

I. INTRODUCTION

On peut définir les antioxydants comme des molécules qui empêchent ou diminuent l'oxydation d'autres molécules. Une réaction d'oxydo-réduction, dont fait partie l'oxydation, assure le transfert des électrons d'une molécule donnée vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire à des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne à pouvoir destructeur.

Les antioxydants sont capables d'arrêter ces réactions en chaîne en s'oxydant, à leur tour, limitant ainsi l'action destructrice des radicaux libres. Ce sont les molécules des familles de thiols et phénols qui présentent le plus de ces propriétés.

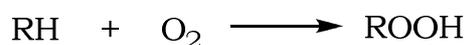
Même si l'oxydoréduction est nécessaire pour la vie, elle peut aussi être néfaste pour l'organisme. De ce fait, on parle d'antioxydants utilisés et produits par tout être vivant pour se protéger contre les oxydations. Les oxydants rentrent dans la catégorie des radicaux libres.

II. LES OXYDANTS

Les Radicaux Libres (oxydants)

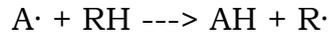
En chimie, les *radicaux libres* sont des entités chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés (électrons célibataires) sur leurs couches externes. Ils sont notés par un point '.'. Ils sont obtenus par rupture de liaisons chimiques. Cela peut arriver dans des cas de hautes températures, radiations ionisantes et ultraviolets. La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules une grande *instabilité* (elles ne respectent pas la règle de l'octet), ce qui signifie qu'elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés. Si l'instabilité est importante, l'électron libre est rapidement transféré sur une autre molécule. Le caractère radicalaire de la molécule ne disparaît pas et l'électron libre peut passer sur d'autres molécules, entraînant des phénomènes d'*oxydation en chaîne*. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation des lipides.

Le bilan de l'oxydation par l'oxygène moléculaire d'un substrat organique RH est le suivant :

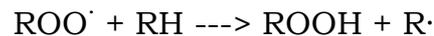
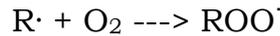


C'est une réaction radicalaire en chaînes dans laquelle les atomes d'hydrogène les plus labiles du substrat sont arrachés par des radicaux libres. On peut schématiser le mécanisme de la réaction comme suit :

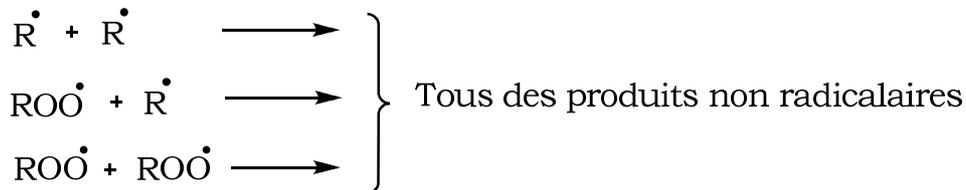
Amorçage : production de radicaux libres amorceurs A·



Propagation : réactions en général très rapides car les radicaux libres sont très réactifs.



Terminaison : réactions entre deux radicaux qui conduisent à la formation de produits stables.



Les additifs limitant l'oxydation peuvent intervenir à deux niveaux, à savoir dans la phase d'amorçage ou dans la propagation des chaînes. Ils peuvent aussi simplement consommer l'oxygène dans le milieu limitant l'oxydation : on les appelle alors parfois *antioxygènes*.

En biologie, le terme de radical libre est utilisé pour désigner les dérivés réactifs de l'oxygène, ou '*espèce réactive oxygénée*' (Reactive oxygen species : ROS), ou '*radicaux oxygénés libres*' ou '*dérivés réactifs de l'oxygène*'. Il s'agit d'une classe spécifique de radicaux. Les exemples sont : le radical superoxyde $\overset{\ominus}{O}_2\cdot$, le radical hydroxyle $\overset{\cdot}{HO}$, les radicaux peroxyde $ROO\cdot$, le radical alkoxyde $RO\cdot$ où R est une chaîne carbonée.

