

Université Abdelhamid Ibn Badis - Mostaganem
Faculté des Sciences Exactes et de l'Informatique
Département de Chimie

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Chimie

Option : Chimie Appliquée

Présenté par : M^{elle} SAIDI Senia

Intitulé

**Synthèse, Caractérisation et Investigation Pharmacologique des 1,3,4-
Oxadiazole-5-Thionyls Dérivés de Quelques Acide Carboxyliques**

Soutenu le : 26/06/2024

Devant le Jury Composé de :

Président de jury : Dr. BOURAHLA Sarra Université de Mostaganem

Examineur : Dr. KADI Abdelkader Université de Mostaganem

Encadrant : Dr. MAHI Fatima Imane Université de Mostaganem

Année Universitaire 2023/2024

الملخص

يتركز العمل في هذه المذكرة على صنع مركبان كيميائيان لنظائر الديازولات مشتقان من حمضين كربوكسيليين. أثبتت التراكيب الكيميائية بواسطة الأشعة تحت الحمراء. يشمل هذا العمل أيضا على إختبار مضاد الأكسدة الذي أظهر نشاطا معتدلا مقارنة بالفيتامين سي المستعمل كشاهد. أما إختبار فعالية هذه المركبات ضد مجموعة من بكتيريا وخميرة فطرية ممرضة و/أو مفسدة لم يظهر أي نشاط مثبط.

المصطلحات الرئيسية : أحماض كربوكسيلية ، ديازولات ، مضاد الأكسدة ، نشاط مثبط.

Résumé

Notre travail consiste à la synthèse de deux molécules de type 1,3,4-oxadiazole-5-thionyl, dérivés de deux acides carboxyliques. Leurs structures ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge. Le test du pouvoir antioxydant en utilisant la méthode du DPPH a montré des résultats modérés par rapport à la référence acide ascorbique. L'activité antibactérienne réalisée sur des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif et antifongique sur la levure pathogène *Candida albicans* n'ont montré aucun effet inhibiteur.

Mots Clés : acide carboxylique, 1,3,4-oxadiazole, activité antimicrobienne, synthèse, caractérisation.

Abstract

Our work consists of the synthesis of two derivatives of 1,3,4-oxadiazole-5-thionyl from two carboxylic acids. Their structures have been characterized by infrared spectroscopy. The antioxidant power using the DPPH assay showed moderate results compared to the reference ascorbic acid. The antibacterial activity on Gram-positive and Gram-negative bacteria and antifungal activity didn't manifest any inhibitory effect.

Keywords : Carboxylic acids, 1,3,4-oxadiazole, antimicrobial activity, synthesis, characterization.

ترحم

أسألك اللهم بأسمائك الحسنى، ورحمتك ولطفك أن تصب على أبي، فقيد قلبي، مغفرة
ورحمة تسع السماوات والأرض، يا ذو الجلال والإكرام أسكنه أعلى مراتب جنتك
وأنس وحشته ووسع قبره واجعله روضةً من رياض الجنة ولا تجعله حفرةً من حفر
النار، اللهم اجعل قبره في نورٍ وارفح درجته وأعظم أجره.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, pour m'avoir protégé, guidé et orienté durant toute ma vie et tout le long de mon parcours universitaire, le courage, la patience et la volonté qu'Allah m'a donné pour accomplir ce modeste travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma reconnaissance à mon encadrante Mme. MAHI Fatima Imane. Je la remercie de m'avoir encadré, orienté et aidé, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion et à la conduite de cette recherche.

Je souhaite témoigner mes remerciements à Mme BOURAHLA et Mr. KADI pour le temps accordé afin de lire et juger ce travail en qualité de membres du jury.

Je remercie mon père, paix à son âme, qui m'a élevé et m'a transmis la bonne éducation, les bonnes manières et le savoir vivre. Il m'a appris à affronter les épreuves de la vie, me battre et être forte, tout en étant gentille et moi-même.

Un grand merci à ma mère, qui m'a porté pendant 9 mois, m'a donné naissance et de m'avoir élevé de la meilleure des manières, qui m'a poussé et encouragé à terminer mon parcours universitaire. Merci, ma mère, mon soutien dans la vie.

