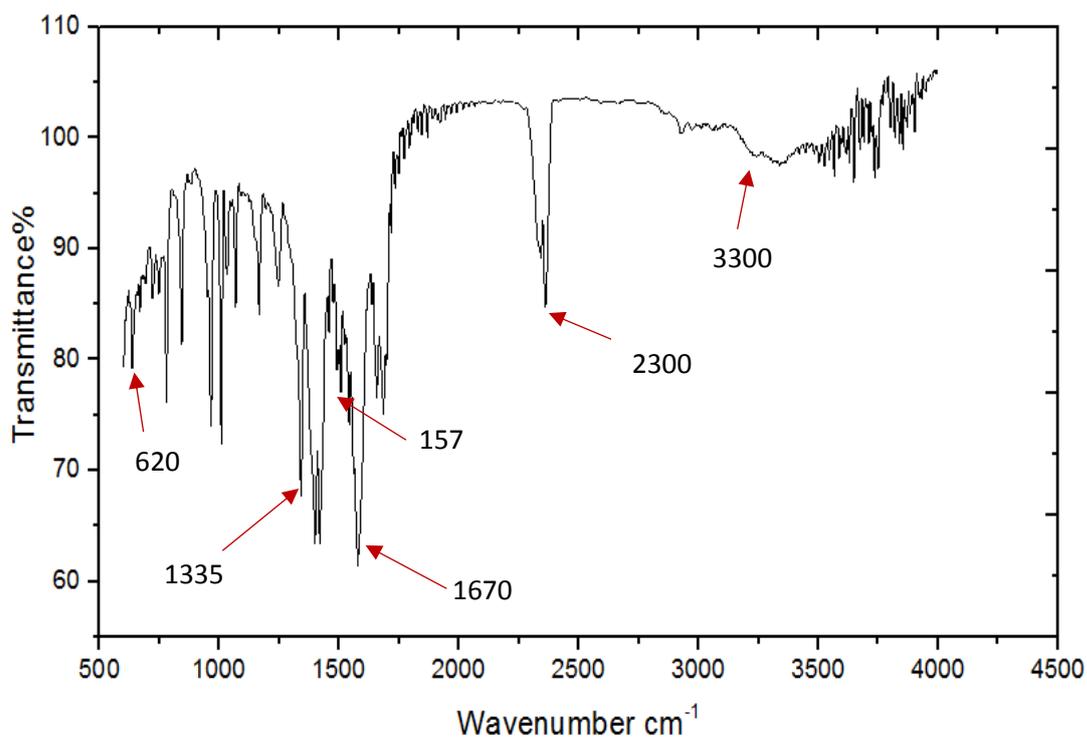


Figure 24: Spectre IR du complexe DHA-Zn.

❖ Complexe DHA-Mn

L'analyse du spectre IR de ce composé montre la présence d'une bande d'absorption vers 1341 cm^{-1} correspondant à la fonction C-O (OH). Une autre bande vers 1597 cm^{-1} qui indique la présence d'un C=O (acétyle) ainsi que la liaison C=O (lactone) vers 1693 cm^{-1} . Une faible et fine bande vers 575 cm^{-1} indiquant la présence de la liaison métal-oxygène, et une bande d'absorption forte et large correspond aux molécules d'eau.

Tableau 9: Données spectrales du complexe DHA-Mn par analyse IR.

fonction	Bande d'absorption (cm^{-1})
C-O (OH)	1341
C=O acétyle	1597
C=O lactone	1693
M-O	575
H ₂ O	3341

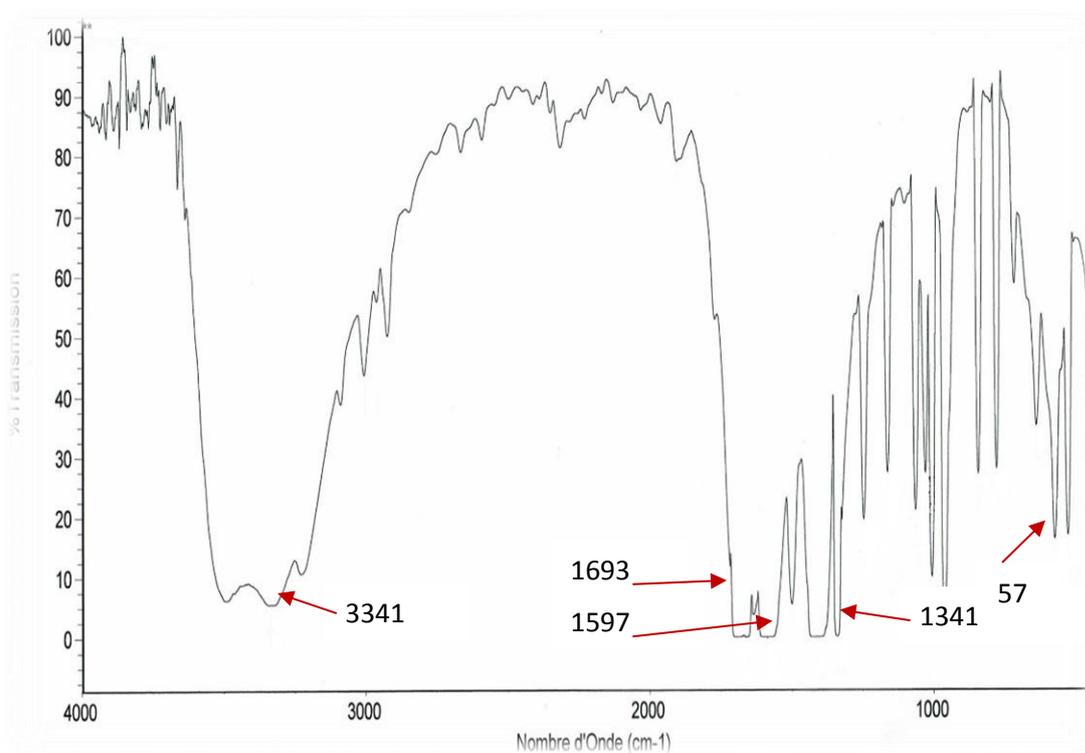


Figure 25: Spectre IR du complexe DHA-Mn.

I.2.2. Analyse par UV-Vis

Le dépouillement des spectres de l'étude spectrale par absorption UV-Vis des complexes métalliques du DHA (figures 26 et 27) est consigné dans le tableau 10.

Tableau 10: Données spectrales des complexes organométalliques par analyse UV-Vis.

	DHA-Ni	DHA-Co	DHA-Zn	DHA-Mn
λ (nm)	253	251	251	313
	264	267	267	263
	296	296	285	252

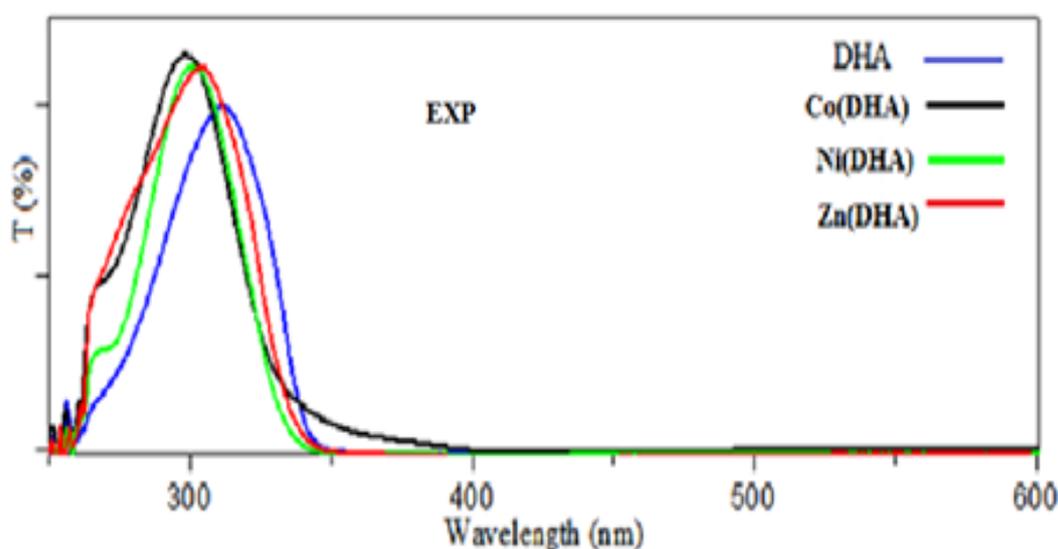


Figure 26: Spectres d'absorption UV-Vis du DHA et ses complexes de Co, Ni et Zn.

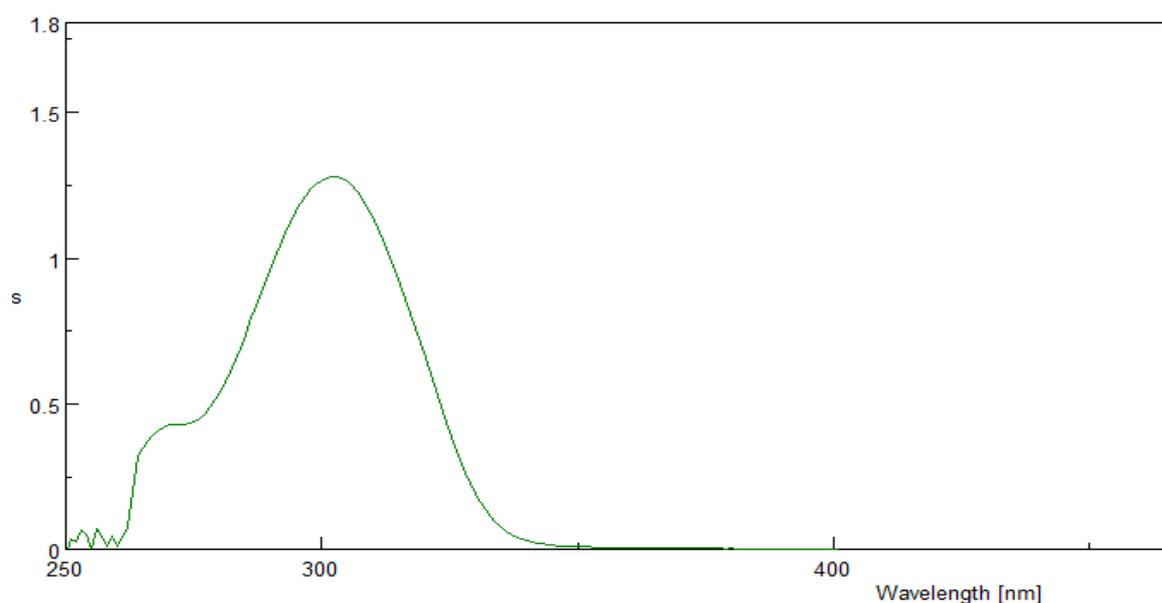


Figure 27: Spectre d'absorption UV-Vis du complexe DHA-Mn.

Les spectres obtenus se caractérisent par :

- Une bande d'absorption dans l'intervalle 251 nm et 267 nm commune entre les quatre complexes organométalliques et associée aux fonctions aldéhyde (dûe à la conformation tautomérique) et cétone respectivement.
- Un effet bathochrome des complexes par rapport au DHA seul est observé entre 285 nm et 313 nm.
- Une autre bande est légèrement observée du fait de la concentration des échantillons à environ 480 dûe à la transition électronique d-d caractéristique de la formation de liaisons de coordination métal-ligand expliquée par un transfert de charge donneur-accepteur selon la charge du métal (2+ dans les complexes étudiés) et son environnement.

II. Résultats et discussion des activités biologiques *in vitro*

La nouvelle série de complexes de métaux de transition et de DHA synthétisée dans ce travail, a fait l'objet d'un criblage biologique *in vitro* pour pas moins de 20 tests incluant 15 activités antioxydantes et 05 activités enzymatiques; selon les résultats obtenus seulement six d'entre elles ont été retenues: cinq pour l'activité antioxydante et une activité enzymatique, ce sont en outre les activités ayant démontrées un résultat positif pour au moins un des complexes synthétisés.

II.1. Activités antioxydantes

Tous les tests sont réalisés *in vitro* sur le DHA et ses chélates de métaux de transition, à une gamme de concentration allant de 12,5 à 800 µg.

II.1.1. Activité de piégeage du radical ABTS

- Les résultats de ce test ont été consignés dans le tableau 11 :

Tableau 11: Résultats de l'activité de piégeage du radical ABTS.

Extracts	% Inhibition in ABTS assay							
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC ₅₀ µg/mL
DHA	NA	NA	NA	NA	NA	1,04±2,23	2,78±2,01	>800
DHA-Ni	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	>800
DHA-Co	NA	NA	NA	0,99±0,17	3,16±2,34	15,14±3,72	25,38±1,95	>800
DHA-Zn	NA	NA	NA	0,85±0,08	2,25±2,47	3,65±1,09	33,35±2,25	>800
DHA-Mn	NA	NA	2,01±1,77	22,63±1,83	44,76±3,28	70,85±0,19	81,83±3,00	258,36±4,62
BHT	69.21±0,40	78.23±1,34	88.12±1,28	88,76±3,07	90.85±1,74	90.95±0,51	96.68±0,39	1.29±0.30
BHA	92.83±1,42	94.68±0,42	94.95±0,90	95.32±0,25	95.59±0,47	95.83±0,15	95,86±0,10	1.81±0.10

- L'activité inhibitrice du DHA commence à une concentration de 400 µg, avec un pourcentage d'inhibition très faible estimé à 1,04 %, avec une CI₅₀ supérieure à 800 µg/mL,
- Le complexe DHA-Ni n'a montré quant à lui aucune activité inhibitrice dans la gamme de dilution étudiée.
- Les complexes DHA-Co et DHA-Zn ont montré une activité inhibitrice très faible et comparable qui commence à partir d'une concentration d'inhibition de 100 µg, elle augmente légèrement avec l'augmentation des concentrations sans pour autant atteindre la CI₅₀ à la concentration limite de 800 µg.
- Il est constaté que pour cette application également le complexe DHA-Mn affiche une meilleure réactivité qui commence à 50 µg avec 2,01 % et atteint sa CI₅₀ à 258,36 µg/mL, ce qui reste tout de même assez faible par rapport à celles des standards avec 1.29 µg/mL pour le BHT et 1.81 µg/mL pour le BHA.