Les anions **superoxyde** :



(Oxygène moléculaire ionisé par addition d'un électron supplémentaire) sont des radicaux libres de durée de vie très brève, sont très toxiques pour les molécules biologiques, en particulier les *acides gras polyinsaturés*, sur lesquels ils produisent des peroxydations en chaîne.

Les *radicaux libres*, étant instables, agiront en prélevant des électrons ou atomes d'autres molécules pour s'associer. Ainsi, ils peuvent attaquer l'ADN, les enzymes, les protéines, les membranes cellulaires, ... Ces attaques peuvent être responsables des états suivants :

- disfonctionnement lors de la réplication de l'ADN entraînant des mutations et cancers.
- perturbations au sein des cellules pouvant conduire à leur mort.
- destruction des membranes cellulaires. Ceci peut entraîner le durcissement et l'épaississement des artères conduisant aux crises cardiaques.
- détérioration du collagène et rigidité des tissus.

. Les *radicaux libres* peuvent réagir entre eux pour mettre fin au processus radicalaire. C'est notamment le cas entre deux superoxydes (O_2^-) ou entre le superoxyde (O_2^-) et le monoxyde d'azote (NO) :

La réaction superoxyde-superoxyde (dismutation) engendre du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En effet, O_2^- est très oxydant ; il peut dismuter en H_2O_2 :



La réaction superoxyde-monoxyde d'azote produit du peroxynitrite (ONOO).

III. LES ANTIOXYDANTS

Les antioxydants protègent les cellules de notre organisme de certains dommages. Les dommages causés aux cellules surviennent naturellement à mesure que nous vieillissons. Ils peuvent également se produire en raison de l'exposition à des éléments tels que la pollution ou la fumée de cigarette. Les dommages causés aux cellules peuvent provoquer des maladies courantes, telles que les maladies cardiaques et le diabète. Une alimentation riche en antioxydants peut nous aider à réduire notre risque d'être atteint de ce type de maladies.

Ils sont naturellement présents dans les aliments sous la forme suivante :

- Une vitamine, comme les vitamines A, C ou E.

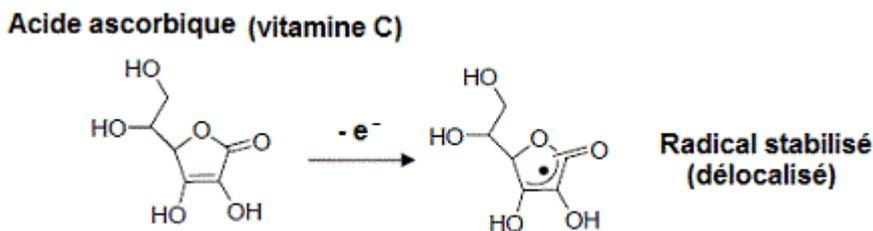
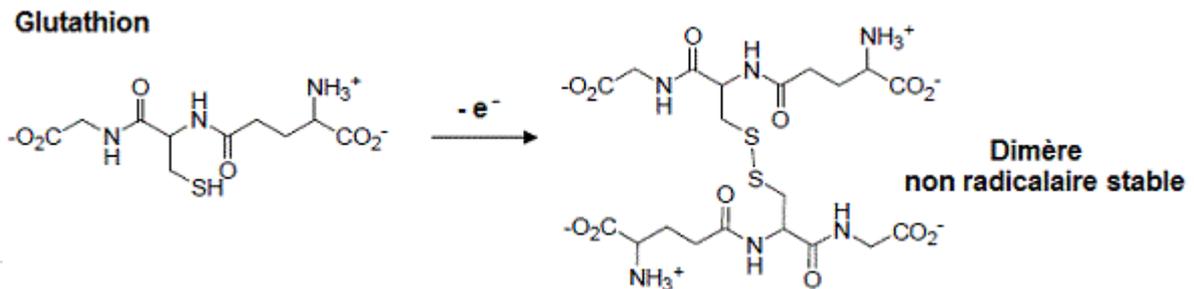
- Des substances d'origine végétale, comme les flavonoïdes et les caroténoïdes.
- Un minéral comme le sélénium.

