

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCEM
Faculté des Sciences

Département de Chimie
Laboratoire des substances naturelles et bioactives

(LASNABIO)

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de :
MASTER EN CHIMIE

Option : **Molécules Bioactives : Synthèses et Applications**

Présenté Par : M^{elle} Asmae ABDELLAOUI

Thème

**SYNTHESE ET ETUDE DE L'ACTIVITE
ANTIOXYDANTE DE STRUCTURES
BIPYRAZOLIQUES**

Soutenu le : 05/06/2016 Devant le jury

Présidente	Meriem BENYAROU	Pr.	Université de Tlemcen
Examineurs	Boufeldja TABTI	Pr.	Université de Tlemcen
	Chaouki SELLES	MC(A)	Université de Tlemcen
Promoteur	Nouria MERAD	MC(A)	Université de Tlemcen

Année-universitaire: 2015-2016

Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que : Je dédie ce travail de mémoire à :

A Ma tendre Mère : Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A Mon très cher Père : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de votre sacrifices que vous êtes consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

A mes sœurs, mes frères et mes belles sœurs (ainsi que leurs enfants) pour leur soutien moral et qui ne cessé pas de m'encourager et me conseillée. Je vous souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de sérénité.

A mon fiancé D.ilyes pour ton aide, tes conseils et tes encouragements.

A toute ma famille petits et grands ainsi qu'à mes chers amis. (sara, asmaa, imen, habiba.....)

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu pour m'avoir donné la santé, le courage et la volonté pour achever ce travail, qui a été réalisé au sein du laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives « LASNABIO » de la Faculté des Sciences, Université de Tlemcen.

Pour cela je tiens à remercier son directeur Pr. Saïd GHALEM ainsi que le chef de l'équipe de synthèse le Dr. Nouria MERAD pour toute l'aide et les conseils qui nous ont apportés

Nous adressons le grand remerciement à notre encadreur qui a proposé le thème de ce mémoire, pour ses conseils du début à la fin de ce travail. J'ai eu l'honneur d'être parmi vos étudiants et de bénéficier de votre riche enseignement. Vos qualités pédagogiques et humaines sont pour moi un modèle.

Votre gentillesse, et votre disponibilité permanente ont toujours suscité mon admiration. Veuillez bien madame recevoir mes remerciement pour le grand honneur que vous m'avez fait d'accepter l'encadrement de ce travail.

Nous tenons également à remercier Messieurs les membres de jury Pr. TABTI Boufedja et Pr. BENYAROU Meriem et Dr. SELLES Chouki pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance.

Mes gratifications les plus sincères pour Dr. DIB Mohamed El Amine, responsable de master MBSA, et toute l'équipe de formation de ce master.

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

Je remercie aussi Melle. BOUHASSANE Nadia spécialement pour l'aide qu'elle m'a apportée dans la réalisation de ce travail, de m'avoir orienté, aidé et conseillé avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

Tous mes remerciement pour Dr. Nour Eddine Missoum pour son aide et le soutien qui m'apporté au cours de ma formation au sein de laboratoire de synthèse.

Finalement, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à nos familles qui nous ont toujours soutenues et à tout ce qui ont participé à la réalisation de ce mémoire.

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Recherche Bibliographique	
I. Introduction	3
II. Recherche bibliographique	4
II.1. Méthodes de synthèse de quelques pyrazoles substitués	4
II.2. Activités biologiques de quelques composés pyrazoliques	6
Chapitre II Synthèse des Structures Pyrazoliques	
I. Introduction	10
II. Stratégie de synthèse	10
II.1. Synthèse des ligands L6, L7 et L10	10
II.2. Synthèse des ligands L8 et L9	10
III. Partie expérimentale	13
III.1. Synthèse de l'acétylpyruvate d'éthyle	13
III.2. Synthèse de 5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle	14
III.3. Synthèse du 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyle-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle	14
III.4. Synthèse 1,1'-(phenylazanediy) bis(méthylene)bis(5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate) de diéthyle. L6	15
III.5. Synthèse du 1,1'-(benzylazanediy)bis(méthylene)bis(5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate) de diéthyle L7	16
III.6. Synthèse du diethyl 1,1'-(2-hydroxyethylazanediy)bis(méthylene)bis(5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate)L10.	16
III.7. Synthèse du tetraethyl 1,1',1'',1'''-(1,4-phenylenebis(azanetriyl))tetrakis(méthylene)tetrakis(5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate)L8	17
III.8. Synthèse du tetraethyl 1,1',1'',1'''-(1,3-phenylene bis(méthylene))bis(azanetriyl)tetrakis(méthylene)tetrakis(5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate).L9	18
Chapitre III Activité anti oxydante de composés pyrazoliques	
I. Introduction	19
II. Stress oxydant	19
II.1. Espèces réactives de l'oxygène	19
II.2. Les Radicaux libres	19
III. Les systèmes antioxydants	21
III.1. Les Antioxydants Enzymatiques	21
III.2. Les Antioxydants non enzymatiques	22

IV. Activité anti oxydante	23
V. Méthodes analytiques utilisées pour évaluer l'activité anti oxydante	24
V.1. Méthode du radical libre DPPH [•]	24
V.1.1. Principe de la méthode	24
V.1.2. Principe du test	25
V.2. Méthode FRAP(Ferric Reducing Antioxidant Power)	26
V.2.1. Principe de la méthode	26
V.2.2. Principe du test FRAP	26
VI. Résultats et discussion	27
VI.1. Test de piégeage du radical libre DPPH [•]	28
VI.1.1. Première série	28
VI.1.2. Deuxième série	32
VI.1.3. Etude comparative des pouvoirs anti oxydants des ligands de la série 1 et de la série 2	35
VI.1.4. Calcul de l'Unité d'Activité Antioxydante AAU	35
VI.2. Test de la réduction du fer FRAP	36
VI.2.1. Première série	36
VI.2.2. Deuxième série	38
VI.2.3. Etude comparative	39
VI.2.4. ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTIVITE ANTI OXYDANTE DU (A) 1- (hydroxyméthyl)-5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle et (3,5-diméthylpyrazol-1-yl) méthanol (B)	40
VII. conclusion	42
Conclusion générale et perspectives	43

Introduction générale

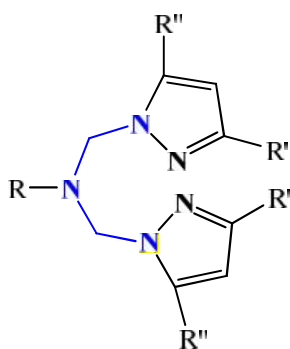
Depuis des années les pyrazoles ont pris une grande place dans la chimie des hétérocycles et cela est dû à leur large spectre d'activités biologiques. Ce sont des groupes aromatiques simples de la série des diazoles.

L'intérêt du pyrazole vient du fait qu'il soit présent dans une variété de molécules ayant des activités pharmaco-biologiques démontrées au part avant. Ils sont utilisés pour leurs activités : anti tumorale, anti microbienne, anti oxydante, anti proliférative, anti inflammatoire, neuroprotective, etc. [1]

Les hétérocycles à cinq chaînons sont des composés importants en chimie organique. Ils sont rencontrés dans une grande variété de produits bioactifs naturels ou d'origine synthétique, et ce sont également des intermédiaires très intéressants en synthèse organique.

Les pyrazolones sont très célèbres par leurs pouvoir analgésique, anti pyrétiq, et leurs propriétés anti inflammatoires et aussi bien leurs activités anti tumorales et hypoglycémiantes. Depuis des années le piègeur de radicaux libres (3-méthyl- 1-phényl -2- pyrzolin- 5- one) est utilisé comme agent neuroprotecteur dans le traitement des infractions cérébrales dans plusieurs pays du monde ; un nombre de pyrazolones est aussi produit comme herbicides. [2]

Vue l'intérêt biologique de ces structures à base de pyrazole, nous nous sommes particulièrement intéressés dans ce travail à la synthèse de ligands tripodales à base de pyrazole. Les tripodes pyrazoliques se caractérisent par la présence de deux atomes d'azote pyrazolique sp^2 et un atome d'azote aminique sp^3 . Les deux pyrazoles peuvent être liés à la chaîne latérale par l'intermédiaire de l'azote pyrazolique ; dans ce cas on a des tripodes à jonction N-C-N (figure 1) ou par l'intermédiaire d'un carbone tripodes à jonction N-C-C.



Tripode bipyrazolique à jonction N-C-N

Figure 1

Ce travail se situe à l'interface entre la Chimie et la Biologie. Il concerne plus précisément la synthèse de structures tripodales à base de pyrazoles substitués par un groupement fonctionnalisé et l'évaluation de leur activité antioxydante.

L'objectif de notre étude est de synthétiser des ligands pyrazoliques à jonction N-C-N possédant un groupement ester en position 3 sur le cycle pyrazolique et d'évaluer leurs

propriétés anti oxydantes par les deux méthodes analytiques ; méthode DPPH et méthode FRAP.

Ce travail s'articule autour de trois chapitres.

Dans le **premier chapitre**, on a fait un rappel bibliographique sur quelques méthodes de synthèse des pyrazoles fonctionnalisés, par diverses réactions de cyclocondensation de dérivés d'hydrazine et les composés 1,3-dicarbonylés. Ce chapitre inclut également quelques rappels portant sur l'intérêt biologique des structures pyrazoliques.

Le deuxième chapitre est consacré à la synthèse et la caractérisation des ligands obtenus par condensation d'amines avec le pyrazole. Ces tripodes sont caractérisés par la présence d'une jonction N-C-N (pyrazole) et d'une chaîne latérale comportant un groupement aryle qui leur confèrent un intérêt certain.

Dans le troisième chapitre, nous avons fait une évaluation de l'activité anti oxydante des ligands synthétisés au laboratoire moyennant les deux méthodes analytiques : la méthode de réduction du radical libre DPPH et la méthode de réduction de l'ion ferrique en ion ferreux FRAP.

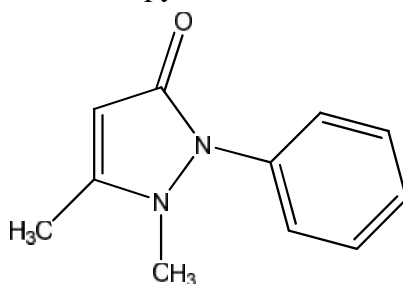
Nous terminerons par une conclusion générale et perspective.

Recherche Bibliographique

I. INTRODUCTION

Les pyrazoles ont une illustre histoire ; en 1883, un chimiste allemand Ludwig Knorr a été le premier à découvrir l'activité antipyrétique du dérivé du pyrazole chez l'homme, il a nommé ce composé l'antipyrine. Cette structure a été obtenue accidentellement quand il a tenté de synthétiser des dérivés de la quinoléine ayant une activité antipyrétique, antipyrine.

Le 2,3-diméthyl-1-phényl-3-pyrazoline-5-one a une activité antipyrétique, analgésique et antirhumatismale. Ceci a stimulé l'intérêt du pyrazole en chimie (figure 2) [3].



2,3-diméthyl-1-phényl-3-pyrazoline-5-one (Antipyrine)

Figure 2

Le motif pyrazole est rare dans la nature. Le premier dérivé pyrazolique naturel a été isolé par des chercheurs japonais Kosuge et Okeda en 1954. Jusqu'à leur découverte, on pensait que les pyrazoles ne pouvaient être obtenus naturellement. Ils ont isolé 3-éthyl-1*H*-pyrazole (a) à partir de *Houttuynia cordata*, une plante des «pipéracées» famille d'Asie tropicale; laquelle a montré une activité antimicrobienne. Ils ont également isolé la 1-pyrazolyle-alanine (b), un acide aminé, à partir de graines de pastèque (*Citrullus vulgaris*) (figure 3) [3].

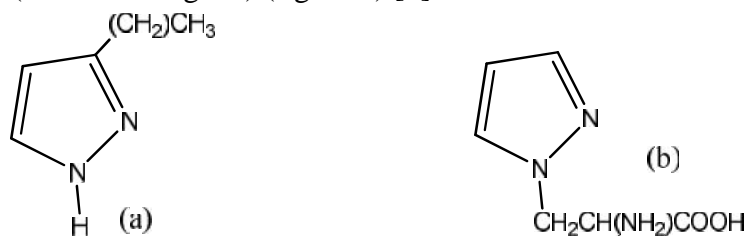


Figure 3

Les pyrazoles sont une classe importante des composés hétérocycliques et jouent un rôle important dans la chimie médicinale. Une grande attention a été portée aux composés contenant dans leurs structures le motif pyrazole. Ces derniers constituent une importante classe de composés biologiquement actifs. En effet, ces composés sont utilisés comme agents antinéoplasiques, anti-inflammatoires, antipsychotiques, antimicrobiens, antiviraux, analgésiques.

Plusieurs travaux récents ont suggéré les dérivés pyrazoliques comme agent anticancéreux prometteur indiquant leur utilisation dans le développement de nouveaux agents anti-cancéreux [4]. Les 1,3-diphényl pyrazoles ont montré une très bonne efficacité cytotoxique (figure 4) [5]

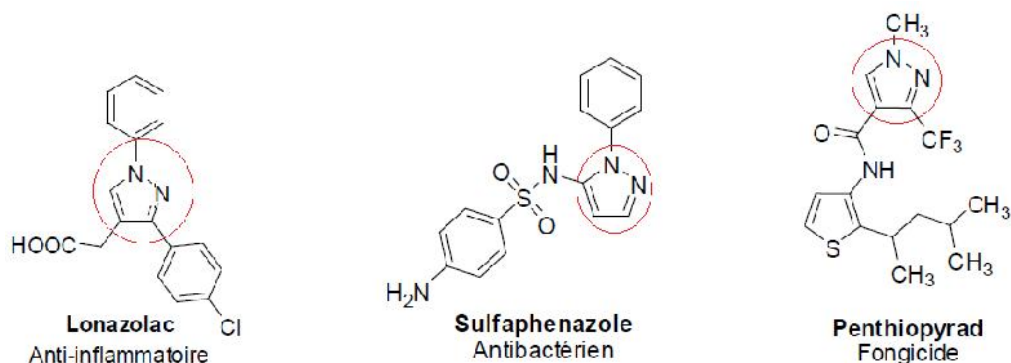


Figure 4

Aussi, beaucoup de pyrazoles sont impliqués dans les processus d'une importance vitale, des antagonistes de récepteurs, des inhibiteurs de divers types de kinases, etc.

Par exemple, la phénylbutazone est utilisée pour le traitement des formes assez complexes de l'arthrite, et la métamizole est bien connue comme analgésique (figure 5) [6].

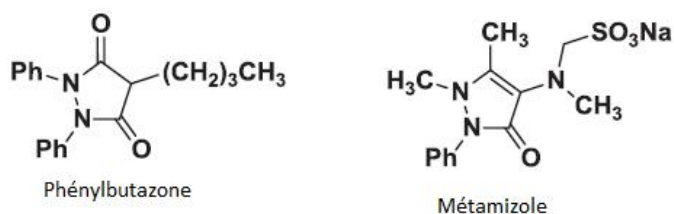


Figure 5

Le large éventail d'activités biologiques associées au pyrazole a fait de lui un synthon important dans le domaine de la chimie organique. De nombreuses méthodes ont été développées pour la préparation de pyrazoles substitués.

Dans ce chapitre, nous allons donner un aperçu bibliographique sur un certain nombre de composés comportant dans leur structure le motif pyrazole et possédant des activités biologiques ainsi que quelques méthodes de synthèse de pyrazoles substitués.

II. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. METHODES DE SYNTHESE DE QUELQUES PYRAZOLES SUBSTITUES

La synthèse de Knorr du pyrazole est une réaction organique qui fait réagir l'hydrazine ou un de ces dérivés avec le composé 1,3-dicarbonylé, en milieu acide (schéma 1) [7]

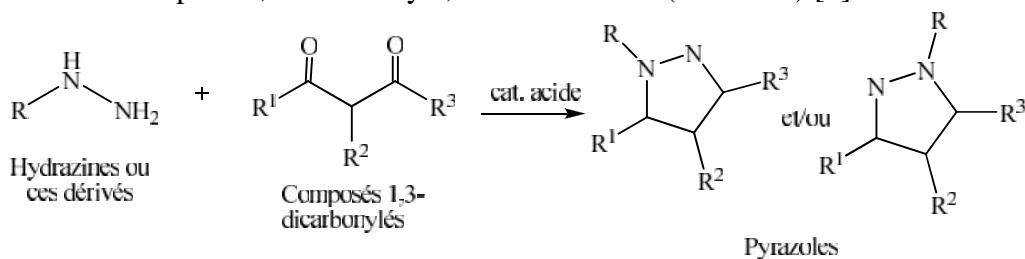


Schéma 1

X. Zhang et coll. ont préparé une variété de pyrazole di-, tri-, et tétrasubstitués (aryl, alkyl, et/ou vinyl) à partir des aldéhydes/cétones α,β -insaturés et les sels d'hydrazine. C'est une réaction qui se fait en une seule étape (schéma 2) [8].

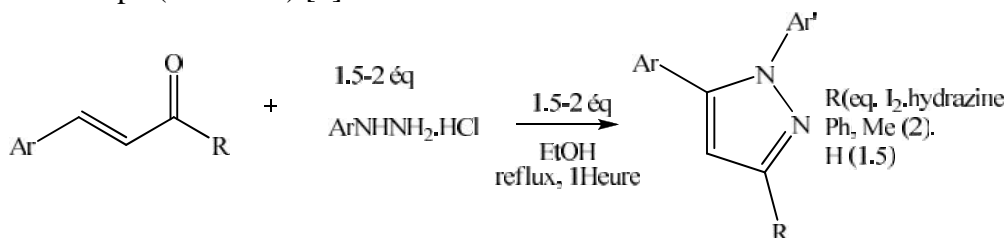


Schéma 2

Une importante synthèse régiosélective du pyrazole 1-aryl-3,4,5-substitués basés sur la condensation du 1,3-dicétone avec une arylhydrazine, effectuée à température ambiante dans le *N,N*-diméthylacétamide a été proposé par Grosselin et coll. Les composés sont obtenus avec de bons rendements et une bonne régiosélectivité (Schéma 3) [9].

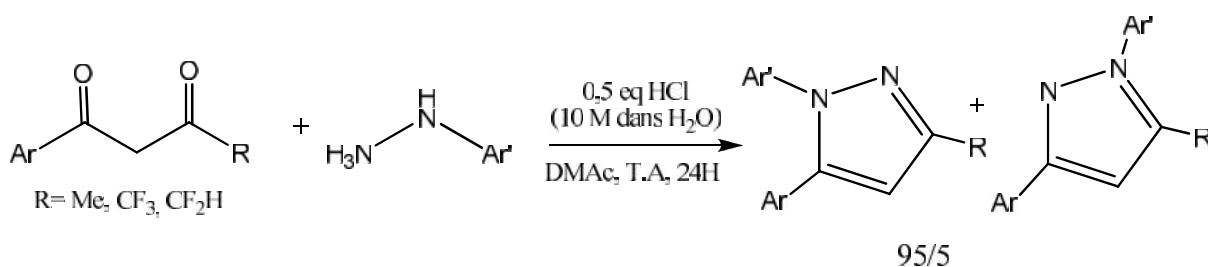


Schéma 3

Des séries de 1H-pyrazole-5-carboxylate d'éthyle substitué en position 4 ont été préparé par une réaction de cycloaddition de l'énaminodicétone avec le chlorhydrate du tert-butylhydrazine ou le carboxyméthylhydrazine. La réaction est régiosélective et les composés sont obtenus avec de très bons rendements (schéma 4) [10].

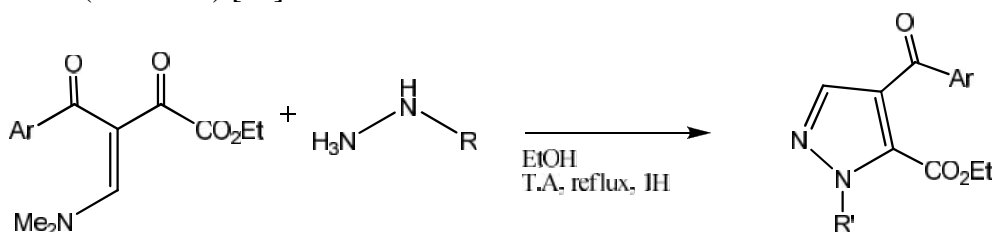


Schéma 4

La synthèse de pyrazoles polysubstitués à partir de phénylhydrazines et la but-2-ynedioate d'alkyle en présence de cuivre comme catalyseur a été réalisé par C. Ma et all en 2011. La réaction est facile et les composés sont obtenus avec des bons rendements (schéma 5) [11].

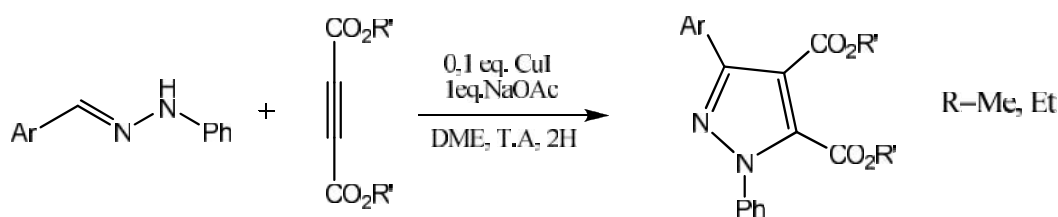


Schéma 5

II.2. ACTIVITES BIOLOGIQUES DE QUELQUES COMPOSES PYRAZOLIQUES

Maggio et coll. ont synthétisé et étudié l'activité anti-inflammatoire d'une série de composés à base de pyrazole (figure 6). Ces composés ont montré une bonne activité anti-inflammatoire [12].

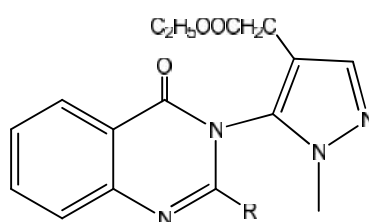


Figure 6

Bekhit et Abdel-Aziem ont préparé des séries de dérivés du 1H-pyrazole et des composés réputés pour leurs activités analgésique et anti-inflammatoire (figure 7). Certains de ces composés ont montré une activité anti-inflammatoire sans ou avec un minimum d'effet ulcérogénique en comparant avec des médicaments standards comme l'indométacine qui est un inhibiteur sélectif envers la COX-2 [13].

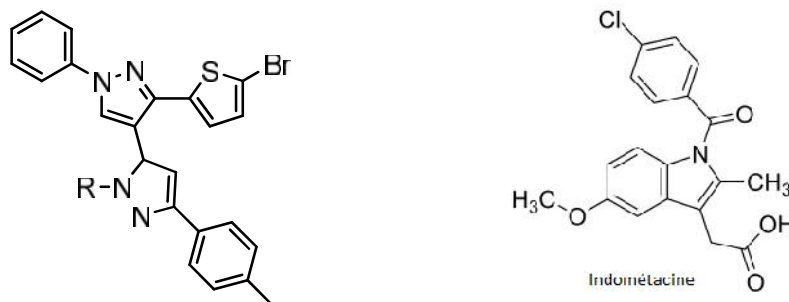


Figure 7

Amir et Kumar ont décrit l'activité anti-inflammatoire des dérivés du 3,5-diméthylpyrazole et le 3-méthylpyrazole-5-one (figure 8). La plupart de ces dérivés se sont avérés être de bons analgésiques [14].

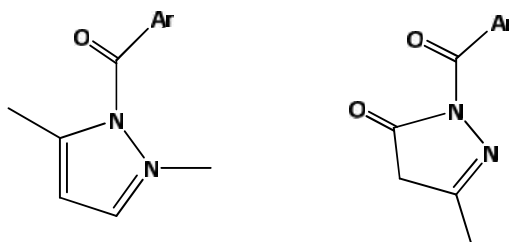


Figure 8

L'activité hypoglycémique de l'acide pyrazole-4-carboxylique -3- substitué (a) a été étudiée par Cottineau et Coll. Les résultats de cette étude indiquent que l'acide 3-méthoxy-1H -pyrazole- 4-carboxylique (b) (figure 9) se confirme comme le meilleur agent antiglycémique [15].

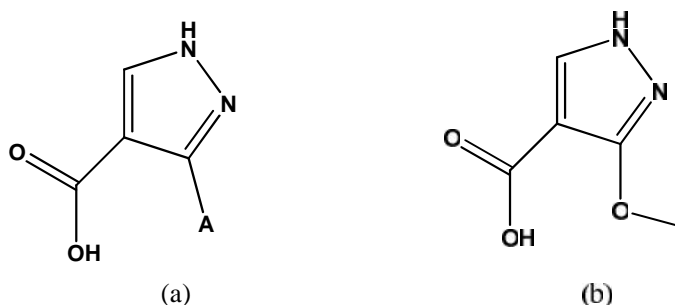


Figure 9

En 2009, un très grand nombre de composés pyrazoliques a été synthétisé et les résultats des tests biologiques ont dévoilé que le 5-méthyl-2-(5-méthyl-1,3-diphényl-1H-pyrazole-4-carbonyl)-2,4-dihydro-pyrazol-3-one (a) se montrent le plus actif dans la réduction du radical DPPH[•] donc la meilleure activité antioxydante pour cette série de composés (figure 10).

Une étude théorique structure-réactivité a confirmé les résultats expérimentaux [16].

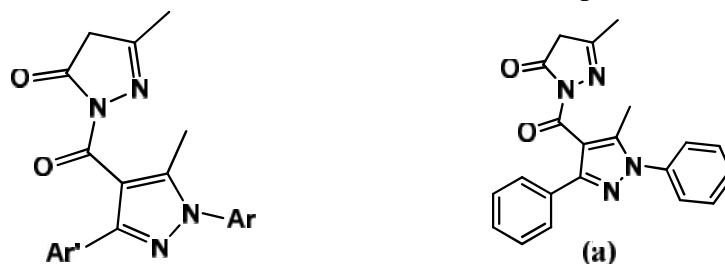


Figure 10

En 1965, Gerritsen et Dulin ont découvert que le 3,5-diméthylpyrazole, comme un agent hypoglycémique administré par voie orale, était cinquante-quatre fois plus efficace que le Tolbutamide en injectable sur les rats (figure 11) [17].

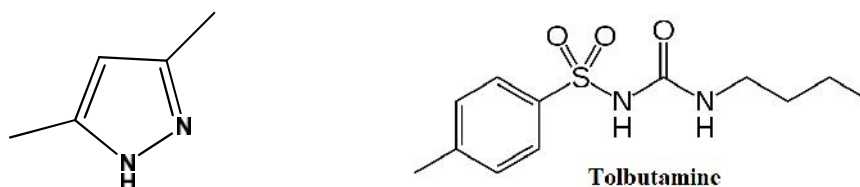


Figure 11

L'activité anticancéreuse du tripode N,N-bis[(3,5-diméthylpyrazol-1-yl) méthyl]aniline a été étudiée par Bouabdallah et coll. Ces structures ont montré une remarquable activité cytotoxique envers deux cellules tumorales (figure 12) [18].

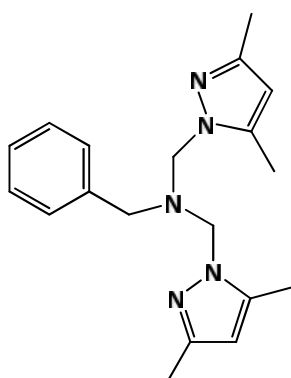


Figure 12

Tariq harit et coll. [19] ont mis en évidence trois nouveaux ligands tridentés à base de pyrazole le 2-(bis((3,5-diméthyl-1H-pyrazol-1-yl)méthyl)amino)éthanol, N,N-bis((3,5-diméthyl-1H-pyrazol-1-yl)méthyl)cyclohexanamine et le 2-(bis((1,5-diméthyl-1H-pyrazol-3-yl)méthyl)amino) (figure 13). Ces nouveaux composés, avec le produit de base qui est le 1- hydroxyméthyl-3,5 diméthyle pyrazole, ont été testés comme inhibiteurs contre une variété d'enzymes hyperactives qui est l'uréase, l'acétylcholinestérase, l'-chymotrypsine, la buturylcholinestérase, la -glucuronidase et la phosphodiétrase.

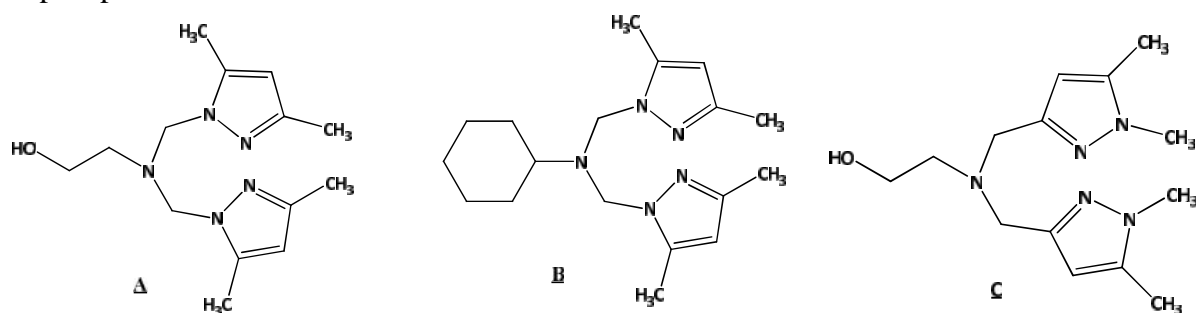


Figure 13

Cette série de tripode montre une activité significative contre l'uréase et la buturylcholinestérase. Elle est 10 fois plus importante que celle contre le -glucuronide. Apparemment la nature de la chaîne latérale n'a aucune influence sur l'activité inhibitrice de ces trois tripodes contre l'uréase. Cependant le composé **B** s'avère être un faible inhibiteur de la -glucuronide. Ceci est éventuellement dû à la nature de la chaîne latérale. Dans ce cas, le cyclohexyle peut avoir des interactions hydrophobes avec le site actif de l'enzyme.

Toutefois, le tripode **C** qui diffère du tripode **A** par la nature de la jonction qui lie les deux pyrazoles, montre une activité sélective contre la buturylcholinestérase. Il est à noter qu'il est inactif contre l'uréase et les autres enzymes citées ci-dessus. Les résultats de ces tests montrent que dans ce cas, l'activité inhibitrice de ces tripodes dépend de la nature de la jonction entre les deux pyrazoles.

Deux composés pyrazoliques ont été synthétisés par M. El kodadi et coll. [20] par condensation du (3,5-diméthyl 1H-pyrazol-1-yl) méthanol **3** ou l'éthyl 1-(hydroxyméthyl-5-méthyl-1H-pyrazol-3-carboxylate **4** avec un équivalent de l'amine (4-aminobutane ou 2-aminoéthanol). Deux méthodes

ont été utilisées ; la première à température ambiante dans l'acétonitrile pendant 4 jours et la deuxième sans solvant à 65°C pendant 3 heures (schéma 6).

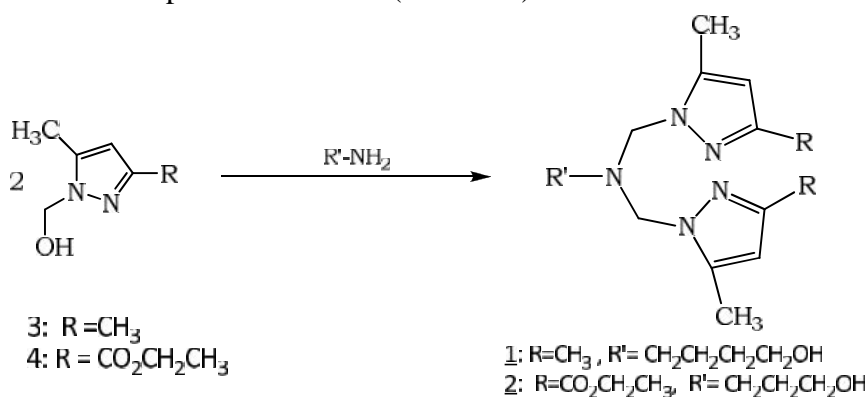


Schéma 6

Une évaluation des propriétés cytotoxiques de ces ligands a été réalisée contre deux cellules tumorales. Les études statistiques ont montré que le composé **2** est deux à trois fois plus cytotoxique que le composé **3**. Il est intéressant de noter que l'activité cytotoxique dépend des substituants fixés sur le cycle pyrazolique.