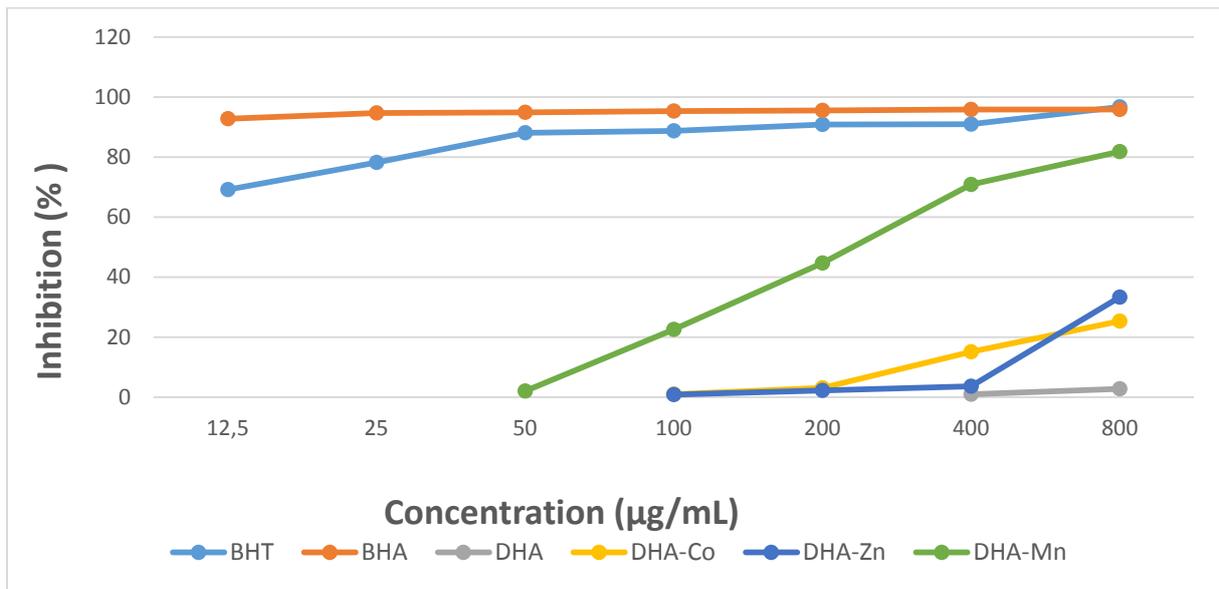


Figure 28 : Courbes des pourcentages d’inhibition de l’activité de piégeage du radical ABTS.

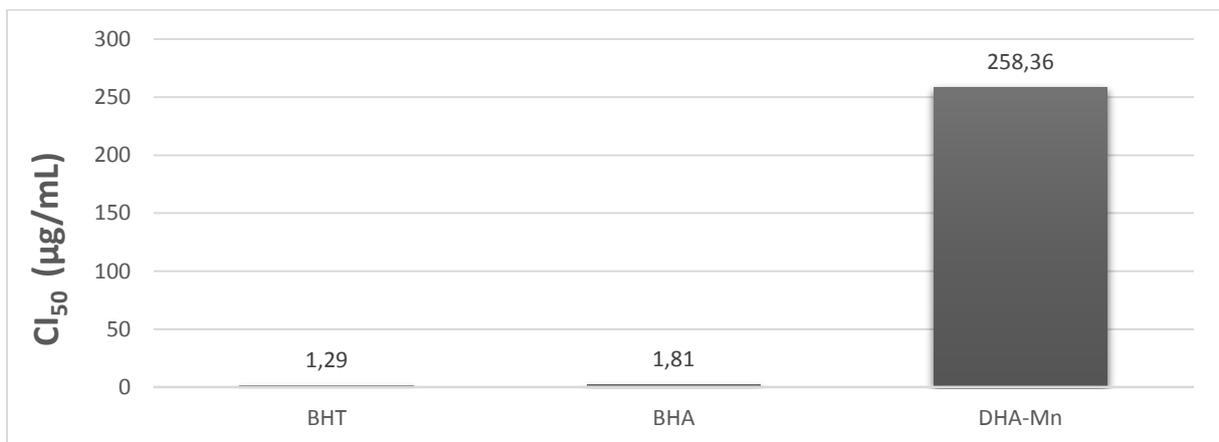


Figure 29 : Valeurs des CI₅₀ exprimées en µg /mL pour l’activité de piégeage du radical ABTS.

II.1.2. Activité de blanchiment du β-carotène

- Les résultats de ce test sont reportés dans le tableau 12 :

Tableau 12: Résultats de l'activité de blanchiment du β -carotène.

	12.5 μ g	25 μ g	50 μ g	100 μ g	200 μ g	400 μ g	800 μ g	IC ₅₀ μ g/mL
DHA	NA	22,16 \pm 4,19	35,03 \pm 4,19	65,27 \pm 2,86	65,88 \pm 2,36	73,72 \pm 2,69	79,65 \pm 3,38	77,07 \pm 2,14
DHA-Ni	18,46 \pm 1,54	29,37 \pm 3,32	29,65 \pm 2,75	35,43 \pm 4,11	49,47 \pm 4,49	61,73 \pm 2,63	62,92 \pm 2,38	220,87 \pm 6,07
DHA-Co	NA							
DHA-Zn	NA	NA	30,29 \pm 2,11	36,08 \pm 1,25	52,29 \pm 0,42	Sat	Sat	185,72 \pm 3,19
DHA-Mn	40,90 \pm 1,16	52,06 \pm 0,81	53,02 \pm 1,83	54,11 \pm 3,01	71,39 \pm 0,18	88,94 \pm 2,87	91,11 \pm 0,79	22,69 \pm 0,86
BHT^b	88,29 \pm 0,10	91,70 \pm 0,36	93,65 \pm 0,30	93,68 \pm 0,46	94,49 \pm 0,07	94,88 \pm 0,10	95,58 \pm 0,19	0,91 \pm 0,01
BHA^b	93,48 \pm 0,44	95,52 \pm 0,33	96,34 \pm 0,55	97,56 \pm 0,19	97,64 \pm 2,22	97,85 \pm 0,32	99,66 \pm 0,52	1,05 \pm 0,03

- L'activité inhibitrice du DHA commence à une concentration de 25 μ g avec un pourcentage d'inhibition de 22,16 %, il atteint sa CI₅₀ à 77,07 μ g/mL et plafonne à 79,65 % avec une concentration de 800 μ g.

Comparativement:

- L'activité inhibitrice du complexe DHA-Ni commence bien avant à une concentration de 12,5 μ g avec 18,46 % d'inhibition, il atteint sa CI₅₀ à 220,87 μ g/mL et ses limites à partir de 400 μ g/mL.

- Pour le complexe DHA-Co, aucune activité significative n'a été détectée.

- Quant au complexe DHA-Zn, son activité inhibitrice commence à partir de 50 μ g avec 30,29 % d'inhibition, et augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait jusqu'à atteindre sa CI₅₀ à 185,72 μ g/mL, l'activité inhibitrice plafonne à 200 μ g avec 52,29 %.

- Concernant le dernier complexe DHA-Mn, à une concentration de 12,5 μ g il commence son activité avec un pourcentage d'inhibition de 40,90 %, puis augmente avec l'augmentation de la concentration jusqu'à atteindre sa CI₅₀ à 22,69 μ g/mL. Bien que cette concentration est également supérieure aux CI₅₀ des deux standards mais reste la meilleure comparée à celle du DHA seul et chélaté aux autres métaux, l'activité inhibitrice continue d'augmenter avec des concentrations plus élevées jusqu'à atteindre 91,11 % à 800 μ g en se rapprochant le plus de celle du BHT (95,58 %) et du BHA (99,66 %).

Le traitement de ces résultats a conduit à la réalisation des courbes de comparaison illustrées dans la figure 30 et les histogrammes des CI₅₀ dans la figure 31.

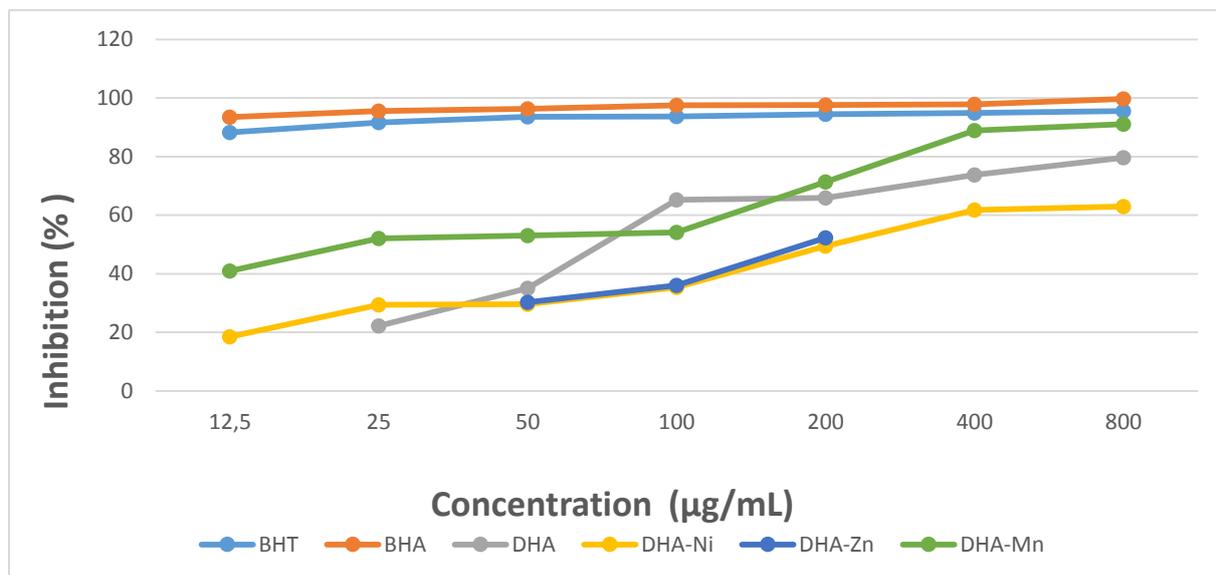


Figure 30: Courbes des pourcentages d'inhibition de l'activité de blanchiment du β-carotène.

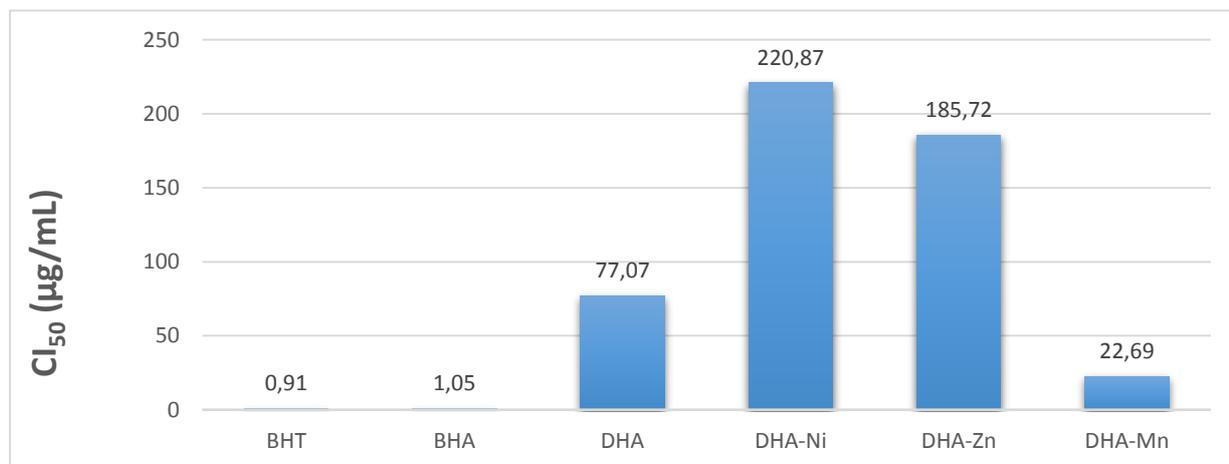


Figure 31: Valeurs des CI₅₀ exprimées en µg/mL pour l'activité de blanchiment du β-carotène.

A la lumière de ces résultats, il apparaît que :

- Tous les complexes métalliques du DHA, à l'exception du complexe de Co, ont donné de meilleurs résultats pour cette étude que la molécule mère DHA.
- La cinétique des réactions des complexes organométalliques et du DHA est lente par rapport à celles des deux standards.

- Parmi tous les composés testés, le complexe DHA-Mn est celui qui a montré la meilleure activité par rapport aux deux standards utilisés pour ce test et a donc favorisé l'effet inhibiteur contre la peroxydation lipidique (contre le blanchiment du bêta-carotène).

II.1.3. Activité de chélation du fer par UV-Vis

La figure ci-dessous montre la capacité chélatrice du fer par les complexes organométalliques synthétisé (figure 32).

Il s'agit d'un test qualitatif préliminaire qui indique le potentiel des composés étudiés à chélater le fer.

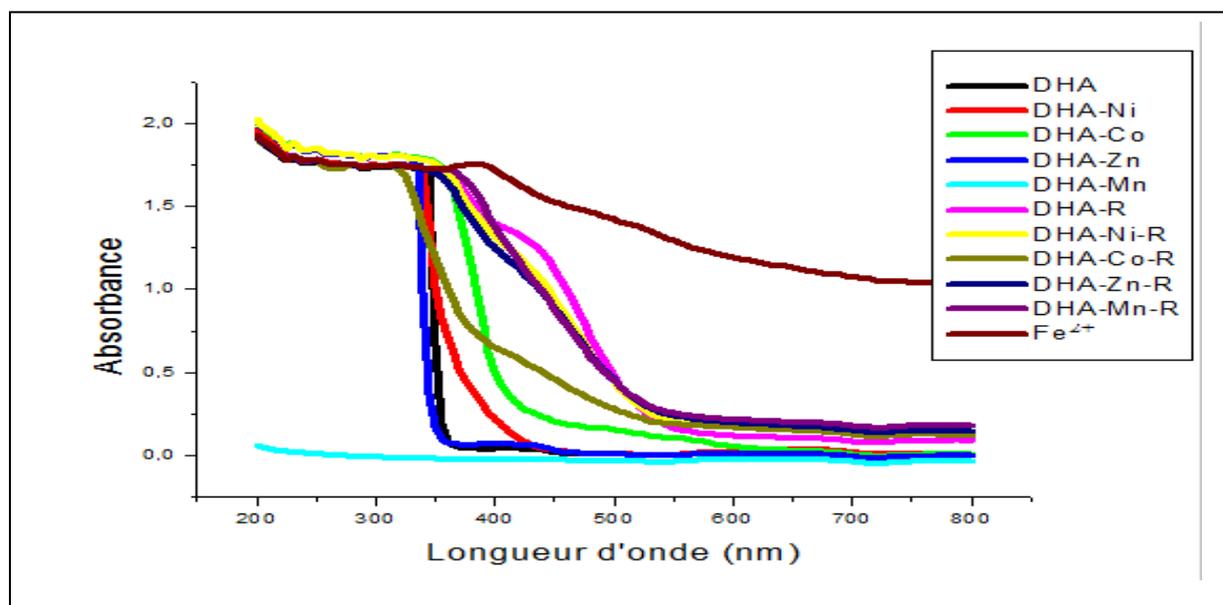


Figure 32: Résultats de l'activité chélatrice du fer par UV-Vis.

D'après les résultats, il ressort que :

- Le Fe^{2+} seul a une forte absorption vers 420 nm.
- Tous les complexes étudiés chélatés au fer (réactionnels) montrent une absorption plus ou moins intense à 450 nm, supérieure à celle des complexes libres.
- Le complexe de Co-Fe^{2+} a une absorption faible et inférieure à celle des autres complexes.

Ce test montre que le DHA et ses complexes métalliques ont potentiellement un pouvoir chélateur vis-à-vis du fer.

II.1.4. Activité de Chélation du fer

Le calcul de la capacité des extraits à la chélation des métaux de fer a été évalué par rapport aux valeurs de la concentration d'inhibition du standard EDTA.

Le tableau 13 montre les effets de la chélation des ions ferreux sur les extraits, par rapport à l'EDTA, utilisé comme standard de référence.