On peut les classer en de deux types ; antioxydants non enzymatiques et des antioxydants de nature enzymatique.

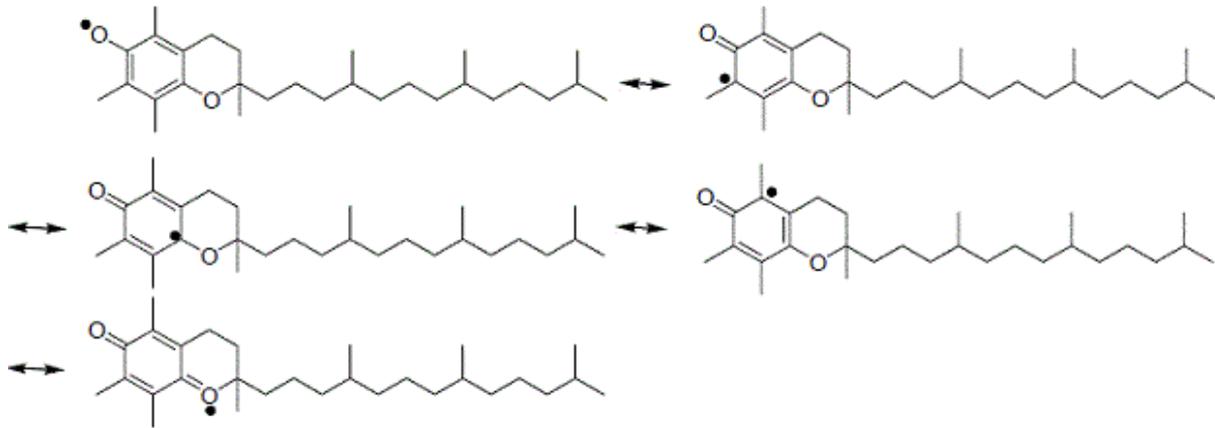
III.1. Antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques appartenant aux familles des phénols et des thiols. Plusieurs exemples peuvent être cités dont le *glutathion* (sous forme réduite -SH), la *vitamine C* (acide ascorbique, anti-oxydant hydrosoluble) et la *vitamine E* (tocophérol) à caractère lipophile. *Béta Carotènes, flavones et hydroquinones*. Notre organisme est capable de produire, à partir de la cystéine (acide aminé soufré), un antioxydant puissant, l'*acide alpha-lipoïque*, appelé encore lipoate.

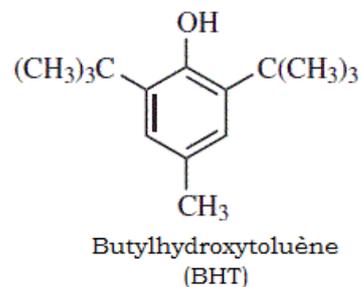
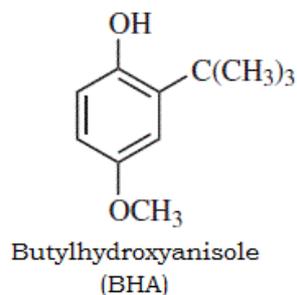
Exemples de Glutathion, acide ascorbique (vitamine C) et Tocophérol (vitamine E) :



Tocophérol oxydé (vitamine E)



Le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), les esters de l'acide gallique (gallate de propyle, gallate d'octyle et gallate de dodécyle) sont des antioxydants synthétiques lipophiles. Le BHA et le BHT sont les plus fréquemment utilisés. Ceux-ci sont principalement employés comme conservateurs, à faible concentration, dans les produits cosmétiques et alimentaires afin de protéger les lipides du rancissement. Néanmoins, leur utilisation reste controversée, les produits de dégradation du BHA et du BHT étant suspectés d'être cancérogènes.