Connaissant l'intérêt de ces structures à base de pyrazole dans le développement de composés ayant des activités hypoglycémique, analgésique, anti-inflammatoire, antimicrobienne, antioxydante, antitumorale..., nous nous sommes intéressés dans ce travail de master à la synthèse de structures tripodales à base de pyrazole substitué par des groupements fonctionnalisés et à l'évaluation de leur activité antioxydante moyennant deux méthodes à savoir la méthode DPPH[•] et la méthode FRAP.

Synthèse de Structures Pyrazoliques

I. INTRODUCTION

Ce chapitre est consacré à la synthèse de composés tridentés. La méthode de synthèse repose essentiellement sur la création des liaisons azote-carbone-azote. Ces structures possèdent un azote central hybridé en sp^3 auquel sont liés deux pyrazoles. Les structures que nous synthétisons portent sur leur bras latéral un composé aromatique excepté le ligand 10. Les pyrazoles sont substitués en position 3 par un groupement ester éthylique.

Un très grand nombre de composés tridentés a été synthétisé en modifiant la nature des amines et des substituants sur le pyrazole. Différentes conditions expérimentales ont été exploitées en utilisant trois méthodes différentes : dans un solvant, sans solvant ou sous micro-onde.

II. STRATEGIE DE SYNTHÈSE

Dans le présent travail, on a synthétisé une série de ligands de structures tripodales qui consiste particulièrement à la création de la jonction azote – carbone – azote. La synthèse de ces composés consiste en une bi ou tétra condensation entre deux / quatre équivalents du précurseur de base 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle **1** et un équivalent de l'amine ou la diamine appropriée.

II.1. Synthèse des ligands L6, L7 et L10 (schéma 7) :

Les ligands L6 et L7 ont été synthétisés selon la méthode décrite par M. Daoudi [21]. Ainsi la condensation de deux moles de 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle **1** avec une mole d'amine primaire dans l'acétonitrile pendant cinq jours conduit aux ligands L6 et L7. Les tripodes synthétisés ont été isolés avec des rendements variant entre 65 et 85%.

Les spectres IR des deux composés montrent la disparition des bandes correspondantes aux vibrations N-H, ce qui montre que les amines primaires ont participé totalement à la réaction.

La synthèse du ligand L10 a été faite selon la méthode décrite par M.El Kodadi [22], consiste en une bicondensation entre deux équivalents de 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle **1** et un équivalent de l'éthanolamine. La réaction est menée une fois à température ambiante dans l'acétonitrile pendant 4 jours et une autre fois à 65°C pendant 3 heures. Le produit est obtenu avec un très bon rendement (80 à 90%) (Schéma7).

II.2. Synthèse des ligands L8 et L9 (schéma 8) :

Le L8 et le L9 sont obtenus par condensation de quatre moles de 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyl-1*H*-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle **1** avec une mole de paraphénylènediamine dans le cas du ligand L8 [M.Daoudi][21] ou le métaxylylènediamine dans le cas du ligand L9 [23] dans l'acétonitrile à température ambiante pendant cinq jours.

Les spectres IR des produits isolés montrent bien la présence d'une bande d'intensité moyenne au environ de 3150-3400 cm^{-1} correspondant à la bande de vibration ν_{N-H} , Ceci montre que la diamine n'a pas totalement participé à la réaction. On a prolongé le temps de la réaction à 7 et 8 jours, les tripodes L8 et L9 ont été isolés avec un rendement de 75 à 77%.

L'absence des bandes correspondantes aux vibrations N-H confirme la tétra condensation (schéma 8). Les réactions menées à 65 °C pendant 5 heures ont donné de faibles rendements.

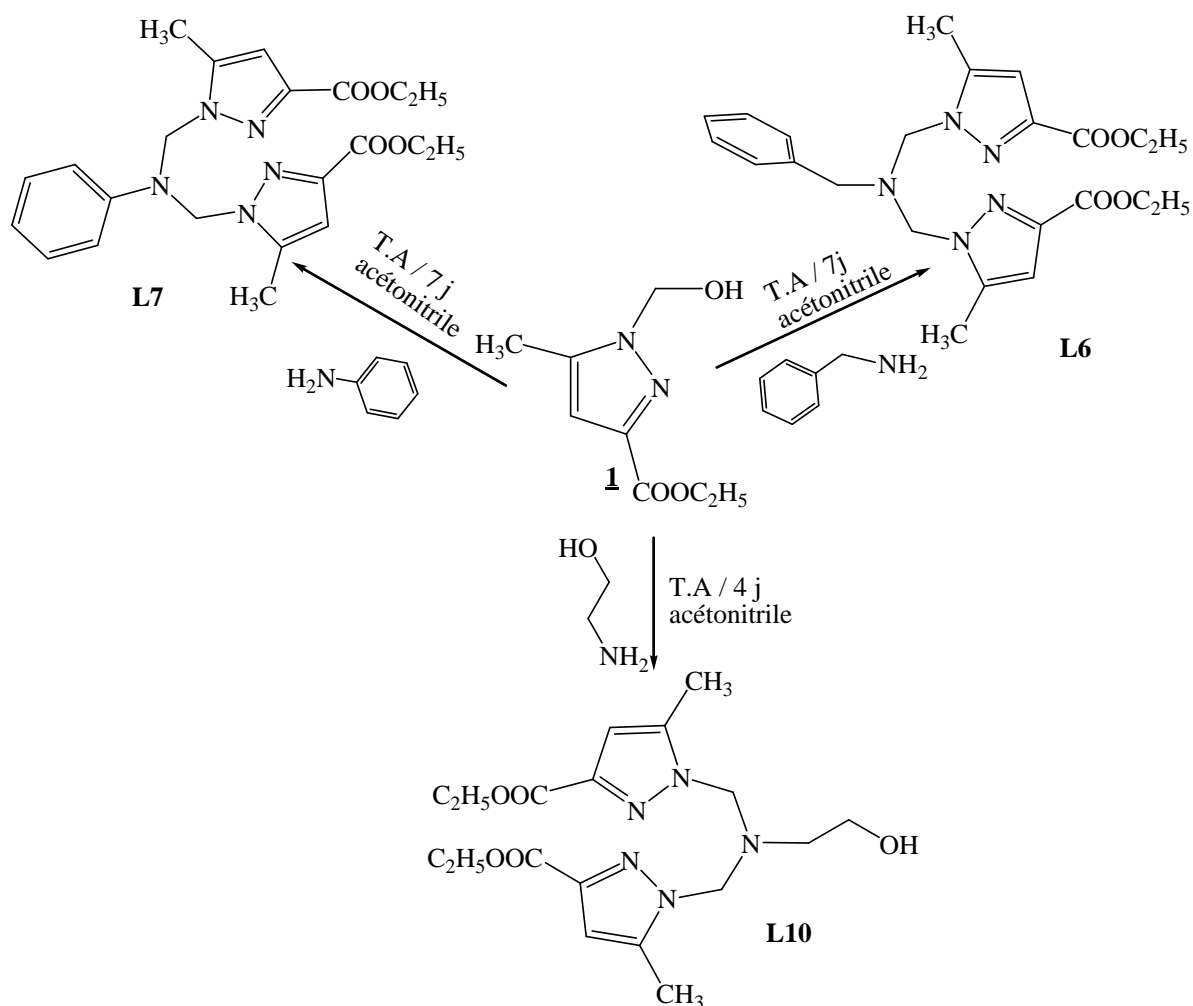


Schéma 7

Pour réaliser la synthèse des différents composés de cette série, nous avons d'abord préparé le précurseur de base qui est le 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle **1**. Ce précurseur est obtenu à partir du 5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle **1'**. Nous avons préparé ce dernier par condensation de l'acétyl pyruvate d'éthyle avec l'hydrazine hydratée selon le mode opératoire décrit dans la littérature. [24,25] (schéma 9)

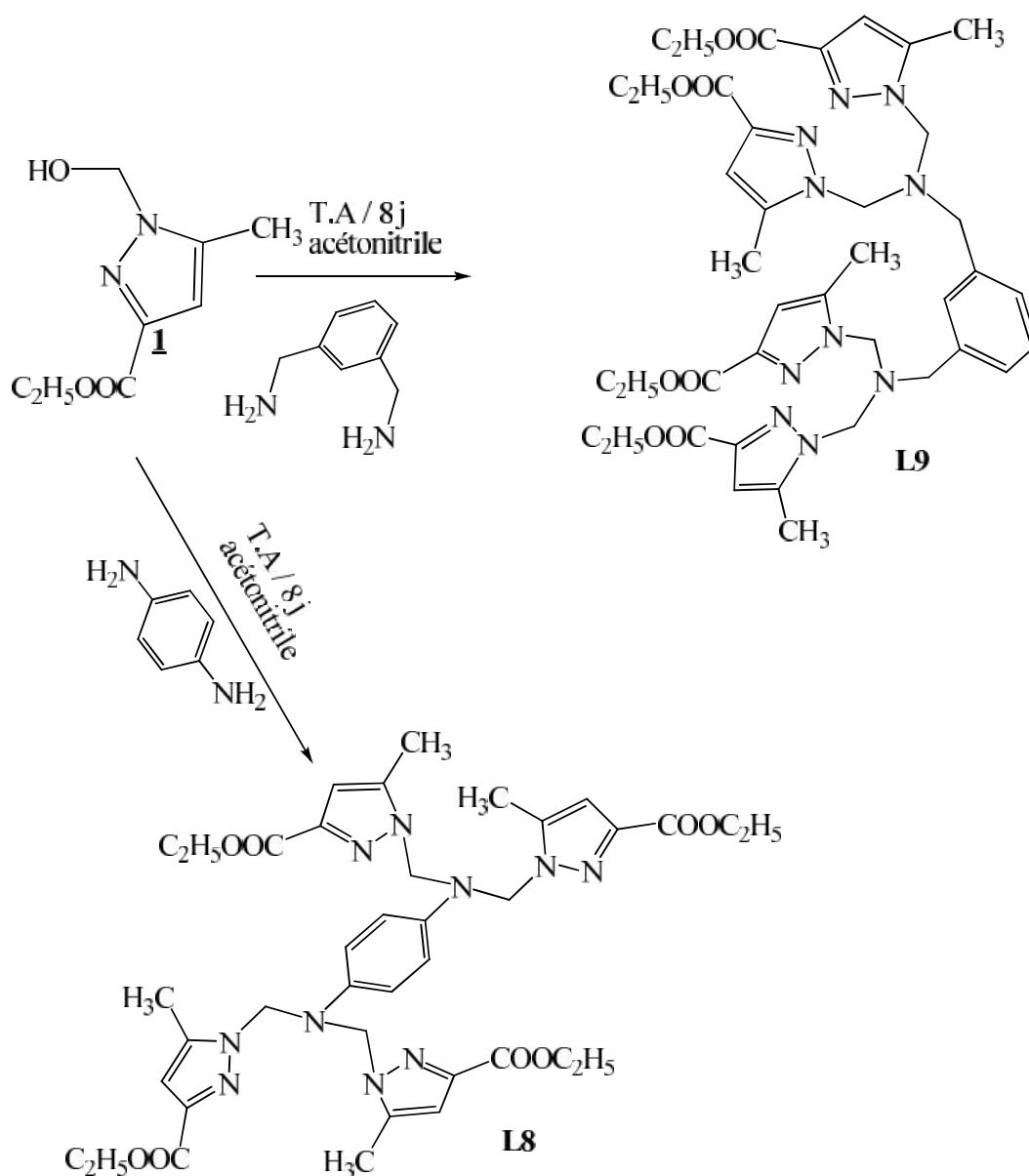


Schéma 8

Toutefois nous avons préparé le 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle par condensation du formol sur le 5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle dans l'éthanol à reflux pendant une heure, ensuite le mélange réactionnel est laissé à température ambiante pendant 12 heures. Le produit est isolé avec un rendement de 55%.

L'acétyl pyruvate d'éthyle est obtenu en additionnant un mélange d'oxalate d'éthyle et d'acétone à l'éthanolate de sodium. La réaction est réalisée dans un bain de glace à une température inférieure à 10°C (Schéma 9). Pendant l'addition le mélange s'épaissit et l'agitation devient difficile. Le sel d'acétylpyruvate d'éthyle est acidifié jusqu'au pH = 2. L'acétylpyruvate est obtenu avec un rendement de 60%. (Schéma 9)

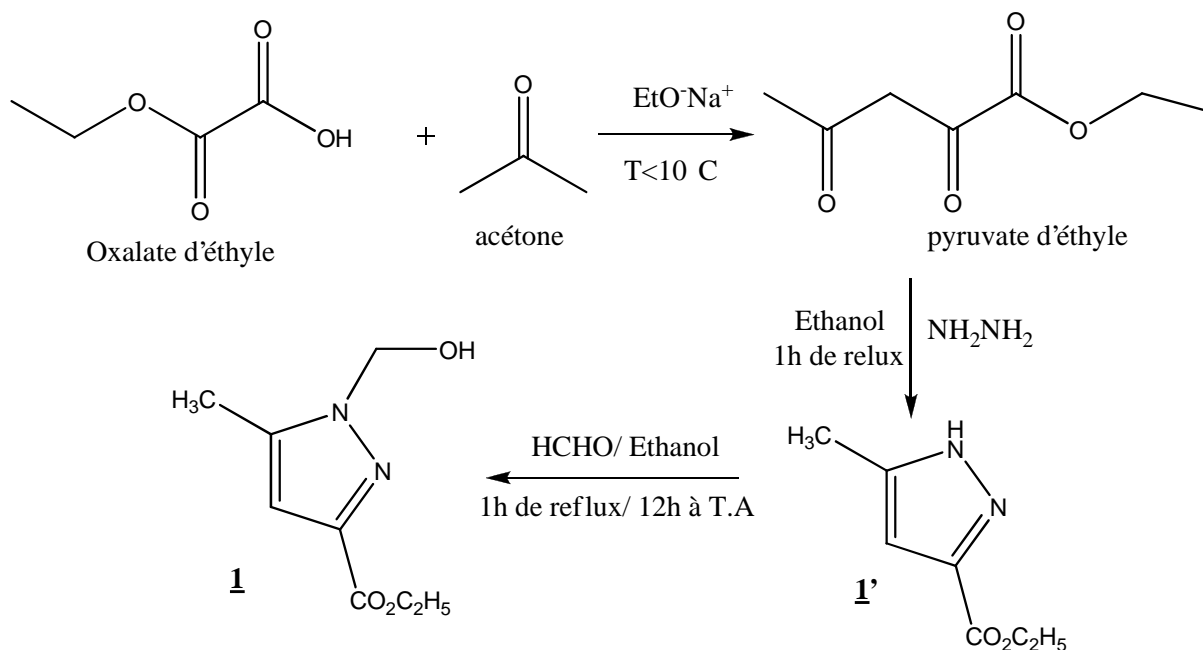


Schéma 9

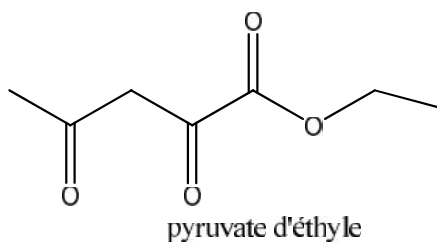
Le composé **1** est obtenu avec un rendement de l'ordre de 50 à 55% et le **1'** avec un rendement de 85%.

Le spectre IR du composé **1**, montre bien l'apparition de la bande O-H vers 3100 cm^{-1} et la disparition de la bande N-H vers $3140\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$. Le composé fond entre $54\text{-}56^\circ\text{C}$.

III.PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres IR ont été enregistrés sur un appareil Perkin Elmer Spectrum two et les points de fusion ont été pris sur un banc Koffler au laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen.