Merci, mes frères, mon soutien dans la vie après l'absence de mon père. Merci d'être à mes côtés, me soutenir, aider et orienter, pour l'amour que vous m'avez donné et pour me traiter comme une princesse.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Un grand merci également à tous les professeurs pour leur excellent travail, patience et pour les efforts qu'ils consentent pour nous transmettre le savoir.

Merci également aux ingénieurs des laboratoires de pédagogie de la faculté des Sciences Exactes et de l'Informatique - Université de Mostaganem, d'être patient et de m'aider à accomplir mon travail.

Merci

Dédicaces

Je dédie le fruit de mes études à mon père qui a voulu toujours me voir dans les hauteurs.

À ma tendre mère et mes frères qui ont toujours été à mes côtés et m'ont toujours soutenu tout au long de ces longues années d'études.

À mon encadrante Mme. MAHI Fatima Imane qui ma aider et encourager à finir ce travail.

À mes meilleures amies Otmane Maroua, Belhouari Ikbal, Tahari Fatima, Benotsmane Maroua, Guessar Asma et Mokhtar Laila.

À tout ma famille et tous ceux qui m'aiment et que j'aime.

Symboles et Abréviations

%	Pourcent
α	Alpha
β	Béta
Δ	Chauffage
μL	Microlitre
$\mu\text{g/mL}$	Microlitre par millilitre
ν_{max}	Fréquence d'Absorption Maximale
A_0	Absorbance du contrôle
A_{517}	Absorbance à 517 nm
ABTS*•	Acide 2,2'-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonique)
AcOH	Acide acétique
A_E	Absorbance de l'échantillon
AK	Amikacine
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. cereus</i>	<i>Bacille cereus</i>
Br	Brome
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CCl_4	Tétrachlorométhane
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
cm	Centimètre
cm^{-1}	Centimètre Réciproque
CS_2	Disulfure de carbone
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
d	Densité
DCC	N,N'- dicyclohexylcarbodiimide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Éthanol
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
g	Gramme
g/mol	Gramme par mole
h	Heure
H^+	Proton
H_2O	Eau
H_2SO_4	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique

I%	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne
I₂	Diode
IC₅₀	50 % d'inhibition de la croissance ou du pouvoir antioxydant
ID	Indéterminé
Inh.	Inhibition
i-PrOH	Alcool isopropylique
IR	Infrarouge
KI	Iodure de potassium
KMnO₄	Permanganate de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
MeCN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
mg/mL	Milligramme par millilitre
MgSO₄	Sulfate de magnésium
M.H	Muller Hinton
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Masse Molaire
mol	Mole
N	Normal (Normalité)
H₂NNH₂	Hydrazine
NaHCO₃	Bicarbonate de soude
NaOH	Hydroxyde de sodium
nm	Nanomètre
NT	Non testé
O-xileNo	Diméthylbenzène
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PG	n-propyl gallate
pH	Potentiel hydrogène
PI	Pourcentage d'inhibition
PPh₃	Triphénylphosphine
ppm	Partie par Million
R_f	Rapport frontal
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
T	Température
T. A.	Température Ambiante
T_{éb}	Température d'ébullition
T_f	Température de fusion
UV	Ultraviolet