III.2. Antioxydants de nature enzymatique.

Un stress oxydatif (ou oxydant) peut, aussi, résulter d'une déficience ou d'une absence de production d'enzymes antioxydantes. Il peut entraîner des dommages au niveau des cellules.

Pour lutter contre les radicaux libres, l'organisme peut faire appel à des enzymes comme la *peroxydase*, la *catalase*, la *superoxyde dismutase*, la *glutathione réductase* (enzyme utilisant NADH) et les enzymes produisant NADH. Elles vont limiter l'action des radicaux libres.

IV. L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

IV.1. Méthodes Analytiques Utilisées pour Evaluer l'Activité Antioxydante :

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) [28] ; les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) [29]; ou les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) [30], ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle) [31].

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester [32,33,34].

IV.1.1 METHODE DU RADICAL LIBRE DPPH•

Le Principe de la méthode est la réaction entre le radical libre DPPH• et l'antioxydant. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques [35,36]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Fig.4). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, i.e. DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à

une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

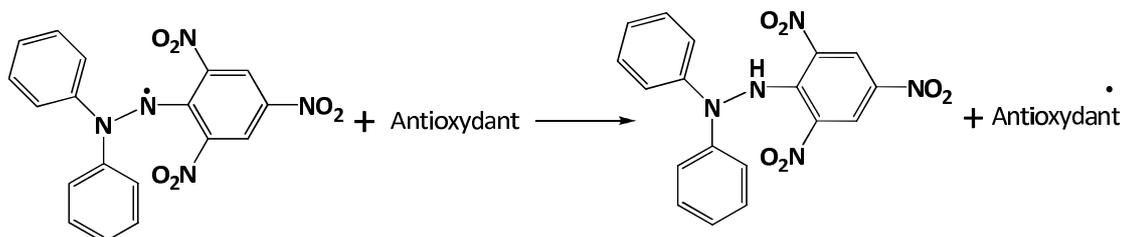


Fig4 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH• (2,2 DiPhényle-1-Picryl-Hydrazyle)

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, deux approches sont appliquées : d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH• à un temps de référence ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH• et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction [37,38].

Dans la première approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage % RSA (Radical Scavenger Activity), comme l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) à un temps t :

$$\% \text{ RSA} = \frac{(\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{st}})}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}} \times 100\%$$

Equation 1

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), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le TroloxR (acide-6-hydroxy-2, 5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E [39].

IV.1.2. METHODE FRAP

La méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter), un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, évalue la réduction du fer (le passage

de la forme ferrique à la forme ferreux) en présence d'un antioxydant. Une molécule change de couleur une fois qu'elle est réduite, ce qui permet la quantification par spectrophotométrie. Le test consiste à observer durant quelques minutes le changement d'absorbance à $\lambda=593$ nm et à pH acide, résultant de la réduction du complexe Fe(III). Les avantages de cette méthode sont qu'elle soit simple, rapide et peu coûteuse.

IV.2.1. Spectrophotomètre UV-visible

La spectroscopie ultraviolet-visible est une méthode souvent utilisée dans un mode quantitatif pour déterminer la concentration d'une entité chimique en solution, en utilisant la *Loi de Beer-Lambert* :

$$A_{\lambda} = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \varepsilon_{\lambda} \cdot \ell \cdot C.$$

Equation 2

où

- I/I_0 est la *transmittance* de la solution (sans unité),
- A est l'*absorbance* ou densité optique à une longueur d'onde λ (sans unité), ε_{λ} est le coefficient d'extinction molaire (en $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Il dépend de la longueur d'onde, de la nature chimique de l'entité et de la température. Cette constante représente une propriété moléculaire fondamentale dans un solvant donné, à une température et une pression donnée.