Tableau 13: Résultats de l'activité de chélation des ions de fer.

Extracts	% Inhibition in Ferrous ions Chelating assay							
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC ₅₀ µg/mL
DHA	NA	NA	NA	NA	20,87±2,7 8	35,30±4,5 6	36,96±0,0 0	>800
DHA-Ni	28,60±4,56	67,71±4,13	74,92±1,7 4	79,56±1,13	Sat	Sat	Sat	14,53±9,02
DHA-Co	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
DHA-Zn	NA	NA	NA	NA	NA	21,39±5,0 1	25,34±4,9 6	>800
DHA-Mn	NA	NA	NA	NA	NA	NA	12,89±0,7 6	>800
EDTA	73.00±1.59	73.60±1.20	73,80±1.5 1	95,78±0.10	95,80±0.0 6	95,84±0.2 2	95,87±0.0 6	8.80±0.47

- D'après les résultats, le DHA commence son activité antioxydante à une concentration de 200 µg avec un pourcentage d'inhibition de 20,87 % qui stagne pratiquement avec l'augmentation de la concentration, ainsi sa CI₅₀ est supérieure à 800 µg/mL,
- Le complexe DHA-Co quant à lui n'a montré aucune activité, ce qui montre que ce dernier ne possède aucune activité chélatrice du fer.
- De même pour le complexe DHA-Zn qui commence son activité à partir de 400 µg avec un pourcentage d'inhibition de 21,39 %, et une IC₅₀ supérieure à 800 µg/mL.
- Le complexe du DHA-Mn, son activité débute à partir de la concentration de 800 µg avec un pourcentage d'inhibition de 12,89 %, et une CI₅₀ supérieure à 800 µg/mL.

- Par contre, le complexe DHA-Ni, affiche un début d'activité chélatrice à une concentration de 12,5 µg avec un pourcentage d'inhibition de 28,60 % et atteint sa CI₅₀ à 14,53 µg/mL, cette valeur est proche de celle du standard EDTA estimée à 8,80 µg/mL en plus d'être la meilleure parmi celles de tous les autres composés testés.

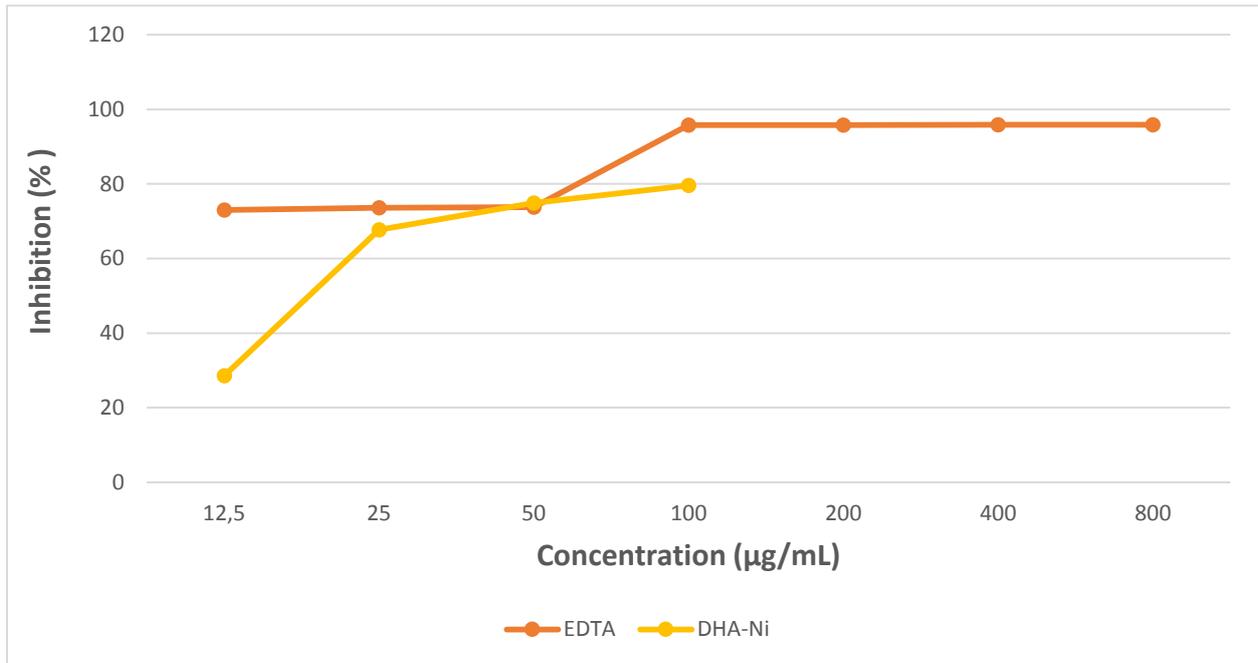


Figure 33: Courbes des pourcentages d'inhibition de l'activité de chélation du fer.

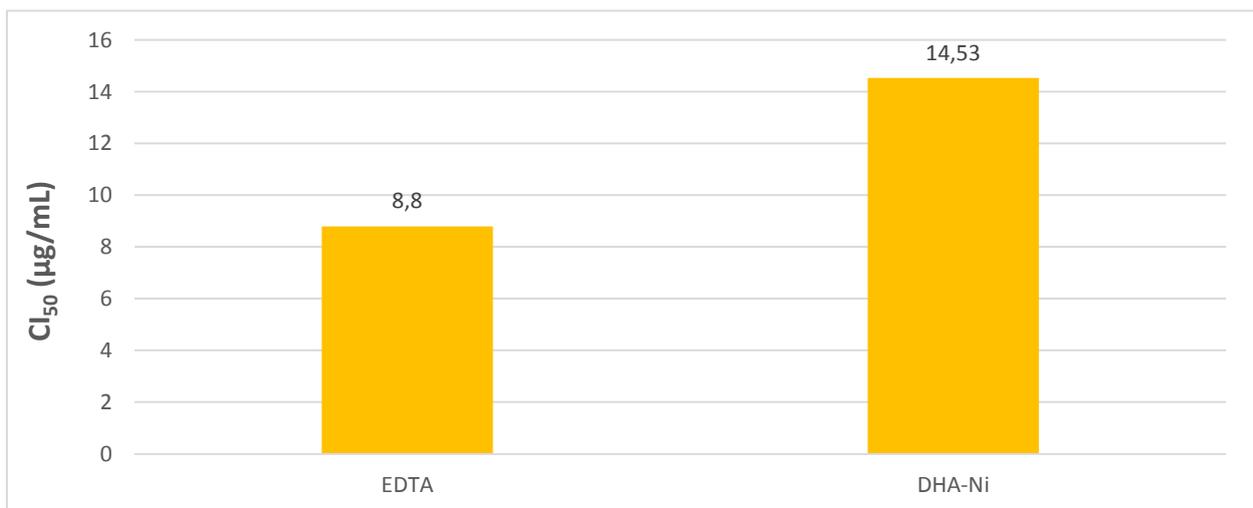


Figure 34: Valeurs des CI₅₀ exprimées en µg/mL pour l'activité de chélation du fer.

II.1.5. Activité de chélation du cuivre

Le calcul de la capacité des extraits à la chélation des métaux de cuivre a été évalué par rapport aux valeurs de la concentration d'inhibition du standard EDTA.

Le tableau 14 montre les effets de chélation des ions de cuivre sur les extraits, par rapport à l'EDTA utilisé comme standard de référence.

Tableau 14: Résultats de l'activité de chélation du cuivre.

Extracts	% Inhibition in Copper (CCA) chelating assay							
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC ₅₀ µg/mL
DHA	NA	NA	11,86±1,4 7	46,79±1,04	78,28±3,0 1	88,39±0,4 5	91,47±0,8 1	129,07±5,9 3
DHA-Ni	NA	NA	NA	41,09±1,00	61,17±0,0 0	75,96±3,0 8	85,32±0,8 0	179,83±6,7 4
DHA-Co	NA	22.98±2.17	32.27±2.9 7	39,29±1,19	58,22±1,8 5	85,01±2,0 1	86,50±1,2 3	158,11±6,9 5
DHA-Zn	NA	NA	24,60±0,0 0	34,52±0,31	51,65±4,3 6	90,17±2,3 9	Sat	138,38±0,6 4
DHA-Mn	NA	NA	26,53±1,4 2	48,79±3,04	67,17±2,6 9	80,38±0,1 9	80,96±2,9 0	106,36±3,8 8
EDTA	4.03±1.83	17.45±2.52	42.68±2.9 2	74.61±1.8 1	89.42±1.2 6	90.91±0.5 5	90.94±0.5 7	59.04±0.56

L'activité de chélation du cuivre augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits.

- L'activité inhibitrice du DHA commence à 50 µg avec un pourcentage d'inhibition de 11,86 %, il atteint sa CI₅₀ à 129,07 µg/mL et commence à atteindre ses limites d'inhibition à partir de 400 µg.
- Le DHA-Ni quant à lui, débute son activité à 100 µg avec un pourcentage d'inhibition de 41,09 %, il atteint sa CI₅₀ à 179,83 µg/mL ce qui est plus faible que l'activité du DHA seul.
- L'activité du complexe DHA-Co commence bien avant à une concentration de 25 µg avec un pourcentage d'inhibition de 22,98 %, il arrive à sa CI₅₀ à 158,11 µg/mL, et son activité plafonne à 86,50 % à une concentration de 800 µg.
- Concernant le DHA-Zn, son activité inhibitrice débute à 50 µg avec un pourcentage d'inhibition de 24,60 %, augmente avec des concentrations plus élevées jusqu'à atteindre sa

CI₅₀ à 138,38 µg/mL et plafonne à une concentration de 400 µg avec un pourcentage d'inhibition de 90.91%.

- Enfin, le complexe du DHA-Mn montre la meilleure activité inhibitrice par rapport aux autres complexes avec une CI₅₀ de 106,36 µg/mL, mais qui reste cependant loin de celle du standard estimée à 59,04 µg/mL.

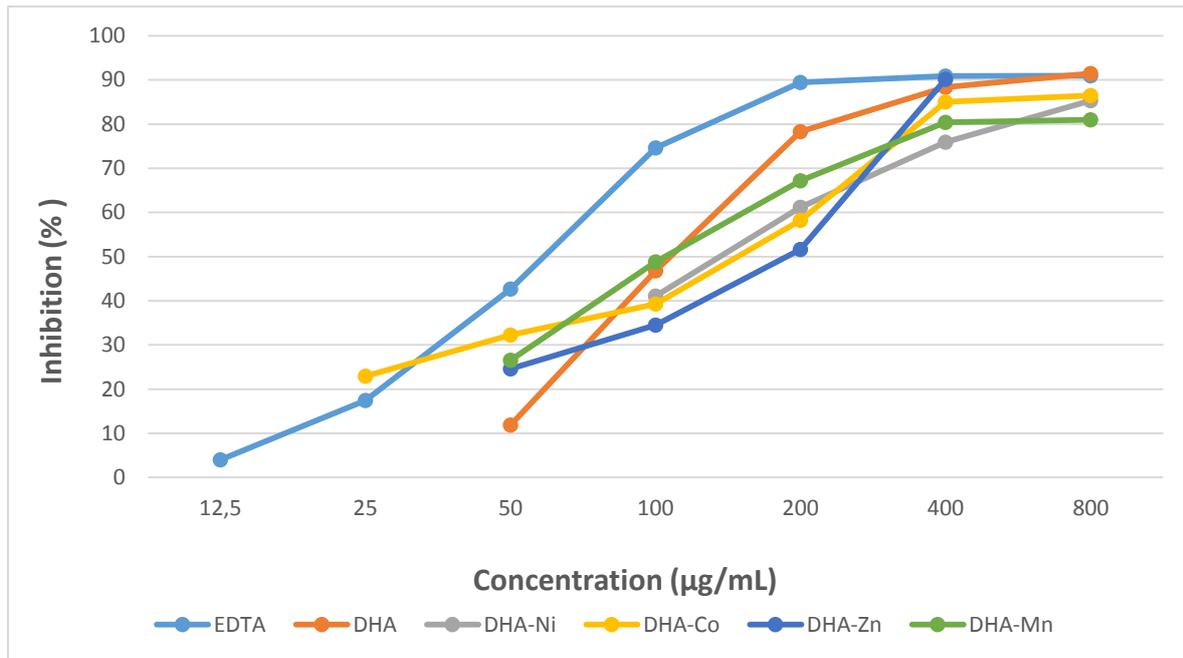


Figure 35: Courbes des pourcentages d'inhibition de l'activité de chélation du cuivre.

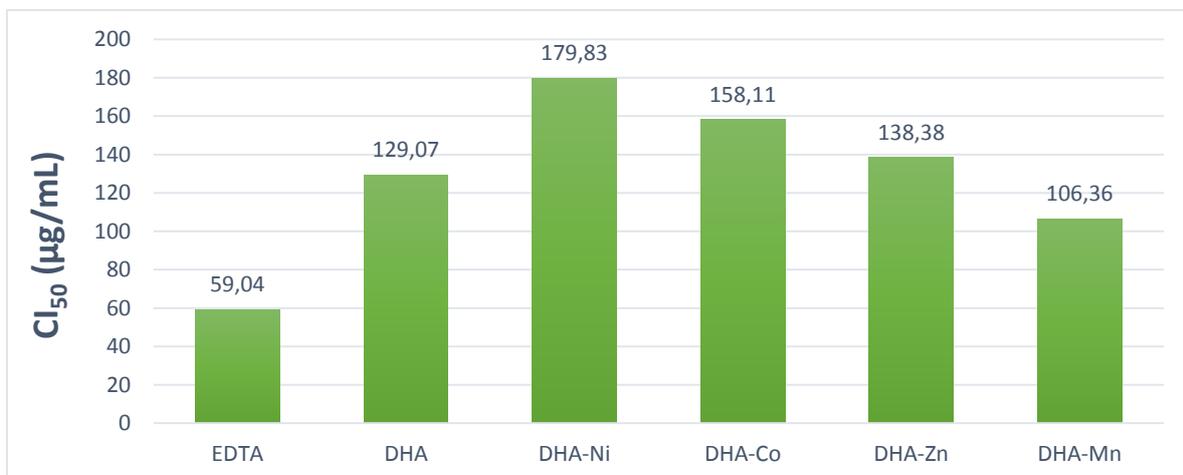


Figure 36: Valeurs des CI₅₀ exprimées en µg/mL pour l'activité de chélation du cuivre.

Il en résulte que tous les composés testés possèdent une activité antioxydante en chélatant l'ion de cuivre, mais le complexe DHA-Mn est celui qui a montré la meilleure activité relativement.

II.2. Activité enzymatique

Tous les tests sont réalisés *in vitro* sur le DHA et ses chélates de métaux de transition, à une gamme de concentration allant de 3,125 à 200 µg.

II.2.1. Activité inhibitrice de l'uréase

Les résultats de la capacité du DHA ainsi que ces complexes de métaux de transition à inhiber l'uréase sont représentés dans le tableau 15 avec la thiourée comme standard.

Tableau 15: Résultats de l'activité inhibitrice de l'uréase.