III.1. Synthèse de l'acétylpyruvate d'éthyle



Dans un ballon tricol de 500 mL, équipé d'un réfrigérant et d'un barreau magnétique, placé dans un bain de glace, on ajoute par petite portion 5,75g (0,25mol) de sodium métallique à 150 mL d'éthanol absolu. Le mélange est maintenu à une température inférieure à 10°C . Une fois le sodium dissout, on ajoute goutte à goutte un mélange de 36,5g (0,25mol) d'oxalate d'éthyle et 14,5 g (0,25mol) d'acétone. On remarque l'apparition d'un solide de couleur jaune. Après une heure d'agitation, on filtre la poudre fine sous verre fritté. On lave 3 fois avec 15 mL d'éthanol. Le produit obtenu est ensuite dissout dans 80 mL d'eau, la solution est

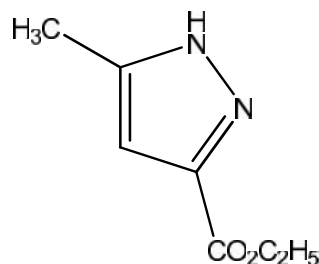
refroidie dans un bain de glace pendant 20 min ensuite neutralisée avec de l'acide chlorhydrique à un PH très acide (PH=2, papier PH de couleur rouge). Le produit qui cristallise est filtré sous vide.

Aspect : cristaux blancs.

Point de fusion : < 35°C.

Rendement : 60%

III.2. Synthèse de 5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle



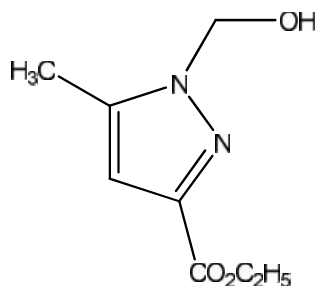
Dans un ballon bicol de 100 mL, muni d'un réfrigérant et d'un agitateur magnétique et une ampoule à brome, on dissout 15,8g (0,1mol) d'acétylpyruvate d'éthyle dans 10 mL d'éthanol absolu. On place le ballon dans un bain de glace à une température inférieure à 5°C. On ajoute goutte à goutte 5g (0,1mol) d'hydrazine à 80% dans 10 mL d'éthanol. Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 2 heures puis une nuit à température ambiante. On concentre sous vide 2/3 d'éthanol et on ajoute 20 mL d'eau glacée dans un bain de glace pour faire précipiter le produit.

Aspect : Cristaux blancs

Point de fusion : 83-84 °C.

Rendement : 85%.

III.3. Synthèse du 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyle-1H-pyrazole-3- carboxylate d'éthyle



Dans un ballon de 100 mL, muni d'un réfrigérant et d'un barreau magnétique, on place 6.25 g (0,04 mol) du 5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle dissout dans 15 mL d'éthanol avec le formol en grand excès (6,21 g) dans 10 ml d'éthanol. On porte la réaction à reflux pendant 90 min, puis on laisse le mélange sous agitation pendant toute une nuit à température ambiante. Une fois la réaction terminée, on ajoute 10 mL d'eau froide dans un bain de glace, aucun précipité n'apparaît. On extrait le produit avec le dichlorométhane. La phase organique est séchée avec du Na₂SO₄, après filtration, on concentre à sec le solvant et on obtient une

huile jaunâtre. Après avoir placé le produit dans un bain de glace, des cristaux blancs apparaissent.

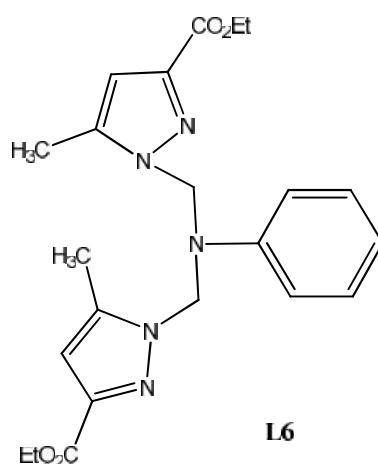
Aspect : Cristaux blancs

Point de fusion : 54-56°C.

Rendement : 55%.

IR (KBr, cm^{-1}): 3400 ($O-H$); 2980-2900 ($C-H, CH_3$); 2800 ($C-H, CH_2$); 1730 ($C=O$); 1660-1554 ($C=N$); 1455 – 1440 ($C=C$); 1246 ($C-(CO)-O$); 1395; 1023 ($O-H$); 1290 ($C-N$); 1082 ($C-O$); 980; 820 ($=CH$).

III.4. Synthèse de 1,1'-(phenylazanediyloxy)bis(méthylène)bis(5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate) de diéthyle. L6



Dans un ballon de 100 mL, muni d'un réfrigérant et d'un agitateur magnétique, on introduit 0,20 g (2,1mmol) d'aniline dans 5 mL d'acétonitrile. On ajoute goutte à goutte 0,8 g (4,3 mmol) du 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyle-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle dissout dans 10 mL d'acétonitrile anhydre. La réaction est maintenue pendant 5h dans un bain Marie à 65°C ou 7 jours à température ambiante. On ajoute 10 ml d'eau froide dans un bain de glace. On extrait le produit par le dichlorométhane. Après séchage avec du Na_2SO_4 et filtration, on évapore le solvant. On obtient un produit visqueux. Après recristallisation dans un mélange CH_2Cl_2 /éther (90/10), on récupère un solide blanc.

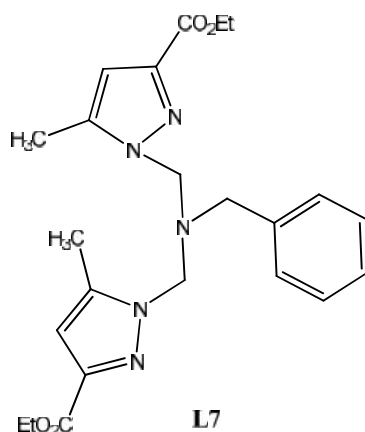
Aspect : solide blanc

Point de fusion : 122-124°C

Rendement : 85%.

IR (KBr, cm^{-1}): 3080 ($C-H$); 2925 ($C-H$); 2800 ($C-H, CH_2$); 2000-1800 ($C-H$ harmonique); 1730 ($C=O$); 1660-1554 ($C=N$); 1640 ($C=C$); 1246 ($C-(CO)-O$); 1395; 1023 ($O-H$); 1290 ($C-N$); 1082 ($C-O$); 980; 820 ($=CH$).

III.5. Synthèse du diéthyl 1,1'-(benzylazanediy)bis(methylene)bis(5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate) L7



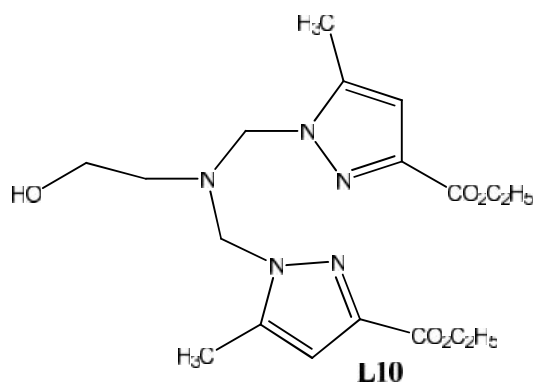
Dans un ballon de 100 mL, on met 0,12 g (1,1mmol) de benzylamine dans 7 mL d'acétonitrile. On ajoute goutte à goutte 0,41g (2,2 mmol) du 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyle-1H-pyrazole-3- carboxylate d'éthyle dissout dans 10 mL d'acétonitrile anhydre. La réaction est conduite à température ambiante pendant 7 jours. Après avoir arrêté la réaction, on extrait le produit avec le dichlorométhane, ensuite on sèche la phase organique avec du Na₂SO₄. Après filtration et évaporation, on obtient une huile jaunâtre. On lave plusieurs fois à l'éther, un produit blanc apparaît, on le recristallise dans un mélange CH₂Cl₂/éther (90/10).

Aspect : Poudre blanche

Point de fusion : 75°C.

Rendement : 75%.

III.6. Synthèse du diéthyl 1,1'-(2-hydroxyethylazanediy)bis(methylene)bis(5-méthyl-1H-pyrazole-3 carboxylate)L10.



Dans un ballon de 100 mL, muni d'un réfrigérant et d'un agitateur magnétique on introduit 1,9 mmol (0,116g) d'ethanolamine dans 5mL d'acétonitrile anhydre. On ajoute 3,8 mmol (0,7g) du 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyle-1H-pyrazole-3- carboxylate d'éthyle dissout dans 7mL d'acétonitrile. On laisse la réaction à température ambiante pendant 6 jours, une fois réaction terminée, on sèche la solution avec du Na₂SO₄, on filtre et on évapore le solvant. On obtient un produit blanc et visqueux. Il a cristallisé au bout d'une journée dans le dessiccateur.

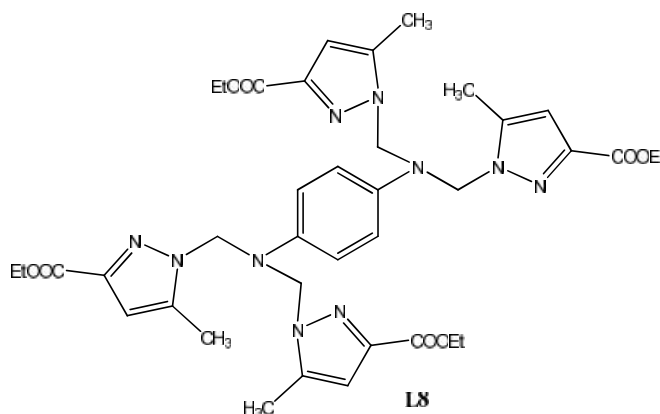
Aspect : Cristaux blancs

Rendement : 78%

Point de fusion : 84-86°C.

IR (KBr, cm^{-1}): 3350 (O-H); 2898 (C-H); 2820 (C-H, CH₂); 1720 (C=O); 1660-1460 (C=N); 1640 (C=C); 1220 (C-(CO)-O); 1030 (C-O); 1290 (C-N); 1082 (C-O); 980; 820 (C=CH).

III.7. Synthèse du tetraethyl 1,1',1'',1'''-(1,4-phenylenebis(azanetriyl))tetrakis(methylene)tetrakis(5-methyl-1H-pyrazole-3-carboxylate)L8



Dans un ballon de 250 ml, muni d'un réfrigérant et d'un agitateur magnétique, on place 0,12 g (1,0 mmol) du para-phénylène diamine pulvérisé et dissout dans 7mL d'acétonitrile. On ajoute 0,8 g (4,3 mmol) du 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyle-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle dissoute dans 10 mL d'acétonitrile anhydre. La réaction est conduite pendant 6 h dans un bain d'eau à 70°C et 1 nuit à température ambiante. On ajoute par la suite 10 mL d'eau glacée, et on extrait le produit par le dichlorométhane. Après évaporation du solvant, le produit obtenu est recristallisé dans un mélange CH₂Cl₂/éther (90/10).

La même réaction est reproduite sans chauffage, la réaction est pilotée pendant 8 jours à température ambiante et traitée de la même façon que précédemment.

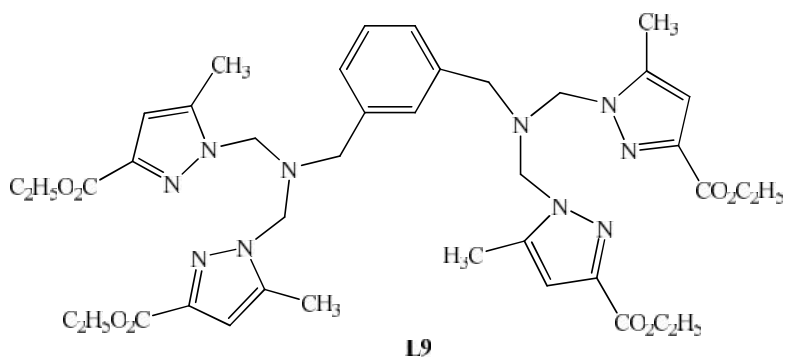
Aspect : poudre marron claire

Point de fusion : 198°C.

Rendement : 90%.

IR (KBr, cm^{-1}): 3035 (C-H aromatique); 2925 (C-H); 2800 (C-H, CH₂); 2000-1800 (C-H harmonique); 1750 (C=O); 1660-1554 (C=N); 1640 (C=C); 1246 (C-(CO)-O); 1290 (C-N); 1082 (C-O); 980; 820 (C=CH).

III.8. Synthèse du tetraethyl 1,1',1'',1'''-(1,3-phenylene bis(methylene))bis(azanetriyl)tetrakis(methylene)tetrakis(5-methyl-1H-pyrazole-3-carboxylate).L9



Dans un ballon de 100 mL, muni d'un réfrigérant et d'un agitateur magnétique, on introduit 0,14 g (1,0 mmol) de méta-xylylène diamine dissout dans 10 mL d'acétonitrile. On ajoute goutte à goutte 0,8g (4,3mol) du 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyle-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle dissout dans 10 mL d'acétonitrile. La réaction est maintenue pendant 6 heures dans un bain Marie à 70°C et une nuit à température ambiante. Une fois la réaction arrêtée, on ajoute 10 mL d'eau froide et on extrait le produit de la réaction avec le dichlorométhane. Après, séchage de la phase organique avec du Na₂SO₄ et évaporation du solvant, on obtient un produit huileux avec un rendement de 80%.

*Activité Antioxydante de Composés
Pyrazoliques*

I. INTRODUCTION

Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont impliquées dans des processus physiologiques à des faibles quantités. Cependant, l'excès de la production des ERO peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule, les lipides, les protéines et les acides nucléiques, et donne lieu au stress oxydatif qui sera impliqué dans diverses pathologies à savoir les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), le diabète, les cancers, les maladies inflammatoires, le vieillissement, etc [26, 27, 28, 29]. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes pour éliminer ou minimiser le dommage oxydatif. Selon le type, les antioxydants peuvent agir en réduisant les ERO, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant les métaux de transition libres ou en générant des molécules biologiques antioxydantes. Sous certaines conditions, ces systèmes antioxydants ne peuvent pas fonctionner efficacement. Cependant, la dysfonction antioxydante qui en résulte peut être manipulée par la supplémentation en antioxydants exogènes alimentaires, soit naturels ou de synthèse.

II. STRESS OXYDANT

II.1. Espèces réactives de l'oxygène

En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des radicaux libres oxygénés (ERO), suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue de ERO, soit à une diminution de la capacité de défenses antioxydantes.[30]

Les espèces réactives oxygénées (ERO) (Reactive oxygen species ou ROS) ou 'radicaux oxygénés libres' ou 'dérivés réactifs de l'oxygène' sont produites en permanence dans l'organisme, et sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (prolifération cellulaire normale, métabolisme, état redox physiologique pour l'expression de gènes). Il s'agit d'une classe spécifique de radicaux car ils ont une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène qui leur a donné naissance.

II.2. Les Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire (non apparié).

Radicaux libres centrés sur l'oxygène

$O_2^{\bullet -}$: radical superoxyde

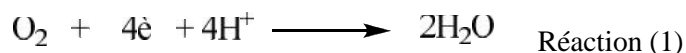
HO_2^{\bullet} : radical perhydroxyle

HO^{\bullet} : radical hydroxyle

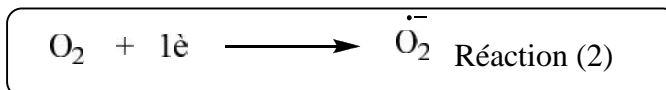
$RCOO^{\bullet}$: radical peroxyde

RO^{\bullet} : radical alkoxyde

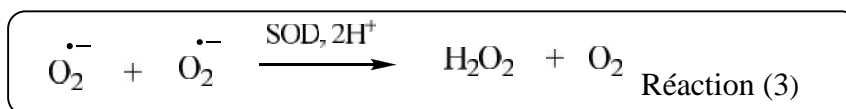
La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons, réaction (1)) conduisant à la production d'eau.



Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser « fuir » une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2 % de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron, réaction (2)) conduisant à la formation du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$. [31]

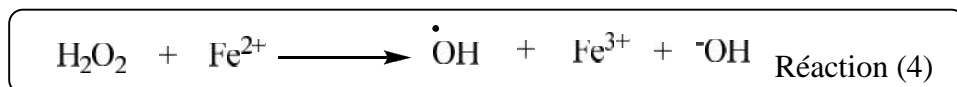


Le radical superoxyde qui présente une certaine toxicité est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD) qui catalysent sa disparition par dismutation (réaction (3)).

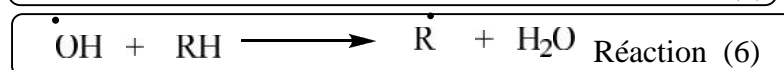
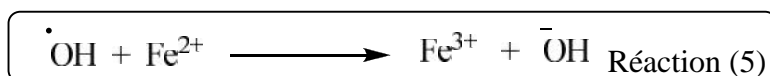


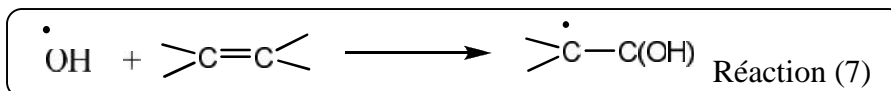
Ce radical est naturellement produit dans toutes les cellules des êtres vivants respirant le dioxygène. Il peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène, pour donner le radical hydroxyle hautement réactif, qui peut être à l'origine de l'oxydation des constituants cellulaires. Cette réaction est catalysée par des ions de certains métaux de transition, tels que le fer ou le cuivre.

L'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) ainsi formée n'est pas elle-même un radical libre mais une molécule. C'est un intermédiaire réduit de l'oxygène qui est relativement toxique. Sa concentration est régulée par des enzymes telles que la catalase. La catalase accélère la réaction de dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle $\cdot OH$ en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} (réaction (4), dite de Fenton) [32]. Le radical hydroxyle est particulièrement dangereux vis-à-vis des matériaux biologiques.



Les radicaux hydroxyles sont les ERO les plus dommageables du stress oxydant, en raison de leur extrême réactivité. Ce sont des oxydants puissants qui réagissent selon trois modes d'action : soit en arrachant un électron (réaction (5)), soit en arrachant un atome d'hydrogène (d'un substrat organique RH, réaction (6)), soit encore en s'additionnant sur les doubles liaisons (réaction (7)). En outre, lorsqu'une protéine possède une fonction enzymatique, les radicaux hydroxyles sont susceptibles d'inactiver, tout au moins en partie, le site actif. [33]





D'un point de vue formel, la réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'additionner un par un, successivement sur O₂, en conduisant aux intermédiaires respectifs O₂^{•-}, H₂O₂, et HO[•] (Schéma 10). Ces intermédiaires sont appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou encore espèces activées de l'oxygène, car ils ont une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène qui leur a donné naissance.

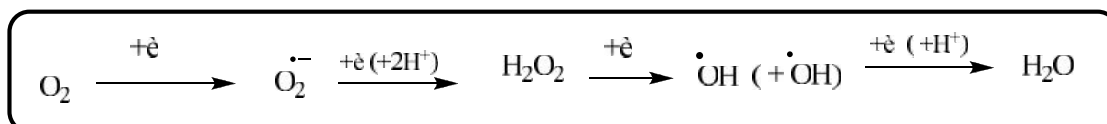


Schéma 10

Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des systèmes de défense (enzymatiques et non enzymatiques), ou encore par une association de ces deux phénomènes. Un tel déséquilibre entre systèmes producteurs d'ERO et systèmes de défense caractérise l'état de *stress oxydant* [34]

La pollution, le tabagisme, l'alcoolisme, la prise des contraceptifs, l'exposition prolongée au soleil ou à des radiations, la pratique du sport de haut niveau et l'inflammation chronique sont des sources de production des ERO. Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouve la majeure partie des antioxydants exogènes nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols) favorise une baisse de la capacité antioxydante. Un déséquilibre redox prolongé a des conséquences en pathologie et dans le vieillissement des tissus. [34]

L'ensemble des dommages radicalaires semble pouvoir être limité, tout au moins en partie, par l'action de molécules dites antioxydantes. Celles-ci ont pour rôle d'empêcher les ERO d'atteindre leurs cibles biologiques, d'où leur fonction de protecteur chimique. Il est habituel de dire qu'un bon antioxydant est un bon « capteur » de radicaux libres.

III. LES SYSTEMES ANTIOXYDANTS (l'antidote contre les radicaux libres)

Les antioxydants sont définis comme l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement à faibles doses la production, de limiter la propagation ou de détruire les ERO [35]. Les systèmes antioxydants peuvent être divisés en deux catégories : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques.

III.1. Les Antioxydants Enzymatiques

Les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages des ERO. Ces défenses permettent de maintenir la concentration en espèces

radicalaires à un taux vital (homéostasie physiologique). En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ERO, avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser.

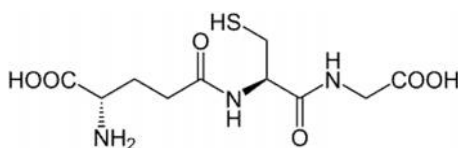
La superoxyde dismutase (SOD) est une des plus importantes enzymes cellulaires possédant une fonction antioxydante. C'est l'enzyme antioxydante "anti-O^{2•-}" la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée [36]. L'absence de cette enzyme peut être létale.

La catalase est une enzyme qui contient du fer. Elle est concentrée dans le foie [37]. Elle réduit le peroxyde d'hydrogène en libérant de l'oxygène et de l'eau et leurs rôles est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier [38].

III.2. Les Antioxydants non enzymatiques

Ces antioxydants se divisent en deux principales catégories, les endogènes (molécules issues de la biosynthèse), et les exogènes (vitamines, oligoéléments, ou antioxydants de synthèse). Parmi les antioxydants apportés par l'alimentation on retrouve la vitamine E, une substance liposoluble antioxydante majeure [37] qui agit par rupture de la réaction en chaîne (peroxydation lipidique) au niveau des membranes cellulaires [39]. D'autres vitamines jouent un rôle d'agents réducteurs : la vitamine C [40] ainsi que le β -Carotène précurseur de la vitamine A et qui a les mêmes fonctions que la vitamine E [39]. Les micronutriments sont aussi des éléments indispensables à l'activité d'enzymes antioxydantes tels que les superoxydes dismutases pour lesquels le zinc joue un rôle structurale et le cuivre un rôle antioxydant [35]

En ce qui concerne les antioxydants endogènes on retrouve le glutathion (figure 14) qui est un tripeptide et qui possède une fonction thiol qui lui confère un rôle d'antioxydant qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydantes [36]. Le fer et le cuivre sous forme libre étant promoteurs de dommages radicalaires, ces métaux sont séquestrés et transportés grâce à des protéines comme la ferritine, la transférine ou la céruloplasmine [41]



Glutathion
Figure 14

L'albumine aussi joue un rôle d'antioxydant grâce à sa cystéine en position 34 qui permet de capturer les ERO [42]. L'acide urique est aussi connu pour être un antioxydant. [43]

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés sous forme de fruits, légumes et boissons tel le thé. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes [44] En effet les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif et ils sont également capables de chélater les ions métalliques oxydants [45].

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 (figure 15) étant suspectés d'être cancérogènes.

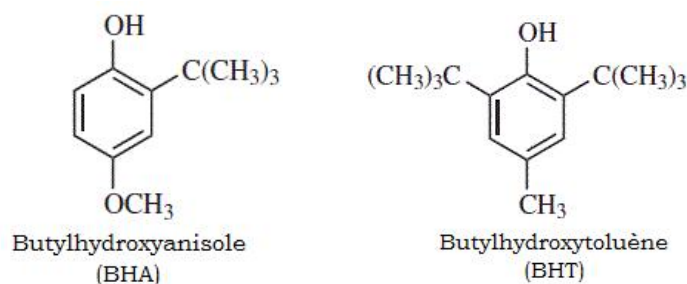


Figure 15

Il existe aussi de nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels (hémisynthèse ou mime de structures naturelles). Le but de ces synthèses est l'amélioration de l'activité antioxydante, la biodisponibilité et le coût des molécules.

IV. L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

L'activité antioxydante définit la capacité d'un organisme de se protéger contre les radicaux libres.

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, les propriétés antioxydantes de la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O^\bullet). [46,47]

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, in vitro et in vivo, l'activité antioxydante. . Les méthodes les plus utilisées généralement pour déterminer la capacité antioxydante sont divisés en deux groupes importants:

- Des analyses basées sur une réaction de transfert d'atome d'hydrogène, où l'antioxydant et le substrat sont en concurrence pour fixer des radicaux libres tel que l'essai du DPPH, ABTS etc.

Des analyses basées sur une réaction de transfert d'électron, surveillée par un changement de couleur quand l'oxydant est réduit tel que le FRAP ((ferric reducing antioxidant power), CUPRAC ((cupric reducing antioxidant capacity) [48]

Dans la première catégorie l'essai le plus couramment utilisé est l'essai de DPPH[•]. Le DPPH[•] est connu comme un radical libre stable, mais il est sensible à la lumière, à l'oxygène, au pH et au type de solvant utilisé. [49]

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 [50-52].

V. METHODES ANALYTIQUES UTILISEES POUR EVALUER L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

V.1. METHODE DU RADICAL LIBRE DPPH[•]

V.1.1. Principe de la méthode

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (, -diphényl-β-picrylhydrazyl) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. [53,54] Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 16). 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.

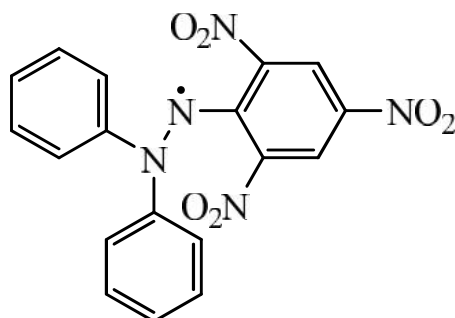


Figure 16

Le DPPH[•] est un radical libre stable qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH[•] est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•], qui est proportionnel au pouvoir anti radicalaire de l'échantillon.

La capacité anti-radicalaire (capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH[•], type de solvants, pH). [55]

Une solution standard d'acide ascorbique est utilisée pour vérifier la méthode d'activité antioxydante puis appliquer sur les deux séries de composés synthétisés. Des dilutions différentes sont préparées pour chaque standard.

Les dilutions préparées de chaque échantillon sont incubées avec 1 ml de solution de DPPH[•]. Après une période d'incubation de 30 minutes, à la température ambiante et dans l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc contenant la solution de DPPH[•] et du solvant. La valeur de l'absorbance du blanc est prise comme étant le temps du début de la réaction.

V.1.2.Principe du test

Ce test permet de mettre en évidence le pouvoir antiradicalaire d'un antioxydant pur ou d'un extrait antioxydant, la solution d'alcool de DPPH[•] est de couleur mauve-foncé caractérisé par son spectre UV avec un maximum d'absorbance à 517nm. Sous l'action d'un antioxydant qui le réduit en DPPH, cette absorbance diminue jusqu'à atteindre un palier (schéma 11). La cinétique de la réaction varie selon l'antioxydant utilisé [56,57]

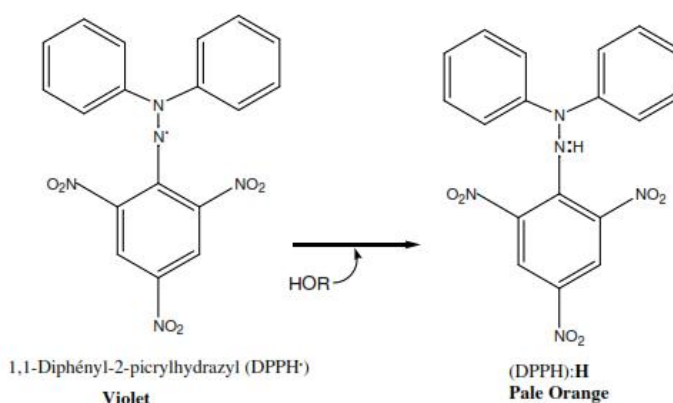


Schéma 11 : Réduction du radical DPPH[•]

Les résultats de l'analyse par le test de DPPH[•] sont exprimés par la valeur de l'IC50. L'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage I% ou RSA% (Radical Scavenger Activity) déterminé par la relation suivante [1]: [58,59]

$$I\% = [(Abs_0 - Abs_1)/(Abs_0)] \times 100 \quad \text{relation [1]}$$

Où (Abs_0) est l'absorbance du blanc et (Abs_1) est l'absorbance en présence de l'antioxydant à différentes concentrations.

La valeur de l' IC_{50} varie en fonction de la nature de l'échantillon et de la concentration finale résiduelle du DPPH \cdot . [59]

Deux grandeurs permettent d'uniformiser le test du DPPH \cdot et permet de comparer l'activité antioxydante entre deux composés différents. En effet, ces grandeurs, appelées indices, sont indépendantes de la concentration initiale du DPPH \cdot . Ces indices sont définis comme :

- **Indice d'activité antioxydante AAI** déterminé par la relation suivante [2] :

$$AAI = (\text{concentration finale de DPPH } (\mu\text{g. mL}^{-1})) / (IC_{50}(\mu\text{g.mL}^{-1})) \quad \text{relation [2]}$$

L'indice AAI varie proportionnellement avec la capacité antioxydante de l'antioxydant.

- **Unité d'activité antioxydante AAU** déterminé par la relation [3]:

$$AAU = 394.32 \times (R) / (B \times C \times Mr) \quad \text{relation [3]}$$

Où :

(R) est le rapport volumique de l'échantillon au volume de solution de DPPH pour chaque réaction.

(B) : est la pente de la courbe d'étalonnage de l'inhibition de l'acide ascorbique.

(C) : est la concentration initiale de la solution du DPPH (g.ml^{-1}).

(Mr) : est le poids moléculaire de l'échantillon.

Cet indice est spécialement utilisé pour des composés purs, il est inversement proportionnel à la capacité antioxydante de l'antioxydant.

V.2. METHODE FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

V.2.1. Principe de la méthode

La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son potentiel d'activité anti-oxydante. La réduction du Fe^{3+} est souvent employé pour étudier la capacité d'une substance à donner les électrons. Cette propriété constitue un important mécanisme de l'action anti-oxydante. [60]

Le pouvoir réducteur est basé sur la transformation de Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} en présence d'un antioxydant qui a le pouvoir de céder des électrons. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés.

V.2.2. Principe du test FRAP

Le pouvoir réducteur des échantillons est déterminé selon la méthode d'Oyaisu [61]. Dans un tube à essai contenant 1 ml de solution d'échantillon sont ajoutés 2,5 ml de tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) puis 2,5 ml d'hexacyanoferrate de potassium $[K_3Fe(CN)_6]$ (10g/l). L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes. Un volume de 2,5 ml d'acide trichloracétique (100 g/l) est ensuite ajouté et le mélange est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Enfin, 2,5 ml du surnageant ont été mélangés avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique $[FeCl_3]$ (1 g / l). Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions. La lecture est mesurée à 700 nm. L'acide ascorbique est utilisé pour le contrôle positif.

VI. RESULTATS ET DISCUSSION

L'activité antioxydante exprime la réduction des radicaux libres impliqués dans divers pathogènes. Dans le but de renforcer le système de défense endogène contre ces radicaux libres les recherches s'orientent afin de trouver de nouvelles molécules anti oxydantes.

Les propriétés anti oxydantes de nos composés hétérocycliques, ont été évaluées par le test $DPPH^{\bullet}$ et la réduction du ferrocyanure de potassium(FRAP).

L'étude de l'activité anti oxydante a été réalisé sur une série de composés tripodales à base de pyrazole.

Les tripodes testés peuvent être organisés en deux séries : Série 1 : L1, L2, L3, L4 et L5 (composés possédant deux groupements méthyle en position 3 et 5 sur le cycle pyrazolique), Série 2 : L6, L7, L8, L9 et L10 (composés possédant un groupement ester éthylique en position 3 et un méthyle en position 5) (figures 17 et 18).