Liste des Figures

Figure 1 - Structures de l'acide benzoïque et l'acide 4-hydroxybenzoïque.....	2
Figure A.I.1 - Les quatre isomères d'oxadiazole	4
Figure A.II.1 - Structure chimique du β -carotène et de la vitamine A	10
Figure A.II.2 - Structure chimique du tocophérol (vitamine E).	11
Figure A.II.3 - Structure chimique de l'acide ascorbique (vitamine C).....	11
Figure A.II.4 - Structure chimique d'astaxanthine.	12
Figure A.II.5 - Structure chimique du gallate de propyle	12
Figure A.II.6 - Structure chimique du radical libre DPPH.....	13
Figure A.III.1 - Morphologie de la bactérie.....	16
Figure A.III.2 - Observation sous microscope optique des bactéries à Gram positif et négatif après une coloration de Gram.	17
Figure A.III.3 - Différences entre la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.	18
Figure A.III.4 - Différentes formes et associations bactériennes.	19
Figure A.III.5 - <i>Staphylococcus aureus</i> (Vu sous microscope électronique à balayage).	20
Figure A.III.6 - <i>Bacillus cereus</i> (Vu au microscope électronique).	20
Figure A.III.7 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Vu au microscope).	21
Figure A.III.8 - <i>Escherichia coli</i> (Vu au microscope).....	21
Figure A.III.9 - Champignons microscopiques (mycètes et levures).	22
Figure A.III.10 - La levure <i>Candida albicans</i>	22
Figure B.II.1 - Structure chimique du radical libre DPPH.....	32
Figure B.III.1 - Représentation schématique des zones d'inhibitions.....	38
Figure C.II.1 - Pouvoir antioxydant des composés testés par rapport à l'acide ascorbique à une concentration de 1000 ppm.....	46
Figure C.II.2 - Décoloration des produits testés par la réduction des radicaux DPPH en fonction des différentes concentrations (en ppm).....	47
Figure C.II.3 - Détermination des IC ₅₀ des produits testés par extrapolation sur l'axe des concentrations ($\mu\text{g/mL}$).....	48
Figure C.III.1 - <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 33862).....	51
Figure C.III.2 - <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 10876).	51
Figure C.III.3 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
Figure C.III.4 - <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).....	51
Figure C.III.5 - <i>Candida albicans</i> (ATTC 10231).....	52

Liste des Schémas

Schéma A.I.1 – Activités biologiques des 1,3,4-oxadiazoles.	6
Schéma A.I.2 - Les Différentes méthodes de synthèses des 1,3,4-oxadiazoles.	7
Schéma A.I.3 Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles à partir de la cyclisation des acylhydrazones.	7
Schéma A.I.4 - Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles à partir de la cyclisation des acylhydrazones. ...	8
Schéma A.I.5 - Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles à partir de la cyclisation des diacylhydrazines...	8
Schéma A.I.6 - Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles par déshydratation des diacylhydrazines.	8
Schéma A.I.7 - Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles par cyclisation des semicarbazones.	8
Schéma A.I.8 - Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles par cyclodésulfuration des thiosemicarbazides.	9
Schéma A.I.9 - Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles par un réarrangement du cycle tétrazole.	9

Liste des Tableaux

Tableau B.1 - Les produits chimiques et solvants utilisés.	25
Tableau B.III.1 - Les souches microbiennes pathogènes utilisées.	36
Tableau C.II.1 - Activité antioxydante (%) et IC ₅₀ des composés testés par rapport à l'acide ascorbique à une concentration de 1000 ppm.	45
Tableau C.III.1 - Effet antimicrobien des produits de synthèse sur les microorganismes pathogènes (Les zones d'inhibition sont données en mm).	50

Table de Matières

Introduction Générale	2
-----------------------------	---

Partie A. Bibliographie

Chapitre A.I - 1,3,4-Oxadiazoles

1. Introduction	5
2. Les oxadiazoles	5
3. Méthodes de synthèses des 1,3,4-oxadiazoles	6
4. Conclusion	9

Chapitre A.II - Activité Antioxydante

1. Introduction	11
2. Substances antioxydantes.....	11
2.1. Le β -carotène (provitamine A)	11
2.2. Le tocophérol (vitamine E).....	12
2.3. L'acide ascorbique (vitamine C).....	12
2.4. L'astaxanthine	12
2.5. Le gallate de propyle	13
3. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes	13
4. Radical libre	13
5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH.....	14
5.1. Principe de la méthode	14

Chapitre A.III - Activité Antimicrobienne

1. Introduction	16
2. Les bactéries	16
2.1 Morphologie	16
2.2. Classification des bactéries.....	17
2.2.1. La paroi cellulaire	17
2.2.2. La forme cellulaire.....	18
2.2.3. La mobilité	19
2.2.4. Le métabolisme	19
2.3. Bactéries utilisées dans le test antibactérien.....	19
2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	19

2.3.2. <i>Bacillus cereus</i>	19
2.3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
2.3.4. <i>Escherichia coli</i>	20
3. Champignons microscopiques.....	20
3. 1. La levure choisie pour le test	21
3.1.1. <i>Candida albicans</i>	21
4. Conclusion	21