- ℓ est la longueur du trajet optique dans la solution traversée, elle correspond à l'épaisseur de la cuvette utilisée (en cm).

- C est la concentration molaire de la solution (en $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Dans le cas d'un gaz, C peut être exprimée comme un volume inverse (unités de longueur réciproque au cube, cm^{-3}).

Cette équation est utile pour la chimie analytique. En effet, si ℓ et ε_{λ} sont connus, la concentration d'une substance peut être déduite d'une simple mesure d'absorbance à cette longueur d'onde.

L'absorbance et le coefficient d'extinction ε_{λ} sont parfois définis avec les logarithmes naturels au lieu des logarithmes décimaux.

Cette loi est vérifiée lorsque la solution est de concentration inférieure à : $c < 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

La transmission T est définie comme le rapport de l'intensité transmise à l'intensité incidente.

$$T = I / I_0 ; \log T = -A.$$

Equation 3

V. RESULTATS ET DISCUSSIONS

VI.1. Test de réduction du radical stable, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) :

L'activité antioxydante de nos ligands synthétisés vis-à-vis du radical DPPH• a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par le passage de la couleur violette de la solution à la couleur jaune mesurable à 517 nm suivant la méthode de Gressler et all.(2010) [40]. L'activité antioxydante des échantillons a été exprimée en IC50. L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est faible, plus l'activité antioxydante est grande.

Pour la réalisation de ce test, on a préparé des solutions pour lesquelles on a dissout (10^{-4} mol) de chaque échantillon de nos tripodes synthétisés dans 1mL d'éthanol à 96%. Les différentes concentrations de nos solutions ont été préparées à partir des solutions mères.

Les dosages ont été effectués dans des microcuvettes où on a mélangé 1950 μL de la solution de DPPH• avec 1mL de la solution à doser. L'absorbance est mesurée après 30 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/vis Spectrophotometer, Optizen POP).

Nous avons calculé le % RSA à partir de l'équation 1. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Le pourcentage (%) d'inhibition du DDPH en fonction des concentrations des échantillons et de l'acide ascorbique à différentes concentrations après 30 min

Echantillons		Activités Antioxydante							
L1	Concentrations de l'échantillon (µg/mL)	1.45	2.18	3.63	7.27	14.55	21.82	29.1	
	Réduction du DPPH (%)	2.22	3.82	5.79	7.43	9.07	10.68	15.33	
	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)								/
L2	Concentrations de l'échantillon (µg/mL)	1.60	2.4	3.99	7.98	15.96	23.94	31.92	
	Réduction du DPPH (%)	8.11	23.71	27	51.32	56	56.94	58.81	
	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)								7.68
L3	Concentrations de l'échantillon (µg/mL)	1.59	2.39	3.99	7.98	15.97	23.95	31.94	
	Réduction du DPPH (%)	32.64	41.65	41.90	42.41	46.01	46.52	52.8	
	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)								25.12
L4	Concentrations de l'échantillon (µg/mL)	1.60	2.39	3.99	7.98	15.97	23.95	31.94	
	Réduction du DPPH (%)	25.60	33.42	35.57	41.23	46.36	47.97	49.59	
	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)								32
L5	Concentrations de l'échantillon (µg/mL)	1.73	2.60	4.34	8.68	17.37	26.05	34.74	
	Réduction du DPPH (%)	7.07	11.63	16.20	21.20	25.92	40.5	43.29	
	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)								36.12
L6	Concentrations de l'échantillon	1.80	2.71	4.51	9.03	18.07	27.11	36.14	