Extracts	% Inhibition							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µ g	200 µg	IC ₅₀ µg/mL
DHA	NA	6,94±2,96	10,68±2,08	18,27±1,48	26,44±0,82	27,98±3,69	41,67±0,98	>200
DHA-Ni	NA	22,46±1,66	62,47±1,98	76,30±6,26	89,26±2,58	93,37±0,75	94,20±0,45	10,38±0,28
DHA-Co	5,87±3,62	12,01±0,13	66,31±0,02	80,53±1,40	86,24±0,57	89,15±0,71	91,07±0,67	10,62±0,01
DHA-Zn	30,13±4,51	39,29±2,87	62,25±1,71	82,30±0,85	85,29±1,51	86,85±0,97	Sat	9,42±0,66
DHA-Mn	17,64±0,40	40,66±1,18	70,97±3,76	78,76±3,28	81,91±2,12	Sat	Sat	8,20±0,39
Thiourea	4,49±0,78	19,85±2,74	55,64±4,24	94,17±0,15	98,42±0,19	98,49±0,41	98,90±0,05	11.57±0.68

- L'activité inhibitrice de l'uréase par le DHA seul commence à de faibles concentrations de l'ordre de 6,25 µg avec un pourcentage d'inhibition de 6,94 % puis augmente de manière très faible avec l'augmentation de la concentration, ainsi sa CI₅₀ est supérieure à 200 µg/mL.

- Pour le complexe DHA-Ni, son activité débute également à 6,25 µg avec un pourcentage d'inhibition de 22,46 %, puis atteint sa CI₅₀ à 10,38 µg/mL qui est comparable à

celle du standard utilisée (la thiourée) estimée à 11.57 $\mu\text{g/mL}$, ensuite, son activité plafonne à 200 μg avec un pourcentage d'inhibition de 94,20 %.

- Concernant le complexe DHA-Co, son activité commence à une concentration plus faible encore de 3.125 μg avec un pourcentage d'inhibition de 5, 87 %, puis atteint sa CI_{50} à 10,62 $\mu\text{g/mL}$ et à 200 μg son activité est maximale 91,07 % se rapprochant ainsi de la thiourée.

- Quant au complexe DHA-Zn, il présente un pourcentage d'inhibition de 30,13 % largement supérieure à celui du standard à une concentration de 3,125 μg , indiquant une cinétique très rapide, et augmente avec l'augmentation de la concentration jusqu'à atteindre sa CI_{50} à 9,42 $\mu\text{g/mL}$ ce qui est inférieur à la thiourée ainsi que les complexes cités précédemment.

- Le meilleur résultat est obtenu avec le complexe DHA-Mn qui commence également à 3,125 μg avec un pourcentage d'inhibition de 17, 64 %, puis cette activité atteint sa CI_{50} à 8,20 $\mu\text{g/mL}$, le pourcentage d'inhibition plafonne à 50 μg avec une valeur de 81,91 % qui est proche de celle de la thiourée.

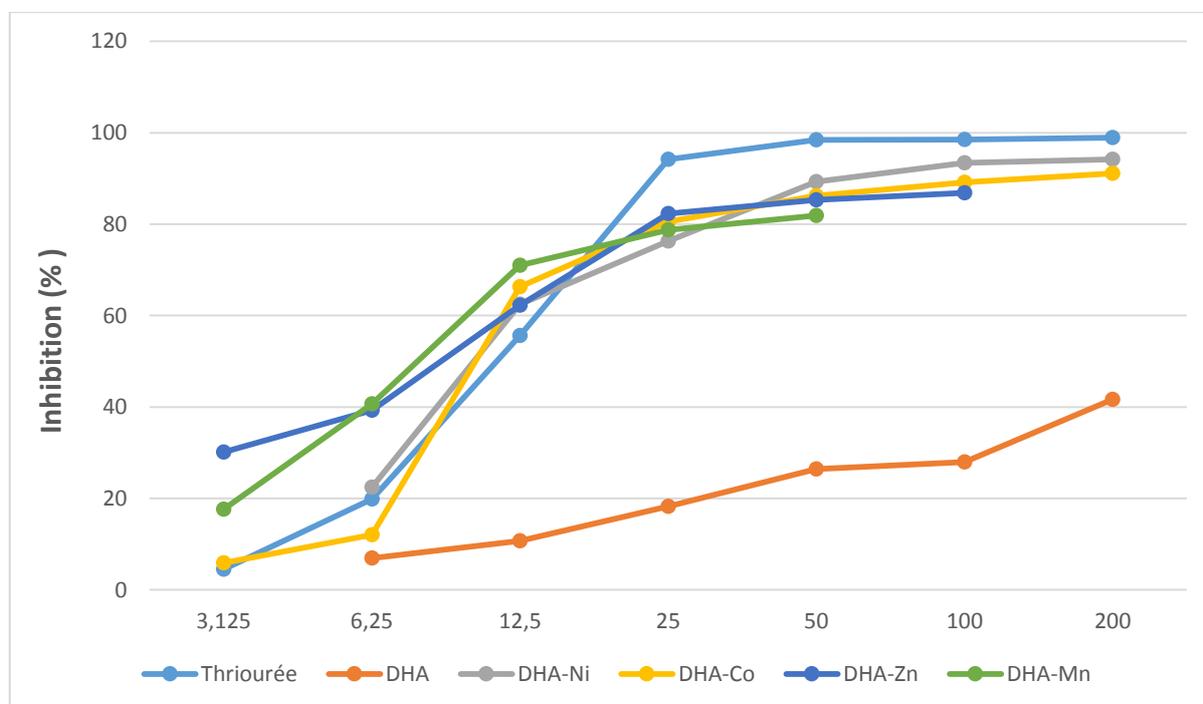


Figure 37: Courbes des pourcentages d'inhibition de l'activité inhibitrice de l'uréase.

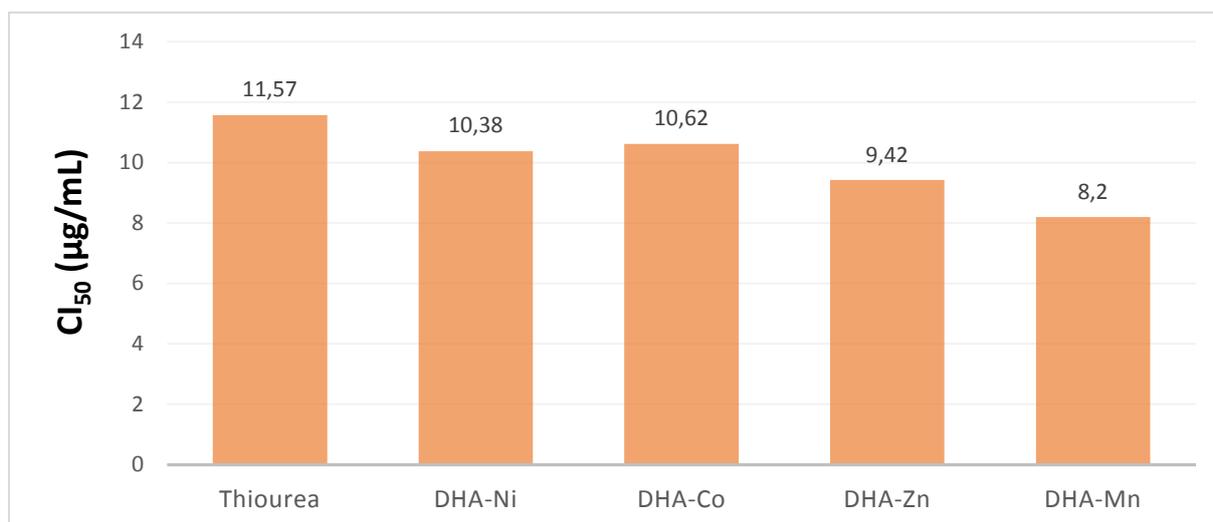


Figure 38: Valeurs des CI₅₀ exprimées en µg /mL pour l'activité inhibitrice de l'uréase.

Ainsi tous les complexes organométalliques synthétisés montrent une activité inhibitrice de l'uréase très prononcée qui talonne celle du standard utilisé la thiourée tant en terme de réactivité que de vitesse de réaction.

III. Relation structure-activité RSA

Comprendre l'influence de la structure chimique sur l'activité biologique est crucial. Bien que l'étude de la relation structure-activité ait commencé à la fin du 19^{ème} siècle, seul le travail de Corwin Hansch au début des années soixante a mis en avant un modèle mathématique pour corréler l'activité biologique et la structure chimique et a révolutionné le domaine de la recherche des médicaments. Au cours des quarante dernières années, le domaine a largement progressé et plusieurs articles de synthèse couvrant différents aspects de ce domaine ont été publiés (Debnath. A.K, 2001).

III.1. Activité antioxydante

Les antioxydants font l'objet de nombreuses études non seulement pour leur intérêt certain dans la conservation alimentaire, ils pourraient également s'avérer efficaces dans la prophylaxie et le traitement de pathologies dans lesquelles le stress oxydant est impliqué.

L'activité antioxydante d'un composé particulier est généralement liée à sa capacité à piéger les radicaux libres, à les décomposer ou éventuellement agir en tant que chélateurs de métaux ou en synergie avec d'autres composants présents.

Les antioxydants de sources naturelles sont souvent présents dans des combinaisons impliquant de nombreux composés différents. Chaque composé peut être présent avec son ou ses précurseurs et son ou ses produits de réaction. Ainsi, le mode d'action des sources naturelles des antioxydants peuvent être variées et peuvent impliquer plusieurs mécanismes d'action, en fonction du type et de la source des matériaux utilisés. **(Shahidi. F, 2000).**

Les antioxydants les plus largement utilisés dans les aliments sont l'hydroxyanisolebutylé (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT), gallate de propyle (PG) et tert-butyl hydroquinone (TBHQ). L'utilisation des antioxydants synthétiques dans les aliments remonte aux années 1940, quand il a été constaté que le BHA retardait l'oxydation. Il était également évident que les effets néfastes des métaux de transition tels que le fer et le cuivre ont dû être neutralisés. Ainsi, certains acides tels que l'acide citrique (AC), l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) ou leurs dérivés, se sont avérés agir en tant qu'agents chélatants en combinaisons avec les antioxydants phénoliques. **(Wanasundara. U, 1996).**

Le BHT et BHA ont une importance particulière, car ils sont les antioxydants alimentaires les plus utilisés. Ces antioxydants sont fortement lipophiles, et assez thermostables **(Rojita. M, 2011)**, par contre les antioxydants naturels comme la vitamine E ne résistent pas à la friture et à la cuisson au four contrairement aux antioxydants synthétiques, qui peuvent survivre à ces processus, de plus, ils sont volatils, ainsi, ils diffusent facilement dans les lipides alimentaires et inhibent l'oxydation lorsqu'ils sont incorporés dans des matériaux d'emballage alimentaire **(Madhavi, 1996).**

Plusieurs études ont démontré l'importance de la combinaison synergique des antioxydants pour tirer parti de leurs différents types d'efficacité.

Des combinaisons spécifiques permettent :

- D'éviter ou de minimiser les problèmes de solubilité ou de couleur présentés par les antioxydants individuels.
- Un meilleur contrôle et exactitude de l'application.

- Une distribution plus complète des antioxydants et agents chélatants dans les graisses et les huiles.
- La manipulation facile de certaines combinaisons d'antioxydants que des composés antioxydants individuels. (**Branen et al, 2002**).

Pour essayer de comprendre le mécanisme de réaction d'un complexe de métal de transition en tant qu'antioxydant, il faut connaître son environnement. Un complexe ou composé de coordination peut être neutre, chargé positivement ou négativement selon la nature et la charge de ses composants dont le métal, qui le plus souvent, est chargé positivement.

Les sphères sont les différentes couches de molécules entourant le cation central. Ainsi dans un complexe, on a du plus proche au moins proche du cation :

- **La sphère de coordination interne (ou 1^{ère} sphère de coordination)** : les molécules de solvant et, parfois, des anions, sont directement fixés sur le cation. Cette zone peut être souvent bien caractérisée (nombre et position des ligands).
- **La sphère de coordination externe (ou 2^{ème} sphère de coordination)** : les molécules de solvant et les anions sont orientés par le champ électrique du cation, mais ne sont pas directement fixés sur lui. Ils peuvent cependant y être reliés par des ponts hydrogène. Cette zone est difficile à analyser.
- **Le solvant (ou la sphère de solvation)** : non influencé par le cation. Il stabilise le complexe.

Des échanges se déroulent continuellement entre le solvant et les sphères de coordination, si bien qu'il faut considérer l'édifice complexe comme étant une structure moyenne. Lorsqu'un cation se déplace au sein d'une solution, il emporte avec lui ses deux sphères de coordination (**Faure, 2014**).

En se basant sur ça, les trois sites de coordination de nos complexes synthétisés peuvent être à l'origine du transfert d'électrons et donc de leur pouvoir antioxydant ou antiradicalaire.

On parle donc d'un effet de synergie de tout le complexe. Les électrons de valence de la couche « d » des métaux de transition peuvent nous orienter pour expliquer ce phénomène mais on suppose que la molécule entière est en train d'interagir et pas seulement le métal.

Le complexe DHA-Mn est celui qui s'est démarqué parmi les autres complexes et a montré une meilleure activité antioxydante, car il a plus tendance à réagir que les autres (plus réactif). Cela peut être expliqué par un nombre d'électrons plus faible sur sa couche externe 3d (tableau 16) et donc il aura tendance à les donner pour se stabiliser, ou encore assurer la

labilité et par conséquent la réactivité de l'hydrogène de la fonction hydroxyle. Ce qui peut se résumer par un transfert de charge (e^-) suivie par un don de protons (H^+).

Tableau 16: Configuration électronique des différents métaux de transition chélatés.

Le métal	Configuration électronique	Electrons sur la couche externe
Nickel	[Ar] 3d ⁸ 4s ²	8 électrons
Cobalt	[Ar] 3d ⁷ 4s ²	7 électrons
Zinc	[Ar] 3d ¹⁰ 4s ²	10 électrons
Manganèse	[Ar] 3d ⁵ 4s ²	5 électrons

III.2. Activité enzymatique

Les études sur les inhibiteurs d'enzymes sont devenues un domaine très important de la pharmacologie, de par la découverte de plusieurs molécules qui ont permis de guérir de nombreuses pathologies. Dans ce domaine les inhibiteurs d'uréase ont suscité un intérêt certain pour leur potentiel antiulcéreux (**Rubin. B et al., 1978 ; Onoda. Y et al., 1990**).

Bien que L'uréase fût la première enzyme à être cristallisée, cependant son mécanisme d'action reste très méconnu. A cette fin une revue bibliographique d'**Amutul. Z et ses collaborateurs (2002)**, portant sur des acides hydroxamiques (des composés synthétiques) comme une classe importante d'inhibiteurs de l'uréase, caractérisés par leur fonctionnalité terminale O=C-NHOH, a été prise comme référence afin de comparer le mécanisme d'action des complexes métallique de l'acide déhydroacétique DHA de cette étude portant une fonction similaire (O=C), et essayer de trouver une hypothèse à la relation structure activité.