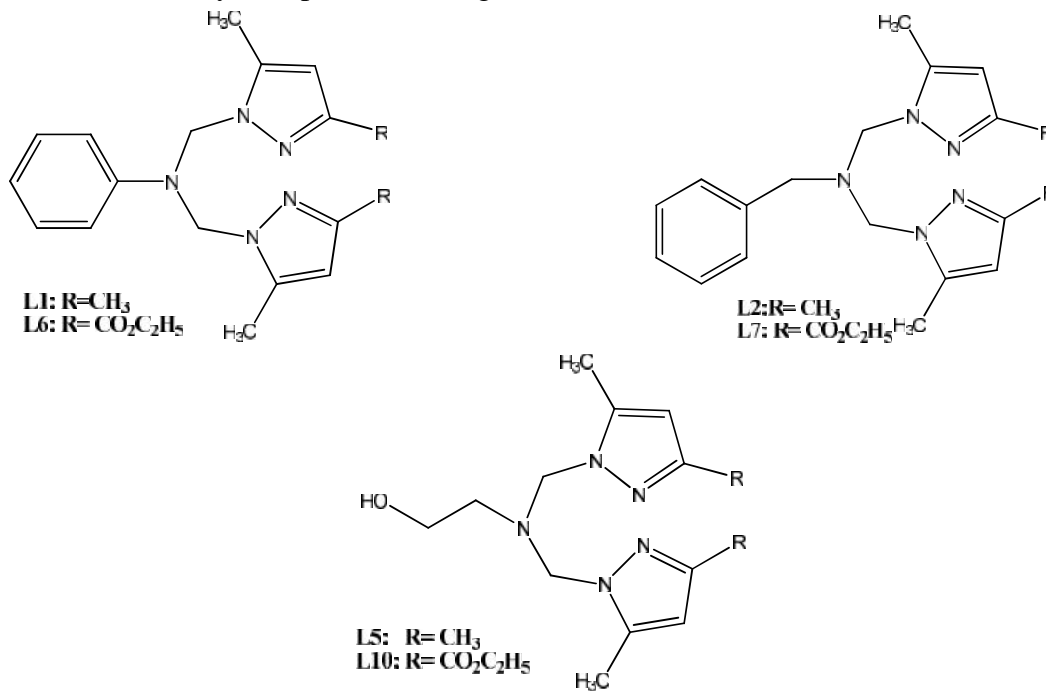


Figure 17

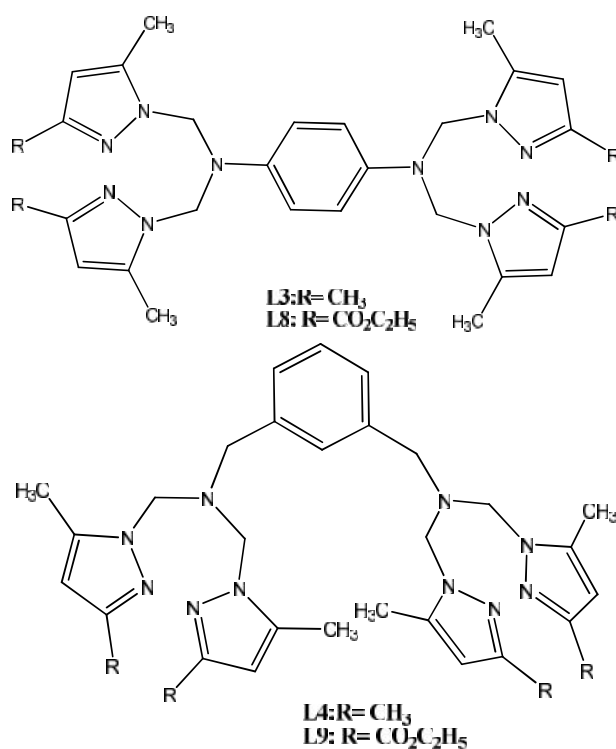


Figure 18

VI.1. TEST DE PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH[•]

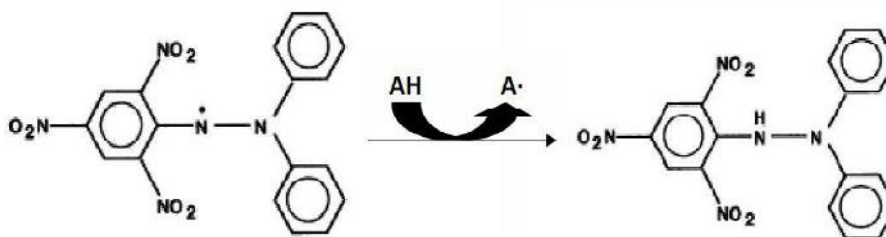
VI.1.1. PREMIERE SERIE :

La réaction de réduction du DPPH[•] radical en DPPH non radical :

Pour l'évaluation de l'activité anti oxydante, deux approches sont appliquées :

D'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH[•] en un temps bien déterminé (1/2 heure après le lancement de la réaction), ou la détermination de l'I_{C50} (la quantité d'anti oxydant nécessaire pour réduire 50% de DPPH[•]). Dans la première approche, le pouvoir anti oxydant est défini par l'indice de la réduction anti radicalaire en pourcentage %RSA (Radical Scavenger Activity) ou pourcentage d'inhibition (réduction en I%) [62, 63]

$$\text{RSA\%} = [(\text{Abs contrôle négatif (DPPH}^\bullet) - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle négatif}] * 100\%.$$



Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)

Diphenylpicrylhydrazine (non radical)

Schéma 12

L'activité antioxydante des différents ligands a été évaluée vis-à-vis de la réduction du radical DPPH[•] qui se traduit par le passage de la couleur violette vers une couleur jaune pâle mesurable à 517 nm. La forme réduite donne à la solution une coloration jaunâtre, le virage vers cette coloration et l'intensité de cette dernière dépend de la nature, la concentration et Le pouvoir anti oxydant de la substance à étudier. [64] Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires. [65]

Les résultats du pouvoir antioxydant des échantillons testés montrent que le pourcentage d'inhibition des solutions méthanoliques est supérieur à 54% à des concentrations de l'ordre (0.33, 0.40, 0.50 ,0.60 ,1 et 2×10^{-3} mol/L).

Les valeurs IC50 déterminées en mmol/L exprimant la concentration efficace de l'antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de moles de DPPH[•] en dissolution dans du méthanol sont résumés dans le tableau 1

La solution mère est de concentration 2×10^{-3} (mol/L) ; ensuite une gamme de dilutions a été préparée à partir de cette dernière.

Pour calculer l'IC50, on détermine l'équation de la droite de régression linéaire pour chaque courbe (figures 19-24) et on calcule pour une inhibition de 50% de la concentration correspondante.

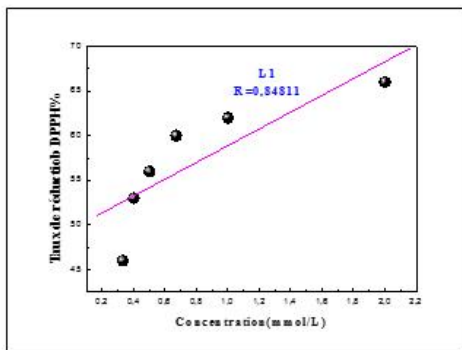


Figure 19 : courbe de régression linéaire de l'activité antioxydante du L1

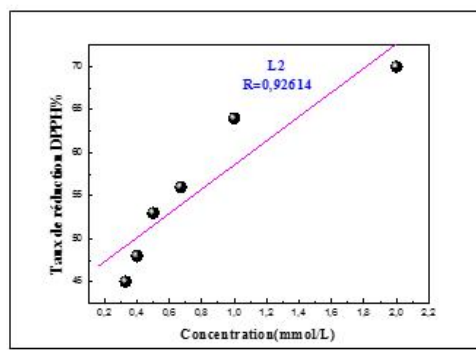


Figure 20 : courbe de régression linéaire de l'activité anti oxydante du L2

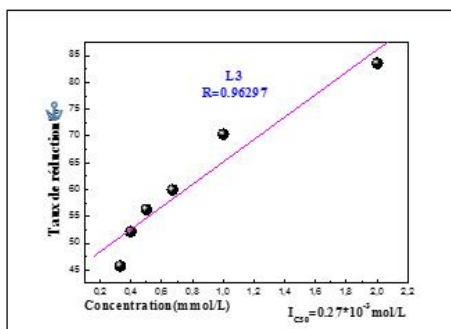


Figure 21 : courbe de régression linéaire de l'activité anti oxydante du L3

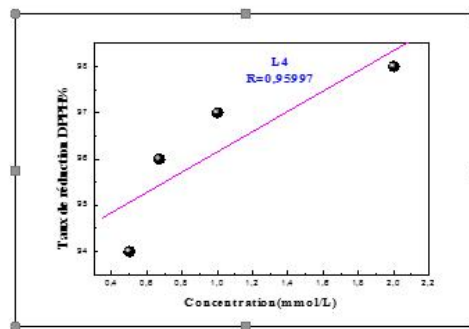


Figure 22 : courbe de régression linéaire de l'activité anti oxydante du L4

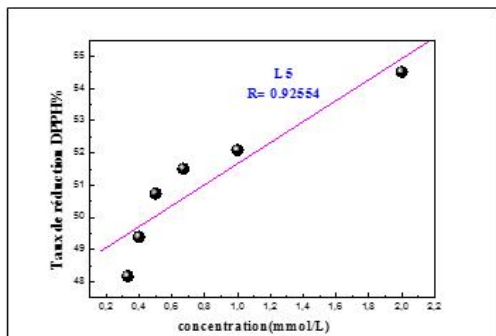


Figure23 : courbe de régression linéaire de L'activité anti oxydante du L5

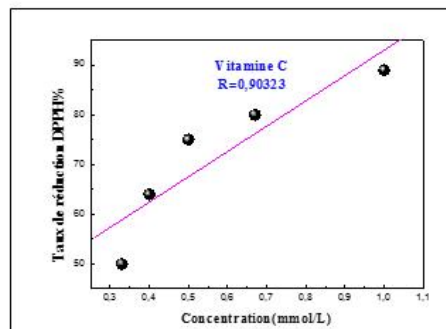


Figure24 : courbe de régression linéaire de l'activité anti oxydante de l'acide ascorbique

D'après les graphes (figs :19-24), on note que l'indice de régression varie de 0.84 dans le cas du ligand L1 à 0.96 dans le cas de L3, ce qui témoigne de l'affinité que possèdent nos structures vis-à-vis de la réduction du radical libre DPPH[•], particulièrement dans le cas de L3.

Ces figures montrent également que nos échantillons possèdent des capacités de neutralisation assez importantes. Cependant, il existe des différences de potentiel anti oxydant entre les ligands. Ces variations peuvent être attribuées aux structures de ces molécules. Les ligands L3 et L4, ligands riches en électrons, montrent les meilleures activités antioxydantes.

L'activité anti oxydante des ligands est mise en évidence en utilisant le paramètre définissant la concentration inhibitrice de 50% du radical DPPH[•] (IC₅₀) qui est inversement proportionnel au potentiel anti radicalaire d'un anti oxydant. Une valeur d'IC₅₀ faible correspond à une activité élevée. [66]

Selon les résultats enregistrés, nos échantillons de la première série L1-L5 sont dotés d'un pouvoir antioxydant modéré, leur IC₅₀ sont respectivement de 0,39 ; 0,27 ; 0,20 ; 0,23 et 0,48mmol/, celui d'acide est de l'ordre de 0,10 mmol/L.

Parmi les 5 ligands testés, le L3 et le L4 ont montré les meilleurs pouvoirs anti oxydants vis – à vis de la réduction du radical libre DPPH[•]. On note un changement instantané de la couleur violette vers la couleur jaune, surtout dans le cas du L3.



Image 1 : ligand 3

Tableau 1 : Le pourcentage (%) d'inhibition du DDPH' en fonction des concentrations des échantillons L1-L5 et de l'acide ascorbique à différentes concentrations après 30 min d'incubation

Echantillons	Concentration (mmol/L)	Taux de réduction DPPH	IC ₅₀ (mmol/L)
L1	0,33	45	0,39
	0,40	48	
	0,50	53	
	0,67	56	
	1	64	
	2	70	
L2	0,33	45,77	0,27
	0,40	52,15	
	0,50	56,29	
	0,67	59,96	
	1	70,33	
	2	83,57	
L3	0,33	50,02	0,20
	0,40	58	
	0,50	64	
	0,67	73	
	1	80	
	2	91	
L4	0,33	46	0,23
	0,40	53	
	0,50	56	
	0,67	60	
	1	62	
	2	66	
L5	0,33	48,17	0,48
	0,40	49,39	
	0,50	50,74	
	0,67	51,51	
	1	52,09	
	2	54,52	
Vitamine C	0,33	50	0.10
	0,40	64	
	0,50	75	
	0,67	80	
	1	89	
	2	98	

VI.1.2. DEUXIEME SERIE :

Pour les mêmes concentrations que celles de la série précédente, les résultats démontrent que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] des solutions méthanoliques de cette série est bien supérieur à 72%.

Les résultats de l'activité anti radicalaire ainsi que les valeurs des IC₅₀ sont résumées dans le tableau 2. Ces ligands possèdent dans leurs structures deux substituants différents sur le cycle pyrazolique, le groupement ester en position 3 et un méthyle en position 5.

De la même manière, les IC₅₀ ont été déterminés à partir de l'équation de la droite de régression pour chaque courbe (figures 25-29) et on calcule pour une inhibition de 50% la concentration correspondante.

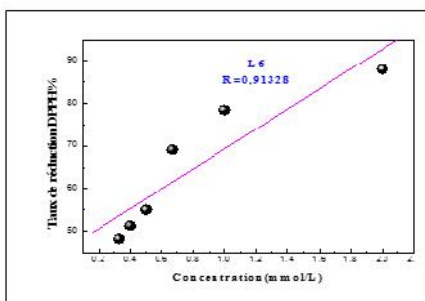


Figure 25 : courbe de régression linéaire de l'activité anti oxydante du L6

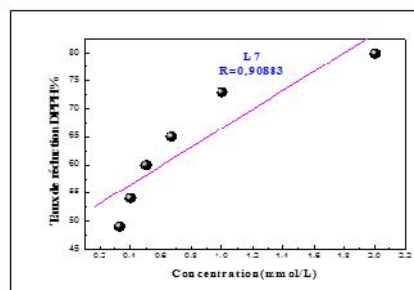


Figure 26: courbe de régression linéaire de l'activité anti oxydante du L7

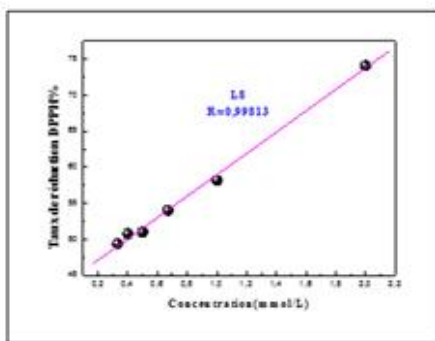


Figure 27 : courbe de régression linéaire de l'activité anti oxydante du L8.

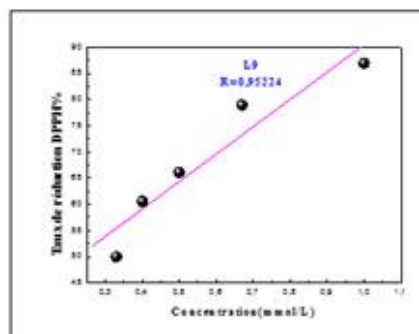


Figure 28: courbe de régression linéaire de l'activité anti oxydante du L9

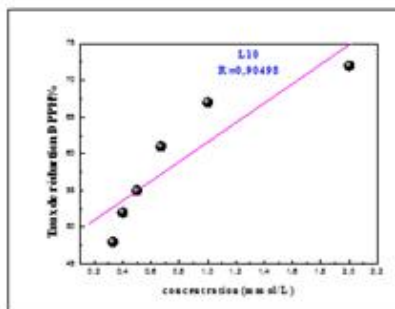


Figure 29 : courbe de régression linéaire de l'activité antioxydante du L10

D'après les graphes (33-38), on note que l'indice de régression varie de 0.90 dans le cas du ligand L7 et L10 à 0.99 dans le cas de L8, ce qui témoigne de l'affinité que possèdent nos structures vis-à-vis de la réduction du radical libre DPPH[•], particulièrement dans le cas de L8.