	($\mu\text{g}/\text{mL}$)								
L7	Réduction du DPPH (%)	1.34	2.09	5.68	9.26	8.81	9.26	10.01	
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)								/
	Concentrations de l'échantillon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.97	2.96	4.94	9.88	19.77	29.66	39.55	
L8	Réduction du DPPH (%)	43	60.06	81.91	86.68	89.76	91.80	99	
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)								2.38
	Concentrations de l'échantillon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2.17	3.25	5.43	10.85	21.71	32.57	43.42	
L9	Réduction du DPPH (%)	25.49	26.29	50.19	50.19	68.52	68.92	70.52	
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)								5.43
	Concentrations de l'échantillon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2.05	3.08	5.14	10.28	20.57	30.86	41.1	
L10	Réduction du DPPH (%)	11.51	18.26	30.61	36.51	37.35	39.81	41.01	
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)								
	Concentrations de l'échantillon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.97	2.96	4.94	9.88	19.77	29.66	39.55	
BHT	Réduction du DPPH (%)	0.45	3.05	5.95	8.54	11.14	14.04	17.55	
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)								
	Concentrations de l'échantillon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2.03	4.07	6.11	8.13	1.02			
	Réduction du DPPH (%)	8.12	31.14	46.15	61.46	81.91			
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)								6.29

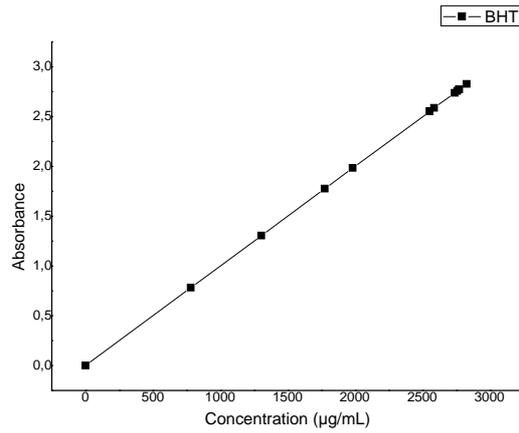


Fig 5 : Pourcentage d'inhibition BHT

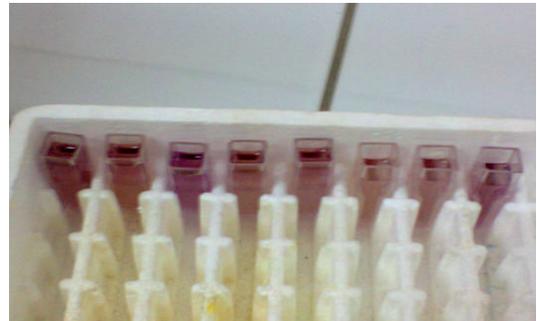
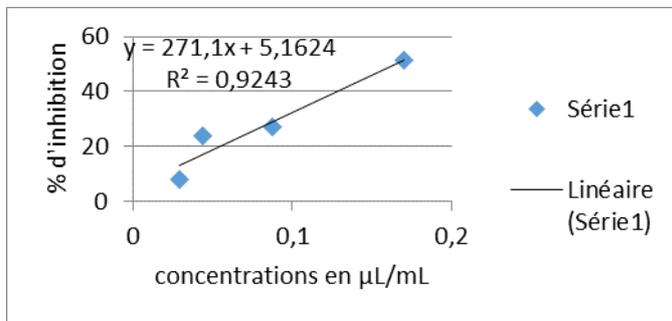