Il a été relevé dans cette revue que:

- L'exacte connaissance des sites actifs où se forment les liaisons enzyme-inhibiteur, est le point de départ pour le design de nouveaux inhibiteurs potentiellement efficaces, plus spécifiques et moins toxiques.
- Dans toutes les structures des complexes enzyme-inhibiteur de l'uréase étudiées jusqu'à présent, le site actif est démontré comme étant un pseudo octaèdre, paramagnétique contenant deux atomes de Ni (**Clark. PA et Wilcox. DE, 1989**) (Figure 39).

- Seulement les groupements fonctionnels portant des atomes électronégatifs comme l'oxygène, l'azote et le soufre peuvent donner des ligands bidentés ou plus rarement tridentés ou des chélates afin de former un complexe octaédrique avec les deux atomes de Ni constituant les centres actifs de l'enzyme.
- Les acides hydroxamiques sont de bons chélateurs de métaux, de plus des analyses spectroscopiques ont montré que leur mécanisme d'action implique des liaisons avec les sites métalliques actifs de l'enzyme.
- Plusieurs modèles expliquant leur mécanisme d'action ont été rapportés :

- ✓ Le model Zerner (**Blakeley. RL et al., 1969 ; Dixon.N-E, et al., 1975**) : Selon ce modèle de liaison Enzyme-Inhibiteur, l'acide hydroxamique se coordonne de façon bidentée avec les deux nickel où l'un des ions Ni (II) de l'uréase est lié à une molécule H₂O et l'autre est coordonnée par un ion hydroxyde OH⁻. Cette forme est stabilisée par l'anion de la base non identifiée du site actif. Une attaque nucléophile de l'ion OH⁻ coordonné du Ni sur l'oxygène carbonyle de l'inhibiteur entrainera la formation d'un complexe qui inactive l'enzyme (figure 40). Ce modèle a été confirmé par des études qui ont montré que l'affinité de l'inhibiteur diminue à pH acide car l'efficacité de l'attaque nucléophile est affectée négativement à pH bas.

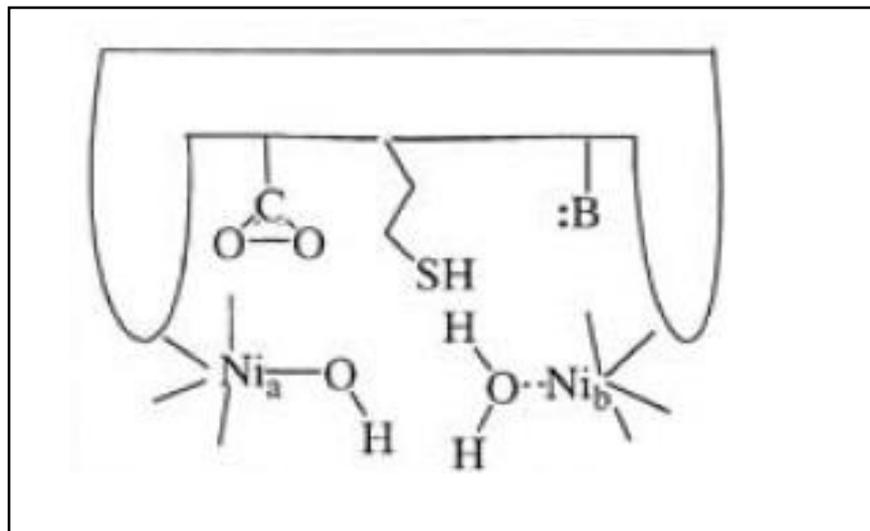


Figure 39: Site actif de l'uréase selon le modèle de **Zerner et al., (Blakeley. RL et al., 1969 ; Dixon. N-E, et al., 1975)**.

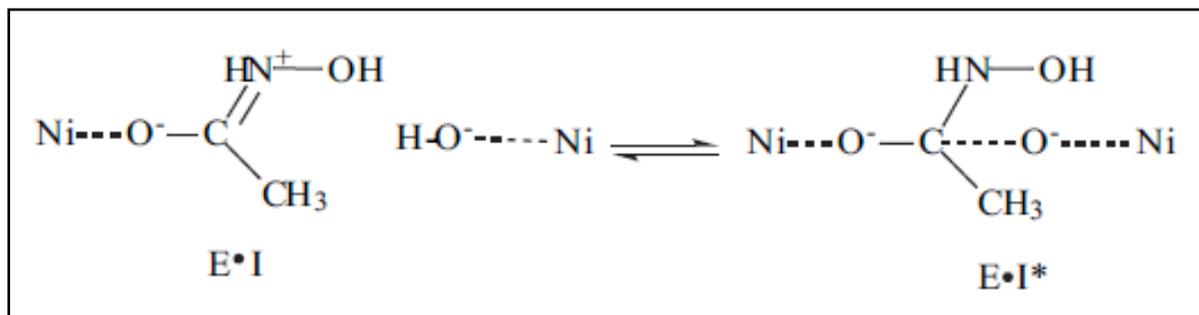


Schéma 5: Réaction de complexation de l'enzyme (E) avec l'inhibiteur (I) : E•I = Complexe Enzyme-inhibiteur , E•I* = complexe enzyme-inhibiteur stable (**Amutul. Z et al., 2002**).

✓ Le modèle Stemmler

En 1995, Stemmler et ses collaborateurs, se sont intéressés à la cristallisation de l'acétohydroxamique en coordination avec le site actif bi nucléaire de Ni, et à déterminer pour la première fois la structure du complexe par la méthode de diffraction des rayons X (figures 41: a,b). Ils ont donc montré que l'acide acétohydroxamique était lié aux deux atomes de nickel de manière bidentée pontés par l'oxygène du carbonyl hydroxamate.

Le modèle d'inhibition de l'uréase par les acides hydroxamiques est bi phasique impliquant la formation d'un complexe bidenté entre l'oxygène carbonyle de l'hydroxamate et l'ion nickel de l'enzyme est largement accepté. Cela est suivi de l'attaque nucléophile d'un anion hydroxyle lié à l'ion nickel (II) sur le carbone carbonyle de l'hydroxamate pour former un complexe Enzyme-Inhibiteur plus stable. La figure ci-dessous montre les modèles de l'inhibition bi phasique de l'acide hydroxamique proposés par Stemmler.

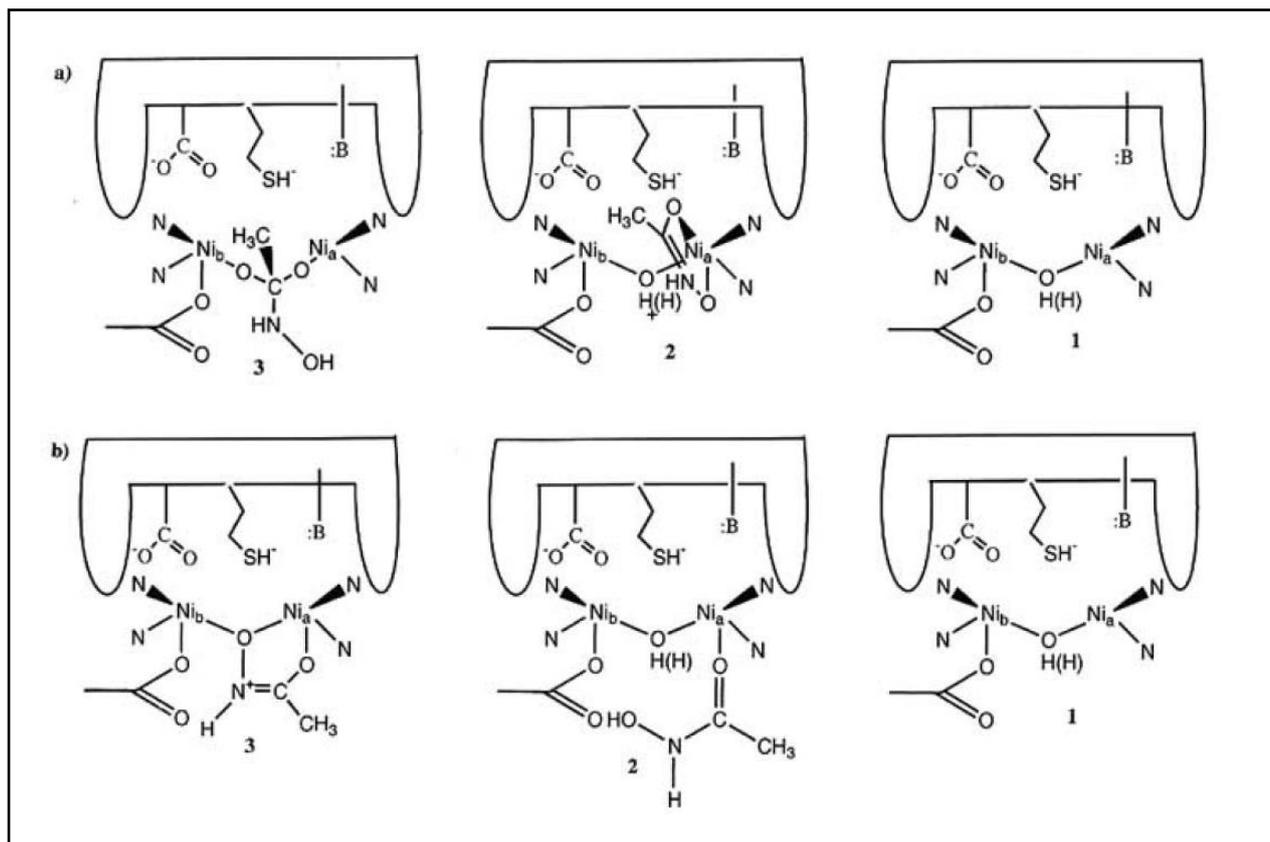


Figure 40: Modèle de Stemmler de conversion structurelle pour l'inhibition biphasique de l'uréase par l'acide hydroxamique. **a)** centre binucléaire Ni de l'enzyme hydrolytique: où les deux ions Ni sont liés par des atomes d'azote de quatre His imidazoles, un groupe COO⁻ du résidu Lys carbamylé, un autre groupe COO⁻ issu d'un résidu Asp et une molécule H₂O. **b)** liaison bidentée de l'acide acétohydroxamique au Ni par l'intermédiaire des oxygènes d'hydroxamate et de carbonyle (**Amutul. Z et al., 2002**).

Bien que ces acides hydroxamiques présentent des candidats médicaments efficaces, mais ils ne sont pas encore effectifs en tant que médicaments, des études sont en cours de recherche afin de mieux comprendre leur mécanisme d'action.

En se basant sur le mécanisme d'action des acides hydroxamiques, on peut supposer que nos complexes synthétisés fonctionnent de la même manière puisqu'ils contiennent un groupement carbonyle, qui permet de faire l'attaque acide et basique afin de ponter et ainsi bloquer les deux centres métalliques Ni pour les désactiver.

Le fait que les complexes organométalliques étudiés soient plus efficaces en terme de cinétique, de pourcentage d'inhibition et de la CI₅₀ que la molécule mère le DHA peut être

expliqué par un transfert de charge (rôle de cofacteurs) assuré par les métaux de transition qui catalysent l'ensemble de la réaction. Cela explique l'accélération de l'effet inhibiteur des complexes métalliques avec une forte activité inhibitrice à de faibles concentrations contrairement au DHA seul.

Les nouveaux complexes métalliques de DHA ont montré un potentiel inhibiteur de l'uréase très intéressant qui peut attirer beaucoup d'attention dans le domaine de l'industrie pharmaceutique en tant que candidats médicaments antiulcéreux.

Conclusion générale

L'étude entreprise dans le cadre de ce mémoire de master a pour objectif d'évaluer le potentiel antioxydant et anti enzymatique de quatre nouveaux complexes de l'acide déhydroacétique DHA et des métaux de transition qui ont l'avantage d'être facilement préparés avec de bons rendements de synthèse.

En vue de l'intérêt actuel accordé à ces activités biologiques, une synthèse chimique de nouveaux complexes de nickel, de cobalt, de zinc et de manganèse dérivés du DHA a été pensée et réalisée suite à une recherche bibliographique intense sur les molécules synthétiques potentiellement bioactives, cette dernière prône le DHA et les complexes de métaux de transition comme agents thérapeutiques prometteurs.

Un contrôle de pureté ainsi qu'une identification des nouveaux composés synthétisés ont été réalisés par la technique du banc chauffant, ainsi qu'une analyse structurale par spectroscopies IR et UV-Vis qui a indiqué leur mode de coordination bidenté et leur champ géométrique octaédrique, cela permet entre autre de connaître leurs sites actifs, les conditions de leurs réactivité, et ce afin de prédire leur mode d'action notamment pour les activités biologiques investies.

La nouvelle série de complexes organométalliques synthétisés, ainsi que leur molécule mère, ont été soumises à une batterie de tests biologiques *in vitro*, afin d'évaluer leur potentiel antioxydant et anti enzymatique, à travers l'étendue de leurs capacités à piéger plusieurs radicaux libres : le cation radical ABTS^{•+}, à inhiber le blanchiment du β -carotène, à chélater les métaux de fer et de cuivre, tous deux impliqués dans la réaction de Fenton, et à inhiber l'uréase.

Ces complexes métalliques se sont avérés capables de bloquer les réactions d'oxydation testées, notamment le complexe DHA-Mn qui a présenté une activité remarquable.

L'activité enzymatique inhibitrice de l'uréase a également montré le fort pouvoir inhibiteur des quatre complexes organométalliques.

Les complexes ayant montré une bonne activité antioxydante sont :

- ✓ Le complexe DHA-Ni qui a montré une bonne activité chélatrice du fer avec une CI_{50} estimée à 14,53 $\mu\text{g/mL}$, proche de celle du standard EDTA ($CI_{50}=8,80 \mu\text{g/mL}$).
- ✓ Le complexe DHA-Mn est celui qui s'est démarqué parmi tous les autres complexes pour les autres activités avec une CI_{50} de 22,69 $\mu\text{g/mL}$ dans le test du β -carotène, une

Conclusion générale

CI₅₀ estimée à 258,36 µg/mL dans le test de piégeage du radical ABTS, enfin ce complexe a montré également la meilleure activité chélatrice du cuivre avec une CI₅₀ de 106,36 µg/mL.

- ✓ Le DHA seul et ses complexes de Ni, Zn et Mn ont présenté une activité chélatrice du fer avec des absorbances comparables pour l'activité de chélation du fer par UV-Vis.
- ✓ Tous les complexes ont présenté une activité inhibitrice de l'uréase remarquable et comparable à celle du standard la thiourée (CI₅₀= 11.57µg/mL), particulièrement le complexe DHA-Mn, avec une CI₅₀ très prononcée estimée à 8,20µg/mL.

Ce travail nous a permis d'établir la relation structure-activité (RSA) des différents complexes et de confirmer le fait que les métaux de transition augmentent l'activité biologique des ligands auxquels ils sont chélatés.

Les résultats obtenus sont prometteurs et ouvrent de larges perspectives quant à leur exploitation pratique dans la conception de médicaments.

Comme perspectives avenir à ce travail, il est proposé :

- ✓ Le développement de méthodes de calculs théoriques modulant des modèles de mécanismes antioxydants et d'inhibition des enzymes afin de prévoir à l'avance le potentiel thérapeutique des molécules, ou l'inverse synthétiser des molécules douées des propriétés recherchées.
- ✓ La détermination de la structure enzyme-complexe notamment par la méthode de diffraction des rayons X.
- ✓ L'élucidation du mode d'action des complexes sur l'uréase.
- ✓ Pharmacomodulation des complexes organométalliques obtenus et synthèse d'autres analogues structuraux afin d'améliorer encore plus leurs performances.
- ✓ Réalisation de tests précliniques *in vivo* comme suite logique à cette étude, afin de confirmer l'effet thérapeutique obtenu.