Ces figures montrent également que ces échantillons de la deuxième série possèdent des capacités de neutralisation plus importantes que celle de la première série. Ceci est probablement dû à la présence du groupe ester en position 3 sur le pyrazole.

Selon les résultats enregistrés dans le tableau 2, nos échantillons de la deuxième série L6-L10 sont dotés d'une très bonne activité antioxydante, leurs IC₅₀ sont respectivement de 0,23 ; 0,17 ; 0,12 ; 0,13 et 0,40 mmol/ avec des valeurs très proches dans le cas du L7, L8 et L9 avec celle de l'acide ascorbique (0,10mmol/L).

Parmi les 5 ligands testés, le L8 et le L9 ont montré les meilleurs pouvoirs anti oxydants vis – à vis la réduction du radical libre DPPH[•] On note un changement instantané de la couleur violette vers la couleur jaune dans leurs cas.

Tableau 2 : Le pourcentage (%) d'inhibition du DDPH en fonction des concentrations des échantillons L6-L10 et de l'acide ascorbique à différentes concentrations après 30 min d'incubation.

Echantillons	Concentration (mmol/L)	Taux de réduction DPPH%	IC ₅₀ (mmol/L)
L6	0,33	49	0,23
	0,40	54	
	0,50	60	
	0,67	65	
	1	73	
	2	80	
L7	0,33	48,25	0,18
	0,40	51,32	
	0,50	55	
	0,67	69,14	
	1	78,50	
	2	88	
L8	0,33	50	0,12
	0,40	60.58	
	0,50	66.12	
	0,67	79	
	1	87	
	2	95	
L9	0,33	48	0,13
	0,40	52	

	0,50	55	
	0,67	61	
	1	67	
	2	72	
L10	0,33	49.39	0,40
	0,40	50.74	
	0,50	51	
	0,67	54	
	1	58.17	
	2	74.11	
Vitamine C	0,33	50	0.10
	0,40	64	
	0,50	75	
	0,67	80	
	1	89	
	2	98	

VI.1.3. ETUDE COMPARATIVE DES POUVOIRS ANTI OXYDANTS DE LA SERIE 1 ET LA SERIE 2

Tableau 3 : tableau comparatif des valeurs des IC₅₀ des différents ligands.

Ligands	L1	L6	L2	L7	L3	L8	L4	L9	L5	L10
IC ₅₀	0.39	0.18	0.27	0.23	0.20	0.12	0.23	0.13	0.48	0.40

En se référant aux résultats du tableau 3, on voit bien que le ligand L6 de la série 2 est meilleur antioxydant que son analogue structurel L1 de la série 1. Même remarque pour les ligands L7/L2 ; L8/L3 ; L9/L4 et même L10/L5. On peut conclure que la présence du groupe ester en position 3 sur le cycle pyrazolique augmente le pouvoir antioxydant des ligands.

Toutefois, les meilleures activités sont obtenues avec les ligands L8-L9 de la deuxième série, L3 et L4 de la première série avec des IC₅₀ respectivement 0,12 ; 0,13 ; 0,20 et 0,23 proche de l'IC₅₀ du contrôle positif qui est la vitamine C (0,10).

VI.1.4. Calcul de l'Unité d'Activité Antioxydante AAU

Cette grandeur nous permet d'uniformiser le test DPPH pour nos ligands (équation 4). Les résultats sont rassemblés dans le tableau 4.

Cet indice dépend de la masse molaire des composés purs. Il est inversement proportionnel à la capacité anti oxydante de l'oxydant.

Les valeurs des AAU reportés dans le tableau 4 sont en accord avec les résultats précédents du test DPPH. Effectivement, les ligands possédant un groupement ester en position 3 sur le pyrazole ont les valeurs les plus faibles (455,51 pour L8 et 439,56 pour le L9).

Tableau 4 : valeurs des unités de l'activité antioxydante des 10 ligands

Echantillons	Les valeurs AAU
L1	1137.85
L2	1088.90
L3	651.11
L4	618.99
L5	1269.25
L6	827.41
L7	801.00
L8	455.51
L9	439.56
L10	894.77

VI.2. Test de la réduction du fer FRAP :

VI.2.1. PREMIERE SERIE

La méthode FRAP est une méthode simple, reproductible et peu coûteuse, ce qui la rend une méthode universelle. Cette méthode est basée sur l'évaluation du pouvoir réducteur du fer. C'est la capacité d'un composé à transformer les ions Fe^{3+} en Fe^{2+} on détermine ainsi la capacité de ce composé à donner des électrons selon la méthode décrite par Oyaizu [61]

La présence des réducteurs dans la solution a testée provoque la réduction du Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu verdâtre dans le milieu réactionnel. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrométrie à 700 nm. [67]

Cette propriété constitue un important mécanisme de l'action antioxydante, plus l'absorbance mesurée à 700 nm augmente plus le pouvoir réducteur est élevé. [68]

Les résultats du test réalisé sur les ligands de la première série sont reportés dans le tableau 5. Une solution mère a été préparé à une concentration $2 \cdot 10^{-3}$ mmol/L et 6 solutions filles ont été préparées à des concentrations de 0,33 ; 0,40 ; 0,50 ; 0,65 ; 1 et 2 mmol/L.

Pour la première série l'ordre de l'activité anti oxydante des ligands est $L3 > L5 > L4 > L1 > L2$.

La décoloration des solutions 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.

On constate l'augmentation de l'absorbance qui est proportionnel à la concentration, ce qui implique l'augmentation du pouvoir réducteur ce qui témoigne de l'activité anti oxydante de nos composés. Dans le cas du L3 l'absorbance atteint 0.584 cm^{-1} .

Les meilleurs activités de cette série ont été obtenues avec les ligands dans l'ordre décroissant L3 ($0,584 \text{ cm}^{-1}$), L5 ($0,441 \text{ cm}^{-1}$) et L4 ($0,234 \text{ cm}^{-1}$).

On note aussi que le pouvoir anti oxydant reste inférieur à l'anti oxydant de référence qui est l'acide ascorbique, avec une valeur de l'absorbance qui peut atteindre $3,000 \text{ cm}^{-1}$.

Tableau5 : Résultats du pouvoir antioxydant par la méthode FRAP.

Echantillon	Concentration (mmol/L)	Absorbance (Cm^{-1})
L1	0,33	0,101
	0,40	0,103
	0,50	0,105
	0,65	0,115
	1	0,121
	2	0,134
L2	0,33	0,156
	0,40	0,179
	0,50	0,185
	0,65	0,186
	1	0,211
	2	0,221
L3	0,33	0,298
	0,40	0,320
	0,50	0,326
	0,65	0,340
	1	0,546
	2	0,584
L4	0,33	0,222
	0,40	0,223
	0,50	0,226
	0,65	0,228
	1	0,231
	2	0,234
L5	0,33	0,321
	0,40	0,417
	0,50	0,422
	0,65	0,424
	1	0,441
	2	0,441

Vitamine C	0,33	1,986
	0,40	2,026
	0,50	2,598
	0,65	2,688
	1	2,845
	2	3,000

VI.2.2. DEUXIEME SERIE :

Le tableau 6 résume les résultats de l'activité anti oxydante par la méthode FRAP de la deuxième série de ligands.

La meilleure activité est toujours notée pour un ligand L8, ou l'absorbance atteint 1.317 cm⁻¹.

L'ordre de l'activité anti oxydante est L8>L10>L9>L6>L7.

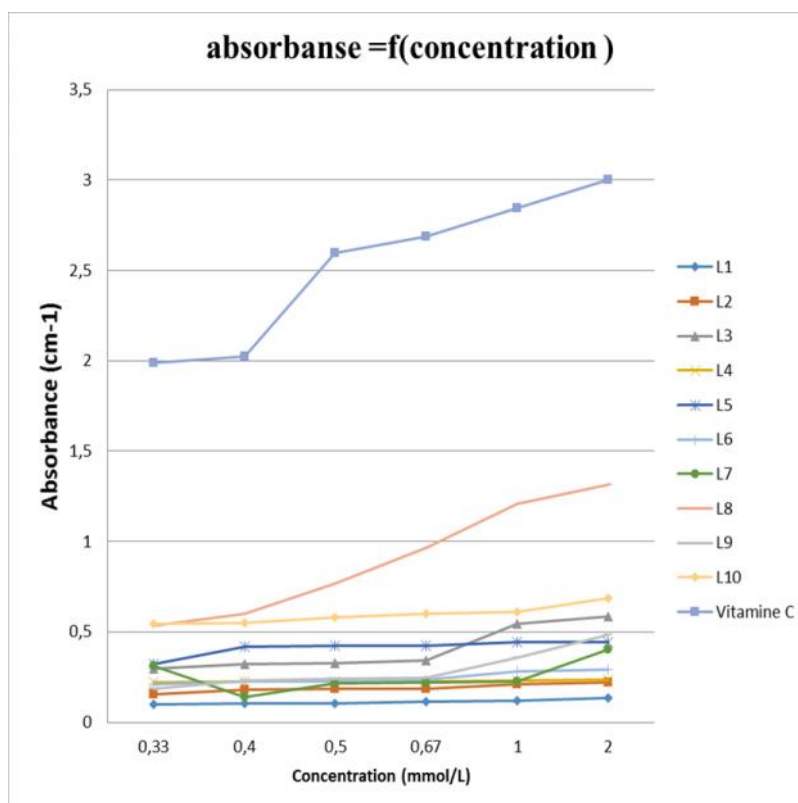
Tableau 6 : Résultats du pouvoir antioxydant par la méthode FRAP.

Echantillons	Concentration (mmol/L)	Absorbance (cm-1)
L6	0,33	0.212
	0,40	0.223
	0,50	0.225
	0,67	0.238
	1	0.281
	2	0.289
L7	0,33	0.313
	0,40	0.137
	0,50	0.215
	0,67	0.221
	1	0.225
	2	0.401
L8	0,33	0.534
	0,40	0.601
	0,50	0.768
	0,67	0.966
	1	1.209
	2	1.317
L9	0,33	0.187
	0,40	0.231
	0,50	0.242
	0,67	0.246
	1	0.358
	2	0.484
L10	0,33	0.544
	0,40	0.552
	0,50	0.578

	0,67	0.600
	1	0.611
	2	0.685
Vitamine C	0,33	1,986
	0,40	2,026
	0,50	2,598
	0,67	2,688
	1	2,845
	2	3,000

VI.2.3. ETUDE COMPARATIVE :

Les meilleures activités anti oxydantes ont été obtenues avec les ligands de la deuxième série (tableau 7, figure 30). Au cours de ces manipulations, on a remarqué que la solution jaunâtre dérive instantanément vers un bleu Berlin intense. Ces ligands possèdent un groupement ester éthylique en position 3 sur le cycle pyrazolique contrairement à leurs analogues de la série 1 avec un méthyle sur la même position. On peut prétendre que la présence du groupe ester augmente l'activité anti oxydante de nos ligands.



Figures 30 : Courbes d'évaluation du pouvoir antioxydant des ligands L1-L10 par la méthode de FRAP

Tableau 7 : étude comparative entre les activités anti oxydante (FRAP) des deux séries de ligands.

Ligands	L1	L6	L2	L7	L3	L8	L4	L9	L5	L10
Absorbance cm^{-1} (pour $c = 2 \text{ mmol/L}$)	0.221	0.289	0.134	0.401	0.584	1,317	0.234	0.484	0.441	0.685

VI.2.4. ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTIVITE ANTI OXYDANTE DU (A) 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle et (3,5-diméthylpyrazol-1-yl) méthanol (B).

Une évaluation de l'activité anti oxydante du 1- (hydroxyméthyl)-5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle (composé A) et du (3,5-diméthylpyrazol-1-yl) méthanol (composé B) a été faite en utilisant la méthode FRAP. Les résultats sont résumés dans le tableau 8.

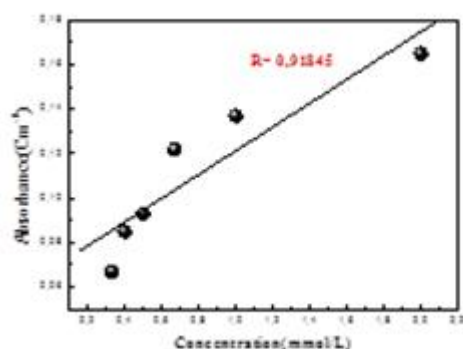


Figure 31: pouvoir réducteur de ferrocyanure de Potassium par le composé (A)

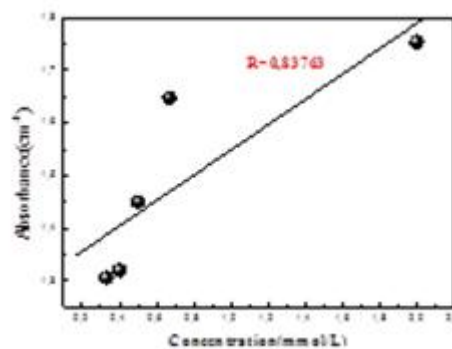


figure 32 : pouvoir réducteur de ferrocyanure de potassium par le composé (B)



Image 2 : composé A

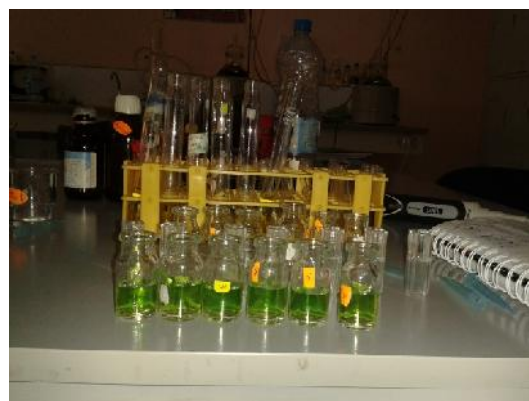


image 3 : composé B



Image4 :acide ascorbique

Tableau 8 : activité anti oxydante des composés (A et B)

Echantillons	Concentration (mmol/L)	Absorbance (cm ⁻¹)
(A)	0,33	1,306
	0,40	1,320
	0,50	1,450
	0,67	1,648
	1	1,736
	2	1,754
(B)	0,33	0,067
	0,40	0,085
	0,50	0,093
	0,67	0,122
	1	0,137
	2	0,165

D'après les résultats du tableau 8, le composé A présente à différentes concentrations des activités anti oxydantes 10 à 20 fois plus importantes que celles du composé B. Le composé A donne des absorbances de 1,306 à 1,754 cm⁻¹ pour des concentrations allant de 0,33 à 2 mmol/L alors que pour les mêmes concentrations, le composé B donne des absorbances de 0,067 à 0,165 cm⁻¹.

Comme le témoigne les figures 31 et 32, le composé A s'avère être un bon réducteur des ions ferriques en ions ferreux en comparant son absorbance avec celle de la vitamine C.

VII. CONCLUSION

L'évaluation de l'activité anti oxydante réalisée sur deux séries de ligands bipyrazoliques a été réalisée dans un premier temps par la méthode de réduction du radical DPPH[•]. Les ligands synthétisés à partir du précurseur 1- (hydroxyméthyl)-5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle, ligands possédant un groupement ester, groupement attracteur en position 3 sur le cycle pyrazolique (série 2) ont donnés de meilleures activités antioxydantes que ceux de la

série 1, ligands possédant un groupement méthyle donneur sur la 3 du pyrazole (figures 17 et 18). Ces résultats ont été confirmés par la méthode FRAP. Les mêmes constatations ont été faite sur les deux précurseurs de base des deux séries 1- (hydroxyméthyl)-5-méthyl-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle (A) et (3,5-diméthylpyrazol-1-yl) méthanol (B).

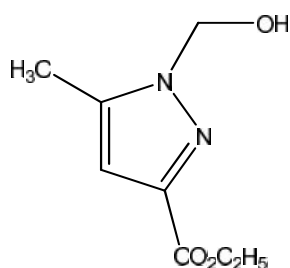
Les ligands L3, L4, L8 et L9, ligands possédants 4 pyrazoles dans leur structure, ont donné de meilleures activités antioxydantes.