Fig 6: pourcentage d'inhibition de L2

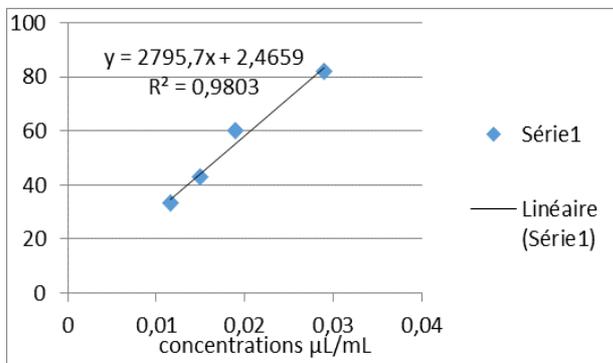


Fig 7: pourcentage d'inhibition de L7

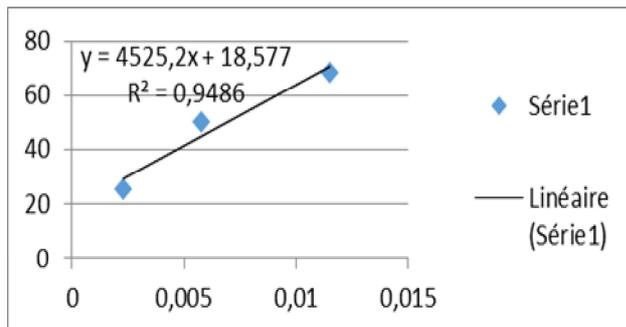


Fig 8: pourcentage d'inhibition de L8

D'après les résultats réunis dans le tableau 1, on constate que les ligands L1-L10 ont montrés une grande diversité dans leur capacité de piégeage du radical libre. Les ligands **L2** le 2-(bis((3,5-diméthyl-1*H*-pyrazol-1-yl)méthyl)amino)acétate de méthyle, **L7** le 2-(bis((3,5-diméthyl-1*H*-pyrazol-1-yl)méthyl)amino)-3-phénylpropanoate de méthyle et le **L8** le 2-(bis((3,5-diméthyl-1*H*-pyrazol-1-yl)méthyl)amino)-3-(1*H*-indol-3-yl)propanoate de méthyle étaient les plus actifs et pouvaient réduire le radical libre stable DPPH• en DPPH avec des IC50 respectivement de 7.68 µL/mL , 2.38 µL/mL et 5.43 µL/mL. Cependant, les ligands **L3**, **L4**, et **L5** avec des IC50 de 25.12 µL/mL, 32 µL/mL et de 36.12 µL/mL se montrent beaucoup moins actifs dans la réduction du radical DPPH. En comparant avec le BHT, les ligands L7 et L8 montrent une très bonne activité antioxydante. Ces molécules possèdent dans leurs structures des groupements aromatiques (Benzyle et Indole) riches en électrons.

VI.1. Méthode de réduction des ions ferreux FRAP

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe³⁺ présent dans le ferrocyanure de potassium en Fe²⁺. La réaction est illustrée par le passage de la couleur jaune de l'ion ferrique (Fe³⁺) en couleur bleu vert de l'ion ferreux. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrométrie à 700 nm.

Le Protocol expérimental utilisé est celui de Oyaizu et all. (1986) [41]. 125 µL de chaque solution à différentes concentrations sont mélangés avec 125 µL d'une solution tampon phosphate (pH= 7.1) et 125 µL de ferrocyanure de potassium à 1%. Les solutions ainsi préparées sont incubées à 50°C pendant 20 minutes puis ramenées à la température ambiante. Pour stopper la réaction, 125 µL de l'acide trifluoroacétique à 10% sont ajoutés à chaque solution. Les tubes contenant les différentes solutions sont placés dans une centrifugeuse à 3000 tours/ minute pendant 10 minutes. Par la suite, 125 µL du surnageant sont prélevés et ajoutés à 125 µL d'eau distillé et 25 µL de chlorure ferrique à 0.1%.

La décoloration de la solution confirme la réduction des ions ferriques en ions ferreux. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le témoin utilisé pour cette méthode est le BHT. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Résultats du pouvoir antioxydant par la méthode FRAP