Références bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Amtul .Z, Atta-ur-Rahman, R.A. Siddiqui, M.I. Choudhary. (2002). Chemistry and Mechanism of Urease Inhibition. *Current Medicinal Chemistry*. Vol 9, 1323-1348.

Ames. B.N, Shigenaga. T.M, Hagen. T.M. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(23). 10771-10778.

-B-

Batra. N, Devi. J. (2015) .(Synthesis of metal based chemotherapeutic agents derived from chloro-acetic acid[1-(4-hydroxy-6-methyl-2-oxo-2H-pyran-3-yl)-ethylidene]-hydrazide. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 7 .183-189.

Bendre. RS, Tadavi. SK., Patil. MM. (2017). Synthesis, crystal structures and biological activities of transition metal complexes of a salen-type ligand. *Transition Metal Chemistry*. 43(1): 83-89.

Bhattacharyya. J, Biswas. S, Datta. A. (2004). Mode of action of endotoxin: Role of free radicals and antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*. 11(3): 359-368.

Blakeley. RL, Hinds. JA, Kunze. HA, Webb. EC. (1969). Jack bean urease (EC 3.5. 1.5). Demonstration of a carbamoyl-transfer reaction and inhibition by hydroxamic acids. *Biochemistry*. 8, 1991-2000.

Branen. A.L, Davidson. P.M, Seppo. S, Thorngate. J.H. Food additives. 2^{ème} edition. Food science and technology. New York: Marcel Dekker, 2002, P 953.

Bumain. BA, Aellman. J, Amchem. J. Soc 114. 1992. p1099

-C-

Casabó.J, Marquet.J, Moreno-Mañas.M, Prior.M, Teixidor.F, Florencio.F, Martínez-Carrera.S, García-Blanco.S .(1987). Transition-metal complexes with dehydroacetic acid: Crystal structure of bis (3 - acetyl - 4 - hydroxy - 6 - methyl - 2 - pyrone) cobalt(II) bis(dimethylformamide). *Polyhedron*. Vol 6, 1235-1238.

Chavanne. M, Jullien. A, Odermato. GJ. Chimie organique expérimentale.1991.p 98.

Chial. H. Contrôle de qualité des produits pharmaceutiques. 1999. p120.

Clark. PA, Wilcox. DE. (1989). Magnetic properties of the nickel enzymes urease, nickel-substituted carboxypeptidase A and nickel-substituted carbonic anhydrase, *Inorg. Chem.*, 28, 1326-1333.

Collins. C.M, D'Orazio. S.E. F. (1993). Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. *Molecular Microbiology*. 9(5) : 907-913.

-D-

Debnath. A.K. (2001). Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Paradigm - Hansch Era to New Millennium. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 1(2): 187-195.

Dhanraj. C.J, Nair. M.S. (2009). Application of Schiff bases and their metal complexes-A Review . *Journal of Coord. Chem.*, 62 : 4018.

Dinis, T. C. P, Madeira. V. M. C, Almeida. L. M. (1994). Action of Phenolic Derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* . 315(1) :161–169.

Dias. L. C, Demuner. A. J, Valente.V. M, Barbosa.L. C, Martins.F. T, Doriguetto. A. C, Ellenas. J .(2009) . Preparation of Achiral and Chiral(E)-Enaminopyran-2,4-diones and Their Phytotoxic Activity *J.Agric. Food Chem* .57. 1399-1405.

Dixon.N-E, Gazzola.C, Blakely.R-L, Zerner.B.(1975). Jack-bean urease (E.C. 3.5.1.5.3).A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical Society*.97 :4131-4133.

Djedouani. A, Boufas. S, Bendaas. A, Allainc. M, Bouet. G. (2009). Bis(3-acetyl-6-methyl-2-oxo-2H-pyran-4-olato)bis(dimethyl sulfoxide)nickel(II). *Acta Cryst.* E65, m1205–m1206.

Dunn, B.E.; Cohen, H.; Blaser, M.J. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10 : 720–741. Dunod.Paris. 254.

-F-

Faure. B. (2014). Licence de Chimie - Chimie Inorganique.

Fay.M, Wilbur. S, Abadin. H, Ingerman.L, Swarts.S.G, Research.S. Toxicological Profile for Nickel. Ed, U.S. 2005. p: 1-185.

Références bibliographiques

Favier A. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique. p108-11.

Fenanir. F. Synthèse et caractérisation de nouvelles molécules à effet thérapeutique contenant des ligands (bases de schiff).Thèse de magister .Université Ferhat Abbas de Sétif . Faculté des sciences de l'ingénieur.2011.p16.

-G-

Gardès-Albert. M, Bonnefont-Rousselot., Abedinzadeh. Z ,Jore. D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène, comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. L'actualité chimique. 91-96.

Gilchrist. TL . Hetrocyclic Chemistry. 1985.p 296.

Gudala. S. Various Biological Activities of DHA Derivatives. **In:** Dehydroacetic Acid and its Derivatives: Useful Synthons in Organic Synthesis. 1^{ère} edition, India: Santhosh Penta. 2017. p81.

Guermiche. A, Faidi. A. (1996). Etude qualitative du pouvoir complexant du ligand $H_2C_2O_4$ vis-à-vis des métaux Cu(II) et Ni (II) en milieux aqueux. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme D.E.U.A. Université Ferhat Abbas de Sétif.

Gülçin I, Küfreviöglu Ö. I, Oktay M, Büyükkuroglu M. E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). Journal of Ethnopharmacology, 90: 205-215.

-H-

Hadjipalu.L, Dimitra.J, Athina.A &Geronikaki. (1998). Chem Abstr., 129 :144.

Harris.TM, Harris.CM, Wachter.MP. (1968).Condensations of dehydroacetic acid at the6-methyl position. Wachter; *Tetrahedron*, 24, 6897-906.

Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. Journal of Gerontology. 11(3). 298-300.

Hellal Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.

-I-

Ichai. C, Quintard. H, Orban. J-C. Désordres métaboliques et réanimation : de la physiopathologie au traitement. 1^{ère} édition: Springer,2011, p 427-439.

-J-

Jensen.W.B, The Oesper Collections In The History Of Chemistry, Papers Of The American Chemical Society, (2002).

-K-

Khan M.A., Khan H., Tariq S.A et Pervez S. (2014). Urease Inhibitory Activity of Aerial parts of *Artemisia Scoparia*: Exploration in an in vitro study.Hindawi publishing corporation.Ulcers.p5.

Kubola J, Siriamornpun S. (2008). Phenolic contents and antioxydant activities of bitter gourd (*Momordicacharantia L.*) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. Food chemistry, 110(4): 881-8.

Kusters J. G ; Van Vliet A.H .(2006). -“ pathogenesis of helicobacter pylori infection.”Clin Microbiol Rev19 (3):449-490.

-L-

Lagarde. M, Lafont. H. (2003). Impacts des facteurs nutritionnels et environnementaux l'athérosclérose. L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques., Toussaint, 30: 537-546.

Lawrence. L .S.(1970). Ferrozine---a new spectrophotometric reagent for iron, Analytical Chemistry . 42 (7):779–781.

Le Cren. F. Les antioxydants. La revolution du XXIe siècle. 2^{ème} édition. Montréal: Québecor,2004, p 157.

Lei Shi, W-J Mao, Y. Yang, H-L Zhu. (2009). Synthesis, characterization, and biological activity of a Schiff-base Zn (II) complex . J. of Coord. Chem., 62: 3471.

-M-

Mane. PS, Shirodkar. SG, Arbad. BR, Chondhekar. TK. (2001). Synthesis and characterization of manganese (II), cobalt (II), nickel (II), and copper (II) complexes of Schiff base derivatives of dehydroacetic acid . Indian Journal of Chemistry. 40A (06): 648-651.

Malik. MA, Dar. OA, Gull. P, Wani. MY, Hashmi. AA. (2018). Heterocyclic Schiff base transition metal complexes in antimicrobial and anticancer chemotherapy. MedChemComm. 9(3): 409-436.

Marco.G.J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. The journal of the American oil chemists' society .45: 594-598

Madhavi. D.L, Deshpande. S.S, Salunkhe. D.K. (1996). Food antioxidants : Technological, toxicological, health perspective. Marcel Dekker. pp. 1-5.

Marrison.LR, Dickinson.JM, Fairlamb.JS. (2003), Suzuki cross-coupling approaches to the synthesis of bioactive 3-substituted and 5-substituted-4-methoxy-6-methyl-2-pyrones. *Bioorg Med Chem* .12, 2667.

Marrison.LR, Dickinson.JM, Fairlamb.JS. (2002). Bioactive 4-substituted-6-methyl-2-pyrones with promising cytotoxicity against A2780 and K562 cell lines. *Bioorg Med Chem*, 12, 13.

Mégraud F., Lehn N., Lind T., Bayerdorffer E., O' morain C., Spiller R., Unge P., van Zanten S.V., Wrangstadh M., Burman C.F.(1999). Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: The MACH 2 study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 2747–2752.

Mesplède. J, Randon. J. 100 manipulations de chimie générale et analytique. Editions Bréal. 2004.

Migdal. C, Serres. M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. Médecine/Sciences. 27(4) : 405-412.

Molyneux P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology.* 26 (2): 211-219.

Murtaza G., Badshah A., Said M., Khan H., Khan A., Khan S., Siddiq S., Choudhary M.I., Boudreau J et Fontaine F-G. (2011). Urease inhibition and anti-leishanial assay of substituted benzoylguanidines and their copper (II) complexes. *Journal the Royal Society of Chemistry.*40:9202-9211.

-N-

Niki. E, Yoshida. Y, Saito. Y, Noguchi. N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 338(1): 668-676.

Novelli GP, (1997). Role of free radicals in septic shock. *Journal of physiology and pharmacology.* 48(4): 517-527.

-O-

Onoda.Y, Iwasaki.H, Magaribuchi. T, Tamaki.H. (1991). Effects of the new anti-ulcer agent 12-sulfodehydroabiatic acid monosodium salt on healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats.*Arzneimittelforschung.* 4. 546-548.

-P-

Pokorny. J, Yanishlieva. N, Gordon. M. (2001). Antioxidants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited .Tome 3, 1ère édition, England, p 7-17.

Peifler. VP and Tsumaki. T. *Pract Chem* 84. 1933. p 503.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons,* 4, (5). 85-177.

Pradyot P. *Handbook of inorganic chemicals* .Ed McGraw-Hill. p231, 538, 980.

-Q-

Quarrie.C.M, Rock.P.A. *Chimie générale.* 3^{ème} édition. Bruxelles: De Boeck,1992, P 85-86.

-R-

Rassweiler.C. F., Adams.R.(1924). THE STRUCTURE OF DEHYDRO-ACETIC ACID. Journal of the American Chemical Society. 46(12): 2758–2764.

Raza Shah M., Soomro Z.H. (2012). Enzyme inhibition and bioapplication. In Tech. ISBN:978-953.

Re.R, Pellegrini.N, Proteggente.A, Pannala.A, Yang.M, Rice-Evans.C, (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay. Free Radical Biological Medicine.26 (9-10):1231-1237.

Rice-Evans C, Miller N.J. (1994). Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids. Methods in Enzymology. 234: 279-293.

Rice-Evans C, Miller N.J, Bowell P.G, Bramley P.M, Pridham J.B. (1995).The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radical Research. 22: 375-383.

Riad.BY, Abdelhamid.AO, Khalifa.FA, Saleh.YE. (1989). Reactions with acetoacetanilide: Synthesis and antibacterial activity of some new pyran, pyrano[2,3 c]pyrazole and pyrano[2,3-c]-pyridine derivatives. *Arch Pharm* ,12(3), 201.

Robert J D. Chimie organique. 1996.

Rojita. M, Satpal. S B. (2011). Antioxidants and their characterization. Journal of Pharmacy Research. 4(8) : 2744-2746.

Rubin.B, Antonaccio.M-J, Horovitz .Z-P.(1978). Captopril (SQ 14,225)(D-3-mercapto-2-methylpropanoyl-L-proline): a novel orally active inhibitor of angiotensin-converting enzyme and antihypertensive agent *Prog.Cardiovasc. Dis.*, 21, 183-194.

-S-

Sánchez-Vioque.R , Polissiou.M , Astraka.K , de los Mozos-Pascual.M, Tarantilis.P, Herraiz-Penalver.D, Santana-Méridas.O .(2013).Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry Industrial. *Industrial Crops and Products*.49:150–159

Shahidi. F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung/Food*. 44(3): 158-163.

Skyrianou K. C, Psycharis V, Raptopoulou C. P, Kessissoglou D. P, Psomas.G, (2011). Nickel quinolones interaction. Part 4 — Structure and biological evaluation of nickel(II) enrofloxacin complexes compared to zinc(II) analogues. *Journal of Inorg. Biochem.* 105.63–74.

-T-

Taha.M, Ullah.H, Muhammad Ramadhan Al Muqarrabun.L,Naseem Khan.M, Rahim.F, Ahmat.N, Javid.M, Ali.M , Mohammed Khan.K . (2017). Bisindolylmethane thiosemicarbazides as potential inhibitors of urease: Synthesis and molecular modeling studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* .26. 152–160.

Tarafder. M.T.H, Ali. M.A, Azahari. D.J, Wee. K, Silong. S and Crouse. K.A. (2000) *Transition Metal Chemistry*. 25. 456.

Tepe. B, Sokmen. M., Akpulat. H.A, Daferera. D, Polissiou. M, Sokmen. A. (2005).Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymussipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*. 66.447-454.

Tidwell. T.T. (2008). Hugo (Ugo) Schiff, Schiff Bases, and a Century of β -Lactam Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*. 47(6).1016–1020.

-U-

Ullah. H, Wattoo. F.H, Sarwar. W, Muhammad. H, Gulfraz. M, Tirmizi. S.A, Ata. S, Wadood. A. (2012). Synthesis, spectroscopic characterization and antibacterial activities of three Schiff bases derived from dehydroacetic acid with various substituted anilines.*Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem* .37 (4).386 -391.

-V-

Valko. M, Rhodes. C.J, Moncol. J, Izakovic. M et Mazur. M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*.160(1). 1-40.

-W-

Walton. P.H. Beginning Group Theory for Chemistry. Workbooks in Chemistry. Oxford University Press, Oxford, 1998, p190.

Wanasundara. U.N, Amarowica, Shahidi. F. (1996). Partial characterization of natural antioxydants in canola meal. Food Res. 28. 525-530.

Skoog. D, West. D, Holler. F.J, Crouch. S. Chimie analytique. 3^{ème} édition. Bruxelles : De Boeck,1997, p 1066.

-Y-

Yaacoub. R. (2009). Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux. Intéret de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés. Thèse de doctorat. N° 2009AGPT 0048. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech).