On peut conclure que la présence du groupe ester en position 3 sur le cycle pyrazolique et le nombre d'hétérocycles aromatiques présents dans la structure des différents ligands influent positivement sur l'activité anti oxydante de nos composés.

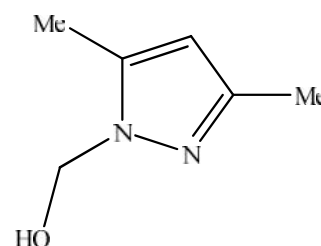
Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Dans ce travail de master, nous avons atteint nos objectifs de départ à savoir la synthèse d'une série de composés tripodales bipyrazoliques à partir du 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyle-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle et une série d'amines appropriées. L'évaluation de l'activité anti oxydante s'est faite sur nos composés synthétisés et une deuxième série de composés analogues préparés au sein du laboratoire à partir d'un autre précurseur de base qui est le (3,5-diméthylpyrazol-1-yl) méthanol.



1-(hydroxyméthyl)-5-méthyle-1H-pyrazole-3- carboxylate d'éthyle



(3,5-diméthylpyrazol-1-yl) méthanol.

Dans le premier chapitre, une recherche bibliographique a été faite portant sur un certain nombre de composés comportant dans leur structure le motif pyrazole et possédant des activités biologiques.

Le deuxième chapitre a été consacré à la synthèse d'une série de ligands tripodales à base de pyrazole.

La synthèse de ces composés consiste en une bi ou tétra condensation du précurseur de base 1-(hydroxyméthyl)-5-méthyle-1H-pyrazole-3-carboxylate d'éthyle avec un équivalent de l'amine adéquate dans un milieu anhydre. Les produits sont obtenus avec des bons rendements.

Dans le troisième chapitre, une évaluation de l'activité antioxydante des ligands L1-L10 a été faite en utilisant les deux méthodes analytiques disponibles au sein de notre laboratoire ; la méthode DPPH[•] et la méthode FRAP. Les résultats montrent un grand écart en ce qui concerne l'activité de ces derniers.

Toutefois, les meilleurs pouvoirs anti oxydants des ligands L3, L4 de la première série et les ligands L8, L9 de la deuxième série révélés par la méthode DPPH[•] sont confirmés par la méthode FRAP.

Les résultats de l'activité anti oxydante de nos ligands sont encourageants et montrent que ces composés peuvent avoir un avenir attrayant dans ce domaine.

En continuation au travail réalisé au cours de ce mémoire de master, on souhaite bien développer et étendre plusieurs points sur le plan de la synthèse ainsi que sur le plan des activités biologiques.

- ❖ Synthétiser de nouveaux précurseurs pyrazoliques substitués.
- ❖ Exploiter différentes fonctions réactives des ligands afin d'obtenir de nouveaux composés.
- ❖ Elargir le spectre des activités biologiques des ligands (activité anti bactérienne, anti fongique, anti inflammatoire, anti tumorale).

Référence

Référence :

- [1] Sayed Hasan M., Raza Murad G., Rokiah H., Fátima M. C. Guedes da S., Othman S., Vikneswaran M., Marimuthu M., Mehnaz N., « Synthesis, characterization and cholinesterase enzymes inhibitory activity of 1-[3-methyl-5-(2,6,6-trimethyl-cyclohex-1-enyl)-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-ethanone », *Journal of Molecular Structure*, vol 1049, pp 488–493, 2013.
- [2] Safiye Emirdağ-E., Szilvia H., Jeurgen C. b., “Uwe Beifuss, Laccase-catalyzed reaction of 3-tert-butyl-1H-pyrazol-5(4H)-one with substituted catechols using air as an oxidant”, *Tetrahedron*, vol 69, pp 3664-3668, 2013.
- [3] K. Ajay Kumar, P. Jayaropa, “Pyrazoles: Synthetic Strategies and Their Pharmaceutical Applications-An Overview”, *International Journal of PharmTech Research CODEN (USA): IJPRIF ISSN : 0974-4304 Vol. 5*, pp 1473-1486, 2013.
- [4] B.P. Bandgar, S.S. Gawande, R.G. Bodade, N.M. Gawande, C.N. Khobragade, *Bioorg. Med.Chem.*, vol.17, pp 8168-8173, 2009.
- [5] B.P. Bandgar, H.V. Chavan, L.K. Adsul, V.N. Thakare, S.N. Shringare, R. Shaikh, R.N. Gacche, Design, “synthesis, characterization and biological evaluation of novel pyrazole integrated benzophenones” , *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, pp 912-916, 2013.
- [6] S. Güniz Küçükgül, Sevil S. Enkardes, “Recent advances in bioactive pyrazoles”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 97, pp 786-815, 2015.
- [7] Knorr, L. *Ber.Dtsch. Chem. Ges.*, vol 16, pp 2599-2599, 1883.
- [8] X. Zhang, J. Kang, P. Niu, J. Wu, W. Yu, J. Chang, “I₂-Mediated Oxidative C-N Bond Formation for Metal-Free One-Pot Synthesis of Di-, Tri-, and Tetrasubstituted Pyrazoles from α,β -Unsaturated Aldehydes/Ketones and Hydrazines”, *J. Org. Chem.*, vol 79, pp 10170-10178, 2014.
- [9] F. Gosselin, P. D. O'Shea, R. A. Webster, R. A. Reamer, R. D. Tillyer, E., “Highly Regioselective Synthesis of 1-Aryl-3,4,5-Substituted Pyrazoles Francis Gosselin*, Paul D. O'Shea, Robert A. Webster, Robert A. Reamer, Richard D. Tillyer, Edward J. J. Grabowski”, J. J. Grabowski, *Synlett*, pp 3267-3270, 2006.
- [10] F. A. Rosa, P. Machado, P. S. Vargas, H. G. Bonacorso, N. Zanatta, M. A. P. Martins, “Straightforward and regiospecific synthesis of pyrazole-5-carboxylates from unsymmetrical enaminodiketones”, *Synlett*, pp 1673-1678, 2008.
- [11] C. Ma, Y. Li, P. Wen, R. Yan, Z. Ren, G. Huang, “Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Pyrazoles from Phenylhydrazones and Dialkyl Ethylenedicarboxylates in the Presence of Bases”, *Synlett*, pp 1321-1323, 2011.

[12] B. Maggio, G. Daidone, D. Raffa, S. Plescia, L. Mantione, V.M. Catena Cutuli, N.G. Mangano, A. Caruso, "Synthesis and biological evaluation of new indazole derivatives", *Eur. J. Med. Chem.* Vol. 36, pp 737 -742, 2001.

[13] A.A. Bekhit, T. Abdel-Aziem, Design, "synthesis and biological evaluation of some pyrazole derivatives as anti-inflammatory-antimicrobial agents", *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 12, pp 1935-1945, 2004.

[14] M. Amir, S. Kumar, "synthesis and anti-inflammatory, analgesic, ulcerogenic and lipid peroxidation activities of 3,5-dimethyl pyrazoles, 3-methyl pyrazol-5-ones and 3,5 disubstituted pyrazolines", *Indian J. Chem.*, vol. 44B, pp 2532-2537, 2005.

[15] B. Cottineau, P. Toto, C. Marot, A. Pipaud, "Synthesis and hypoglycemic evaluation of substituted pyrazole-4-carboxylic acids", *J. Chenault, Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 12, pp 2105-2108, 2002.

[16] K.B. Umesha, K.M.L. Rai, M.A. Harish Nayaka, *Int. J. Biomed. Sci.*, pp 5359-368, 2009.

[17] G.C. Gerritsen, W.E. Dulin, *Diabetes*, vol. 14, pp 507-515, 1963.

[18] I. Bouabdallah, L.A. M'Barek, A. Ziad, A. Ramdani, I. Zidane, A. Melhaoui, "anticancer effect of three pyrazole derivatives", *Nat. Prod. Res.*, vol. 20, pp 1024-1030, 2006.

[19] Tariq Harit, Fouad Malek, Brahim El Bali, Ajmal Khan, "Synthesis and enzyme inhibitory activities of some new pyrazole-based heterocyclic compounds", *Medicinal Chemistry Research*, 2011.

[20] M. El Kodadi, M. Benamar, I. Bouabdellah, "New synthesis of two tridentate bipyrazolic compounds and their cytotoxic activity tumor cell lines", *Naturel Product Research*, vol. 21, pp 947- 952, 2007.

[21] M. Daoudi, N. Ben Larbi, A. Kerbal, B. Bennani, J.P. Launay, J. Bonvoisin, T. Ben Hadda, and P. Dixneuf, "synthesis, properties and molecular-structures of iron(III), cobalt(II), nickel(II), copper(II), copper(I) and zinc(II) complexes with n,n-bis(pyrazol-1-ylmethyl)benzylamine", *tetrahedron*, vol. 62, p. 3123, 2006.

[22] M. El Kodadi, "nouveau tripodes pyrazoliques et quinoxalines fonctionnalisés. complexation, étude structurale et activité catalytiques et biologiques," *chimie org-biochimie, Faculté des sciences, Oujda*, pp. 52, 2005

[23] M. R. Malachowski, B. Dorsey, J. G. Sackett, R. S. Kelly, A. L. Ferko, and R. N. Hardin, "effect of ligand donors on the catalytic properties of metal-complexes - copper(II) complexes as catalysts for the oxidation of 3,5-di-tert-butylcatechol," *Inorg Chim Acta*, vol. 249, p. 85, 1996.

[24] I.Bouabdellah, "synthèse et étude de nouveaux ligands monocentriques et bicentriques à base d'hétérocycles," chimie org-biochimie, Faculté des sciences, Oujda, pp. 65, 2006.

[25] touzani R., syunthèse de nouveaux ligands mono et di-heterocyclique et étude de leur complexation avec le ruthenium (II) et leur activité biologique (antifongique-anti cancer – anti microbienne et interaction avec l'ADN, pp 43, 2001.

[26] Bonnefont-Rousselot D., "Glucose and reactive oxygen species", *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol5, pp. 561, 2002.

[27] Jenner P., "Oxidative stress in Parkinson's disease", *Ann. Neurol*, vol53, pp. S26, 2003.

[28] Migliore L, Coppede F., "Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases", *MutatRes*, vol 512, pp. 135–53, 2002.

[29] Cadenas E., Davies J.A., "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging", *Free Radic. Biol. Med.*, vol 29, pp. 222, 2000.

[30] BENBRINIS S., « Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolinachamaecyparissus* », *mémoire de magister en biochimie*, pp 16, 2012.

[31] Cadenas E., Davies J.A., "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging", *FreeRadic. Biol. Med.*, vol29, pp. 222, 2000.

[32] Wardman P., Candeias L.P., « Fenton chemistry: an introduction, *Radiat. Res* ». , vol145, pp. 523, 1996.

[33] Taylor & Francis, Londres , "von Sonntag C., Enzymes (chap. 14)", *The Chemical Basis of Radiation Biology*, pp. 429, 1987.

[34] Halliwell B., Gutteridge J.M.C., "Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed", Oxford University Press, 1999.

[35] Favier A., « Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique ». *L'actualité chimique*, pp 108-115, 2003.

[36] Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z et Jore D., « Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? », *L'actualité chimique*, pp 91-96, 2003.

- [37] Tessier F & P Marconnet ., Radicaux libres, « systèmes antioxydants et exercice », *Science & Sport* , vol 10, pp 1-13, 1995.
- [38] Goudable J. et Favier A. « Radicaux libres oxygénés et antioxydants », *Nutr .Clin. Métabol.*, vol 11, pp 115-120, 1997.
- [39] Lecerf JM, Luc G, Fruchart JC. « Vitamine E, antioxydants et athérosclérose », *Rev Med Interne* , vol. 15, pp 641-9, 1994.
- [40] Pincemail J, Meurisse M, Limet R et Defraigne J O., « L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin ». *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, vol 4, 1999.
- [41] Fontaine, Éric., « Radicaux libres et vieillissement », *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, vol 42 pp 110-115, 2007.
- [42] Mira J.-P., « L'albumine endogène : un pouvoir antioxydant majeur », *Réanimation*, vol 3, pp 7-9, 2008.
- [43] Jizzedine et coll., Diabète et stress oxydant, 2011.
- [44] Ghedira K. « Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique », *Phytother* .vol 3, pp 162-169, 2005
- [45] Derbel S., Ghedira K., « Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie* », vol 1, pp 28-34, 2005.
- [46]. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. "The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids", *Free Radical Research*, vol. 22, pp 375-383, 1995.
- [47]. Bartosz G." Generation of reactive oxygen species in biological systems", *Comments on Toxicology*", vol. 9, pp5-21, 2003.
- [48] SemaDemirciÇekiç, KevserSözgenBa kan, Esmatütem, Re atApak, "Modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay for measuring the antioxidant capacities of thiol-containing proteins in admixture with polyphenols", *talanta*, Vol. 79, pp. 344-351, 2009.
- [49] Ozcelik, O., Lee, J. H., & Min, D. B, "Effects of light, oxygen and pH on the Absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl", *Journal of Food Science*, vol. 68, pp. 487-490, 2003.
- [50]. Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J., Dommes J. , "Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests", *Food Chemistry*, vol. 113, pp1226-1233, 2009

- [51]. de Gaulejac Saint-Cricq, Provost N., Vivas N. “Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, pp 425-431, 1999.
- [52]. Hua Li, Xiaoyu Wang, Peihong Li, Yong Li, Hua Wang. ,“Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitisvinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods”,*Journal of Food and Drug Analysis*, vol.16, pp67-73, 2008.
- [53] BLOIS M S.,” Antioxidant determinations by the use of stable free radical”. *Nature.*, vol. 181, pp1199-1200. 1958.
- [54] BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M E., BERSET C., “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*, vol. 28, pp 25-30, 1995.
- [55]. Molyneux P., “The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity”, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, vol. 26, pp 211-219, 2004.
- [56] Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T., & Tatematsu, M,”Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis”, *Journal of Food Chemistry and Toxicology*, vol. 24, pp. 1099–1102, 1986.
- [57] Blois M.S,” Antioxidant determinations by the use of stable free radical”, *Journal of Nature*, vol. 181, pp. 1199-1200. 1958
- [58] Jing D, WangyuanCh, Guangzhong Y, “A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay”, *Journal of Food Chemistry*, vol. 125, pp. 1430–1435, 2011.
- [59] Molyneux P., “The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity”, *Journal of Songklanakarin J. Sci. Technol.* Vol. 26, pp.211-219, 2004.
- [60] KEBAB r., « étude de pouvoir antioxydant des polyphénols issu des margines d’olives de la variété *chamlal* :Evaluation de l’activité avant et après déglycosylation », thèse de magister. 2014
- [61] SANCHEZ-MORENO C., LARRAURI JOSE .and SAURA- CALIXTO F. A.” procedure to measure the anti radical efficiency of polyphenol “.*J. of the Sci of food and agriculture .*, vol 76 ,pp 270-276,1998.
- [62] GODOY H.T. and SCHERER R. “Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method” .*food chem.*, vol 112, pp 654-658, 2009.
- [63] EBRAHIMZADEH M. A., NABAVI S. F., NABAVI S. M., MAHMOUDI M., ESLAMI B. and DEHPOUR A. A. “Biological and pharmacological effects of Delphinium elbursense”, *Afr. J. of Biotechnol.*, vol 9, pp 5542-5549, 2010.

[64] Majhenic L., Kerget M.S., et Knez Z., "Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts". *Food Chemistry*. Vol. 104, pp1258–1268, 2007.

[65] BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E. and BERSET C., "Use of free radical method to evaluate antioxidant activity", *Lebensm. Wiss. Technol.*, vol 28, pp 25-30, 1995.

[66] Oyaizu, M., "Studies on products of browning reaction- Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine", *Japanese Journal of Nutrition.*, vol 44, pp 307–315, 1986.

[67] Chung Y-C., Chang C-T., Chao W-W., Lin C-F., et Chou S-T., "Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 50, pp 2454–2458, 2002.

[68] EBRAHIMZADEH M.A., POURMORAD F. and HAFEZI S., "Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk", *Turk. J. Biol.*, vol 32, pp 1-7. 2008.