		Concentrations des échantillons (µg/ml) et absorbance (nm)						
L1	Concentration	1.45	2.18	3.63	7.27	14.55	21.82	29.1
	Absorbance nm	0.028	0.028	0.051	0.062	0.086	0.19	0.20
L2	Concentration	1.60	2.4	3.99	7.98	15.96	23.94	31.92
	Absorbance nm	0.030	0.034	0.041	0.05	0.064	0.194	0.199
L3	Concentration	1.59	2.39	3.99	7.98	15.97	23.95	31.94
	Absorbance nm	0.035	0.037	0.044	0.052	0.076	0.103	0.204
L4	Concentration	1.60	2.39	3.99	7.98	15.97	23.95	31.94
	Absorbance nm	0.039	0.047	0.078	0.092	0.108	0.201	0.202
L5	Concentration	1.73	2.60	4.34	8.68	17.37	26.05	34.74
	Absorbance nm	0.053	0.062	0.085	0.099	0.125	0.163	0.200
L6	Concentration	1.80	2.71	4.51	9.03	18.07	27.11	36.14
	Absorbance nm	0.022	0.034	0.041	0.053	0.054	0.055	0.055
L7	Concentration	1.97	2.96	4.94	9.88	19.77	29.66	39.55
	Absorbance nm	0.020	0.021	0.028	0.031	0.034	0.039	0.045
L8	Concentration	2.17	3.25	5.43	10.85	21.71	32.57	43.42
	Absorbance nm	0.028	0.051	0.062	0.086	0.187	0.208	0.228
L9	Concentration	2.05	3.08	5.14	10.28	20.57	30.86	41.1
	Absorbance nm	0.082	0.090	0.115	0.174	0.184	0.192	0.204
L10	Concentration	1.97	2.96	4.94	9.88	19.77	29.66	39.55
	Absorbance nm	0.099	0.102	0.153	0.187	0.217	0.245	0.288

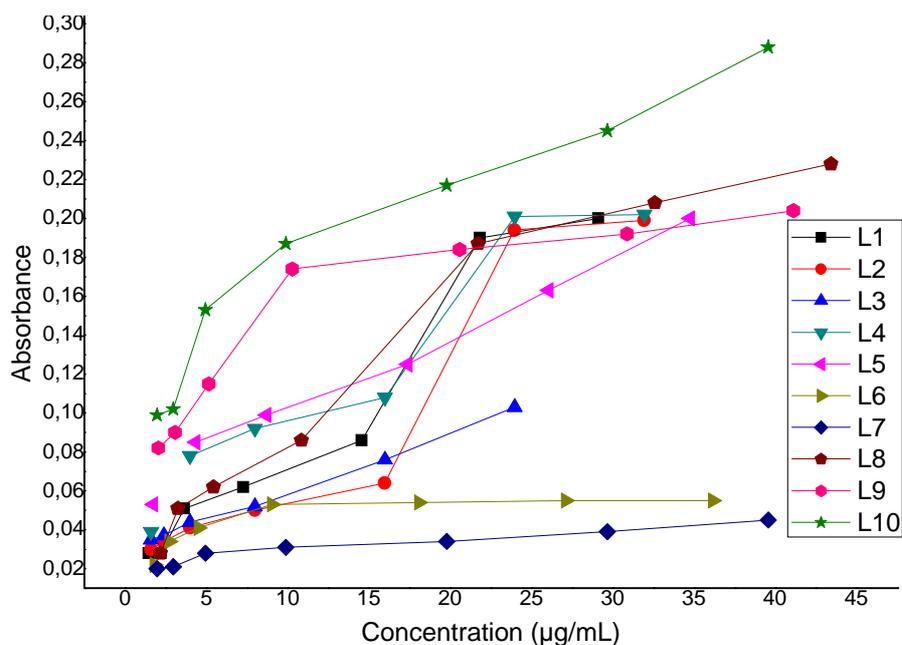


Fig 9 : Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP

Les résultats obtenus par la méthode FRAP montrent que l'absorbance augmente avec la concentration du ligand, ceci témoigne du pouvoir antioxydant de nos ligands. Pour les composés L7 et L8, la couleur a changé instantanément du jaune vers le bleu vert ce qui confirme que ces deux derniers possèdent une bonne affinité avec les ions ferriques.

L'activité antioxydante importante des ligands L7 et L8, déterminée par la méthode DPPH, a été confirmée par la méthode FRAP.