-Z-

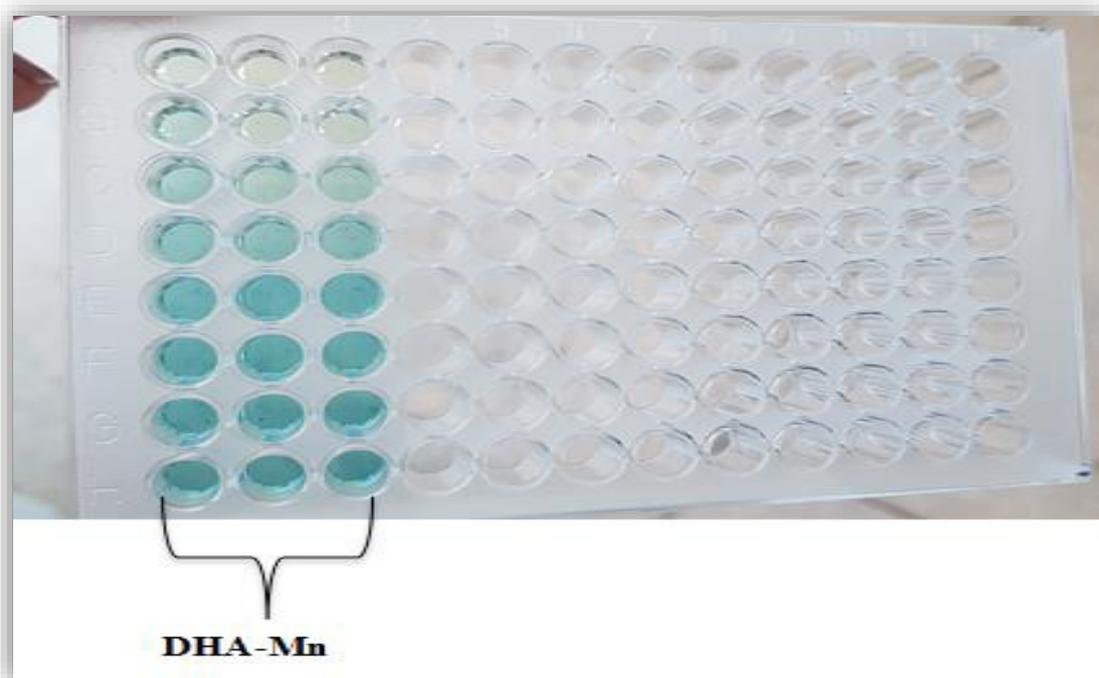
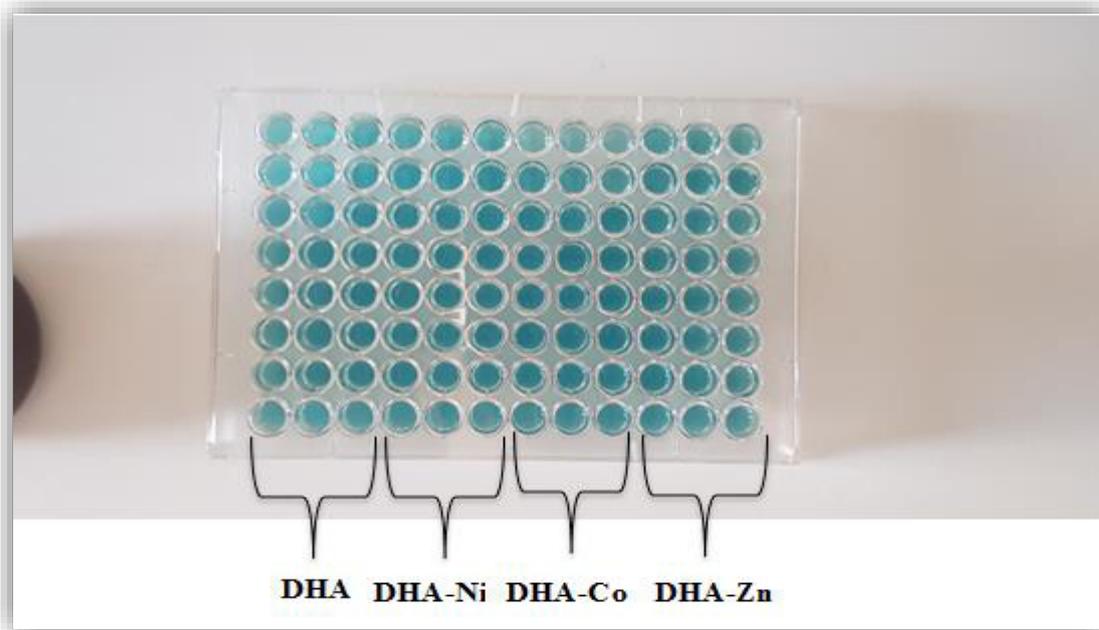
Zhao. H, Dong. J, Lu. J, Chen. J, Li. Y, Shan. L. (2006). Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(19). 7277-7286.

Zouchoune. F, Zendaoui . S.M, Bouchakri. N, Djedouani. A, Zouchoune. B. (2010). Electronic structure and vibrational frequencies in dehydroacetic acid (DHA)transition-metal complexes: A DFT study. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. 945(1-3). 78–84.

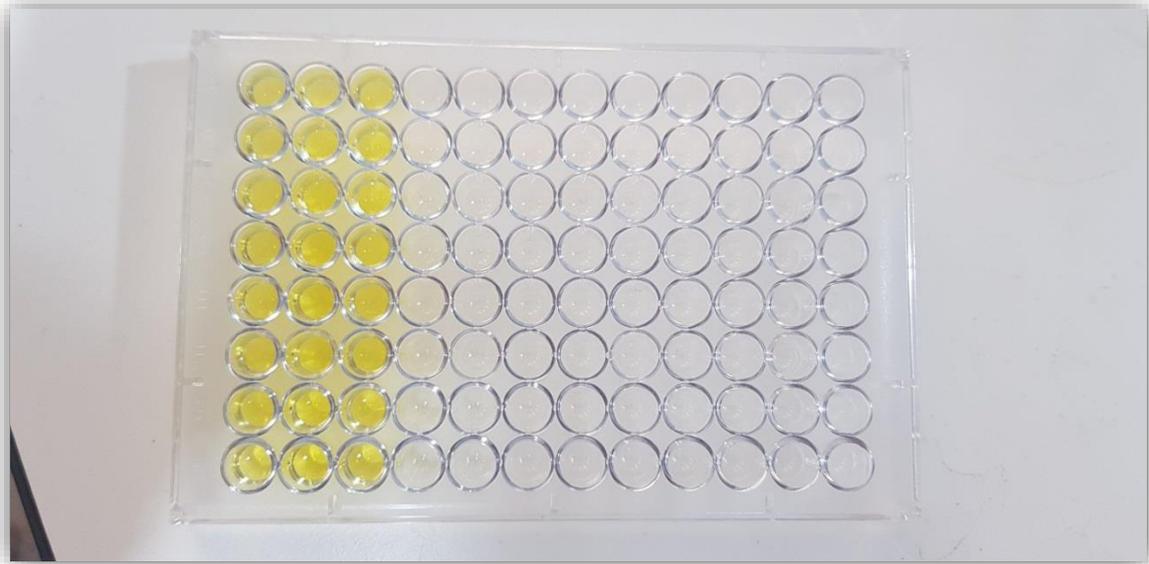
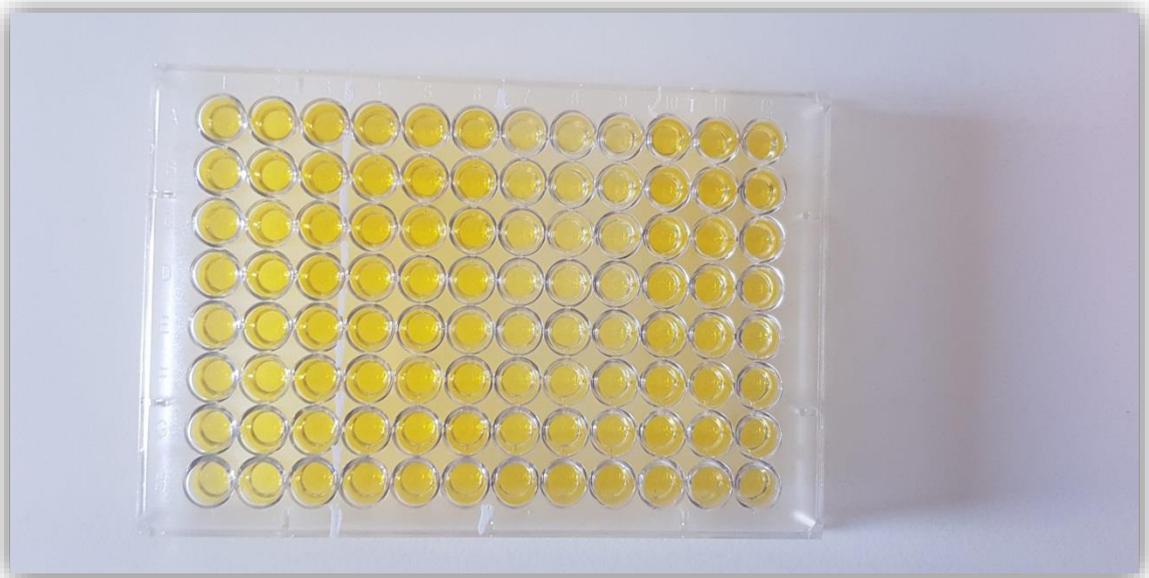
Annexes

Annexe 1 : Microplaques de l'activité de piégeage du radical ABTS

L'ordre des composés sur les microplaques est maintenu pour toutes les activités.



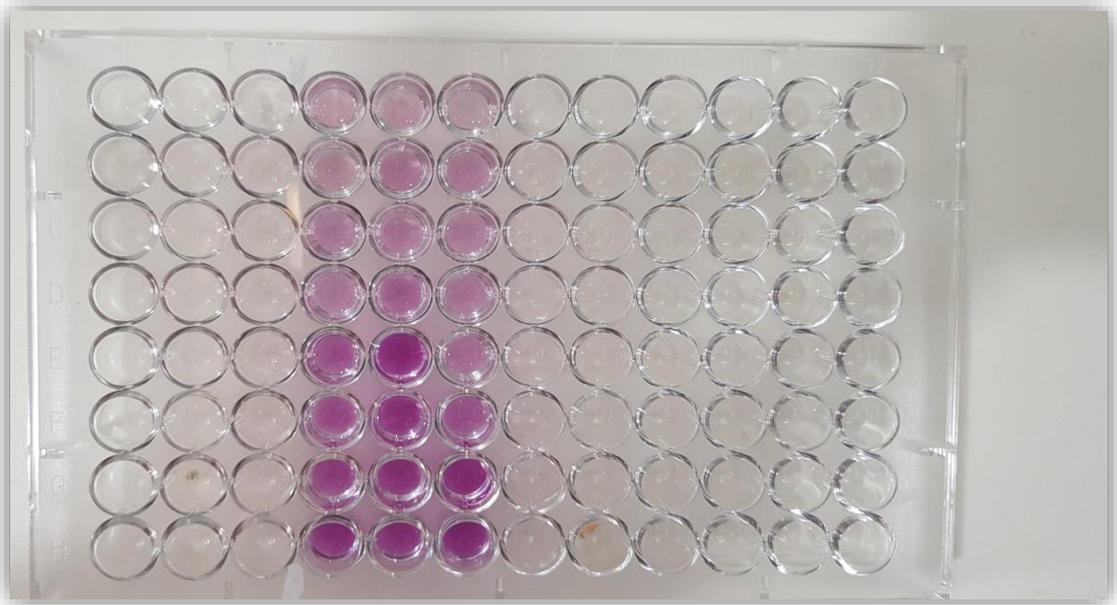
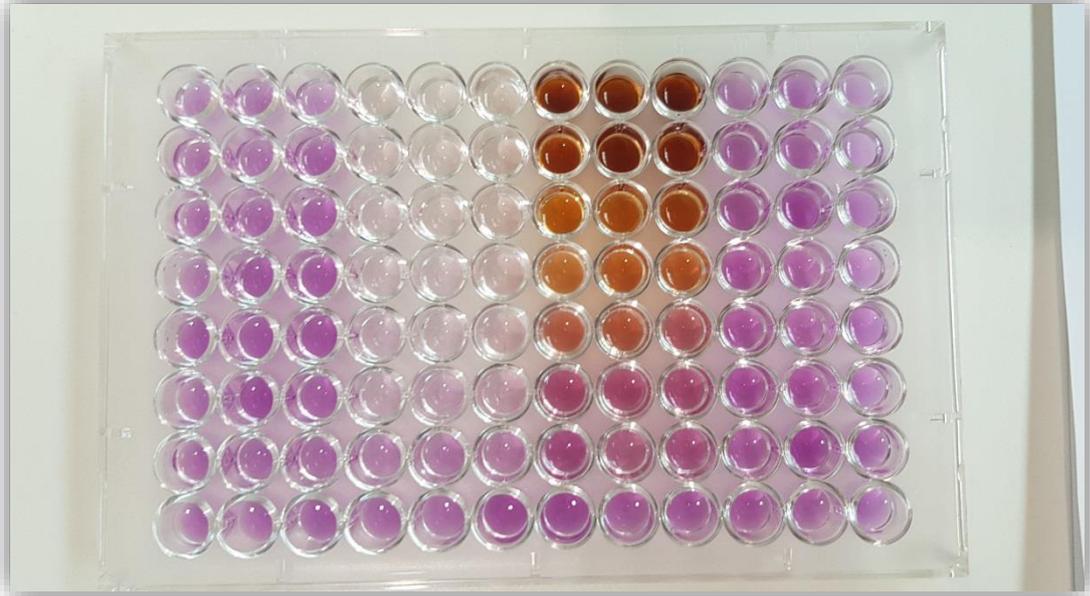
Annexe 2 : Microplaques de l'activité d'inhibition de blanchiment du β -carotène



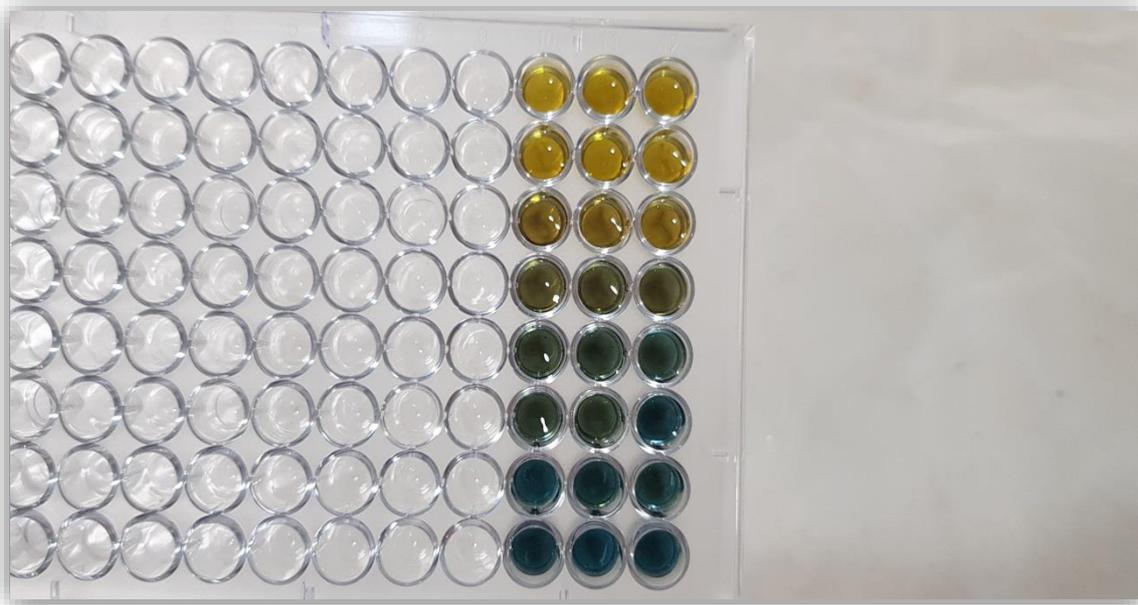
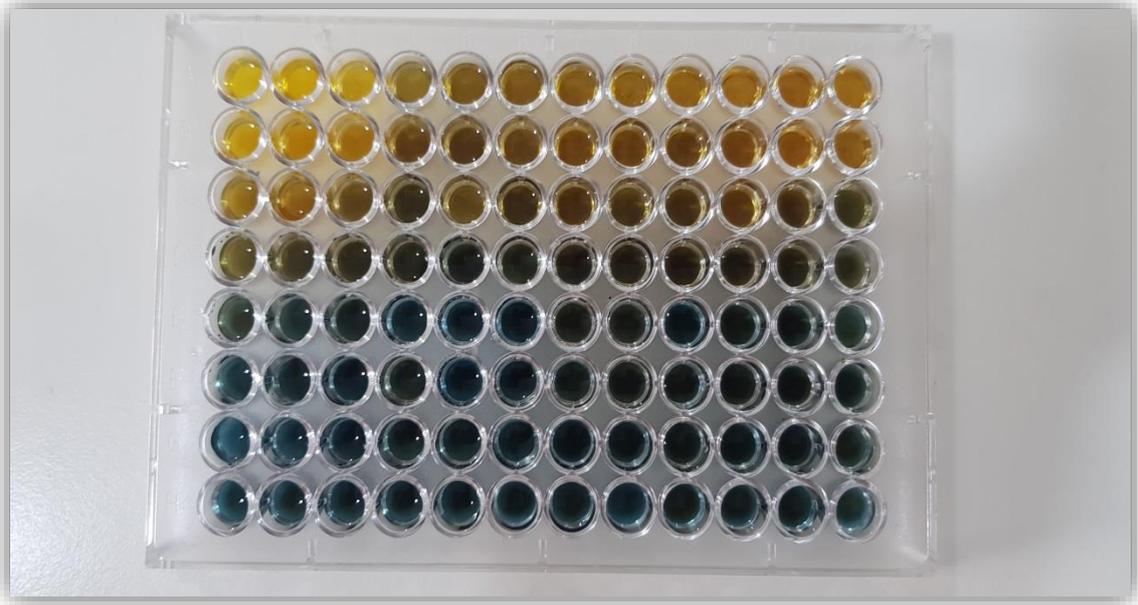
Annexe 3 : Microplaque de l'activité de chélation du fer par UV-Vis



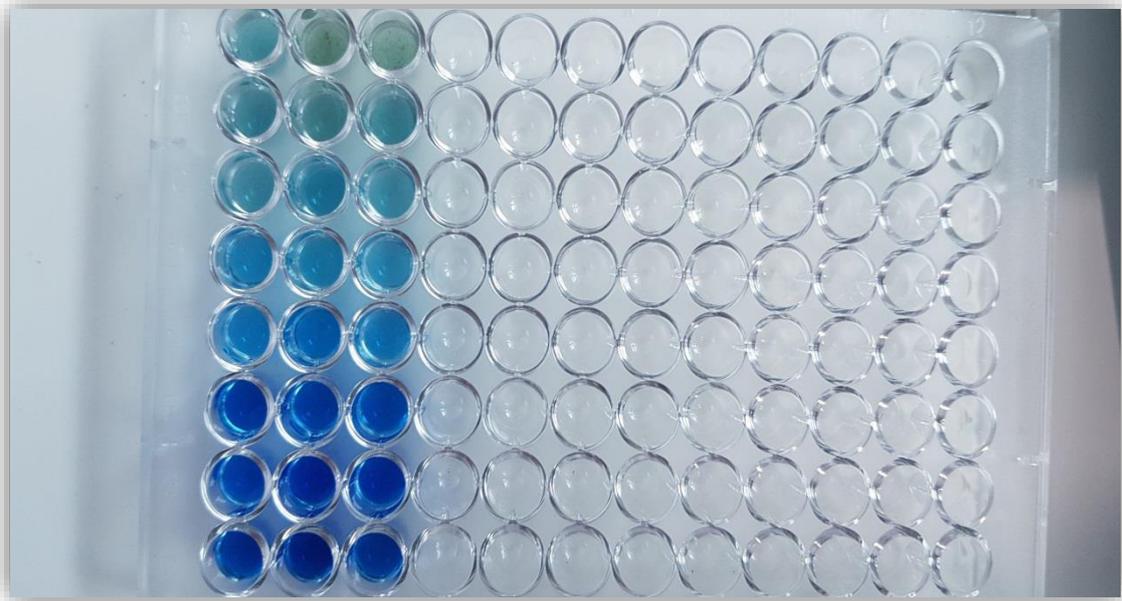
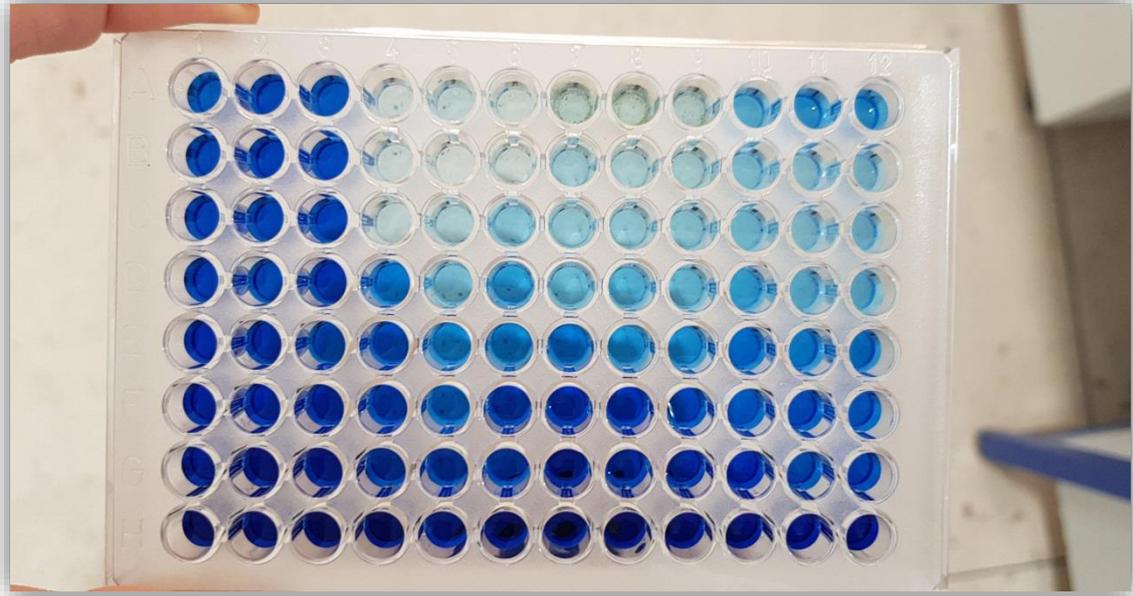
Annexe 4 : Microplaques de l'activité de chélation du fer



Annexe 5 : Microplaques de l'activité de chélation du cuivre



Annexe 6 : Microplaques de l'activité inhibitrice de l'uréase



Annexe 7 : Etuve (Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine)

Une chambre close dont on élève à volonté la température faire chauffer le matériel ou pour l'incubation des solutions. Un appareil utilisé également en microbiologie pour maintenir les cultures de microbes à température constante et donc faciliter leur développement.



Annexe 8 : Lecteur de microplaques (Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine)

Un lecteur de microplaque est un dispositif qui permet de détecter des mesures d'absorbance, de fluorescence et de luminescence, cet appareil est capable de traiter des échantillons en quelques minutes ou même quelques secondes, relié à un ordinateur sur lequel il affiche les différentes absorbances.



Annexe 9 : Agitateur (Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine)

Un agitateur permet de mélanger une solution en utilisant la force magnétique afin d'assurer l'homogénéisation d'un milieu tout en utilisant un barreau magnétique (sa longueur dépend de la taille du récipient).



Annexe 10 : Balance (Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine)

Par définition, la balance de laboratoire est un instrument de mesure de base servant à évaluer des masses inconnues que l'on cherche à déterminer. Il existe deux types de balance de laboratoire :

-les balances analytiques sont conçues pour la mesure extrêmement précise de petits échantillons leur lecture a une plage de 0.1 mg - 0.01 mg. Elles ont une lecture plus précise, sont beaucoup plus sensibles aux changements, et peuvent détecter des variations de masse plus petites.

-les balances de précision ont souvent une capacité supérieure à celle des balances analytiques et donnent des résultats de 0.1 g, 0.01g ou 1 mg.

Donc Pour des mesures exactes dans les laboratoires, les balances analytiques sont le bon choix.



Balance analytique



Balance de précision

Annexe 11 : Calcul du rendement

Par définition, le rendement d'une synthèse chimique est égal au rapport de la masse (ou de la quantité de matière en produit obtenue) par celle attendue. La masse attendue est déterminée à l'aide de l'équation de la réaction et de la composition initiale du système.

$$\text{Rdt } \% = \frac{\text{Masse expérimentale du produit}}{\text{Masse théorique du produit}} \times 100$$

Résumé

L'acide déhydroacétique ou le 3-acétyl-4-hydroxy-6-méthyl-2H-pyra-2-one est un produit industriel connu pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques. Le présent travail est consacré à la synthèse chimique de nouveaux complexes métalliques en utilisant l'acide déhydroacétique comme produit de départ, la réaction de ce dernier avec des métaux de transition tels que le cobalt, le nickel, le zinc et le manganèse conduit à la formation de complexes octaédriques colorés, ces complexes ont été structuralement analysés par des méthodes spectroscopiques usuelles Ultraviolet-Visible et Infrarouge. Des tests biologiques ont montré des résultats encourageants pour les activités antioxydantes suivantes: le piégeage du radical ABTS, la chélation des ions métalliques tels que le fer et le cuivre et l'inhibition de la peroxydation du β -carotène, ainsi qu'une forte activité inhibitrice de l'uréase. Ces résultats sont donc très prometteurs pour l'utilisation de ces complexes comme de potentiels candidats thérapeutiques.

Mots clés :

Acide déhydroacétique, activité antioxydante, activité anti-uréase, méthodes spectroscopiques, complexes de métaux de transition.

Abstract

Dehydroacetic acid or 3-acetyl-4-hydroxy-6-methyl-2H-pyridin-2-one is an industrial product known for its antibacterial and antifungal properties.

The present work is dedicated to the chemical synthesis of new metal complexes using dehydroacetic acid as starting material, the reaction of the latter with transition metals such as cobalt, nickel, zinc and manganese leads to the formation of colored octahedral complexes, these complexes have been characterized by the usual ultraviolet-visible and infrared spectroscopic analysis methods. Biological tests have shown encouraging results for the following antioxidant activities: the trapping of the ABTS radical, the chelation of metal ions such as iron and copper and the inhibition of β -carotene peroxidation, as well as a strong inhibitory activity of urease. These results are therefore very promising for the use of these complexes as potential therapeutic candidates.

Keywords:

Dehydroacetic acid, transition metals, antioxidant activity, anti-urease activity, spectroscopic methods, transition metal complexes .

ملخص

حمض 3-أسيتيل-4-هيدروكسي-6-ميثيل-2-بيرون هو منتج صناعي معروف بخصائصه المضادة للبكتيريا والفطريات. يكرس العمل الحالي للتركيب الكيميائي للمجمعات المعدنية الجديدة باستخدام حمض الهيدرو أسيتيك كمادة انطلاق، رد فعل هذا الأخير مع المعادن الانتقالية مثل الكوبالت والنيكل والزنك والمنغنيز يؤدي إلى تشكيل معقدات جديدة ملونة تمتاز بستروابط ، وقد تم تصنيف و تحديد الخصائص البنيوية المميزة لهذه المركبات بالطرق الطيفية المعتادة IR و UV-vis. أظهرت الاختبارات البيولوجية نتائج مشجعة للأنشطة المضادة للأكسدة التالية: الاختبار المثبط للجزر الحر ABTS، إخلاء أيونات المعادن مثل الحديد والنحاس وتثبيط الأكسدة في اختبار β -carotene ، وكذلك النشاط المثبط لليوريا Anti-uréase . وبالتالي فإن هذه النتائج واعدة للغاية لاستخدام هذه المجمعات كمرشحين علاجيين محتملين.

كلمات مفتاحية:

حمض 3-أسيتيل-4-هيدروكسي-6-ميثيل-2-بيرون، المعادن الانتقالية، الأنشطة المضادة للأكسدة، النشاط المثبط لليوريا، الطرق الطيفية، المجمعات المعدنية الانتقالية.

Année universitaire : 2018/2019

**Présenté par : BOUKERZAZA Ghada
BOUABELLOU Menal**

Synthèse, Analyse Structurale et Criblage Biologique de Nouveaux Complexes Organométalliques

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée

Résumé :

L'acide déhydroacétique ou le 3-acétyl-4-hydroxy-6-méthyl-2H-pyra-2-one est un produit industriel connu pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques. Le présent travail est consacré à la synthèse chimique de nouveaux complexes métalliques en utilisant l'acide déhydroacétique comme produit de départ, la réaction de ce dernier avec des métaux de transition tels que le cobalt, le nickel, le zinc et le manganèse conduit à la formation de complexes octaédriques colorés, ces complexes ont été structuralement analysés par des méthodes spectroscopiques usuelles Ultraviolet-Visible et Infrarouge. Des tests biologiques ont montré des résultats encourageants pour les activités antioxydantes suivantes: le piégeage du radical ABTS, la chélation des ions métalliques tels que le fer et le cuivre et l'inhibition de la peroxydation du β -carotène, ainsi qu'une forte activité inhibitrice de l'uréase. Ces résultats sont donc très prometteurs pour l'utilisation de ces complexes comme de potentiels candidats thérapeutiques.

Mots clés : Acide déhydroacétique, activité antioxydante, activité anti-uréase, méthodes spectroscopiques, complexes de métaux de transition.

Laboratoire de recherche : Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine. Laboratoire de Physicochimie Analytique et Cristallographie des Matériaux Organométalliques et Biomoléculaires, Université Frères Mentouri Constantine 1.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *NECIB Youcef* (Pr - UFM Constantine 1),
Rapporteur : *MOUAS Toma Nardjes* (MCA - UFM Constantine 1),
Co-encadreur : *DJEDOUANI Amelle* (Pr - ENS Constantine 3),
Examineur : *LEMOUI Redouane* (MCB - ENS Constantine 3).

Date de soutenance : 26/06/2019