Partie B. Expérimentale

Généralités

1. Matériels et appareils utilisés	23
2. Produits chimiques et solvants utilisés	25

Chapitre B.I - Synthèse Organique

1. Introduction.....	28
2. Synthèse du 1,3,4-oxadiazoles-5-thionyl dérivé de l'acide benzoïque	28
2.1. Synthèse de l'éthyle benzoate (A2).....	28
2.2. Synthèse du benzohydrazide (A3)	29
2.3. Synthèse du 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione (A4)	29
3. Synthèse du 1,3,4-oxadiazoles-5-t,hionyl dérivé de l'acide 4-hydroxybenzoïque.....	30
3.1. Synthèse de l'éthyle 4- hydroxybenzoate (B2).....	30
3.2. Synthèse du 4-hydroxybenzohydrazide (B3).....	30
3.3. Synthèse du 5-(4-hydroxyphenyl) -1,3,4-oxadiazole-2(3H) -thione (B4)	31

Chapitre B.II - Activité Antioxydante

1. Introduction.....	33
2. Principe	33
3. Evaluation de l'effet antioxydant	34
4. Mesure de la valeur IC ₅₀	34

Chapitre B.III - Activité Antimicrobienne

1. Introduction.....	36
2. Les micro-organismes utilisés	36
3. Mise en évidence de l'effet antimicrobien.....	36
3.1. Principe.....	36
3.2. Mode opératoire	37

Partie C. Résultats et Discussion

Chapitre C. I - Synthèse Organique

1. Introduction	40
2. Synthèse du 1,3,4-oxadiazoles-5-thionyl dérivé de l'acide benzoïque	40
2.1. Synthèse de l'éthyle benzoate (A2).....	40
2.2. Synthèse du benzohydrazide (A3)	41
2.3. Synthèse du 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione (A4)	41
3. Synthèse du 1,3,4-oxadiazoles-5-t,hionyl dérivé de l'acide 4-hydroxybenzoïque.....	42
3.1. Synthèse de l'éthyle 4- hydroxybenzoate (B2).....	42
3.2. Synthèse du 4-hydroxybenzohydrazide (B3).....	42
3.3. Synthèse du 5-(4-hydroxyphenyl)-1,3,4-oxadiazole-2(3 <i>H</i>)-thione (B4)	43
4. Conclusion	43

Chapitre C.II - Activité Antioxydante

1. Introduction	45
2. Evaluation de l'activité antioxydante	45
3. Mesure de la valeur IC ₅₀	46
4. Conclusion	48

Chapitre C.III - Activité Antimicrobienne

1. Introduction	50
2. Evaluation de l'activité antimicrobienne	50
3. Conclusion	52

Introduction Générale

Introduction Générale

Les composés bioactifs sont une découverte thérapeutique importante en pratique dans de nombreuses applications. Ces molécules ont également permis de surmonter les complications dans certaines situations grâce à ses effets bénéfiques (antioxydants, anti-inflammatoires, antidiabétiques, antitumorals, antibactériens, etc.) ⁱ. Avec le temps, une résistance s'est développée vis-à-vis ces composés, ce qui a causé un problème mondial sérieux. Ce phénomène de résistance est dû à plusieurs facteurs tels que l'utilisation constante du même composé.

Ce phénomène a orienté les chercheurs pour l'identification de nouvelles molécules avec une large activité biologique en utilisant des méthodes et des technologies de pointes en vue d'obtenir des composés efficaces et puissants pour les êtres vivants à partir des ressources renouvelables et écologiques. Parmi les composés bioactifs très connus, les diazoles qui sont des hétérocycles à cinq chaînons d'origine naturelle présentes dans les aliments, les plantes et certains organismes vivants, ou synthétiques ⁱⁱ.

Au cours des dernières années l'attention des chercheurs s'est concentrée sur les 1,3,4-oxadiazoles et ces dérivés car c'est une molécule importante qui possèdent un large spectre dans différents domaines en raison de leurs propriétés chimiques car le noyau oxadiazole représente une source efficace pour la synthèse d'un grand nombre d'agents actifs thérapeutiques ⁱ.

Le groupement carboxylique est largement utilisé comme matériau de départ pour la synthèse de dérivés des diazoles bioactifs. L'incorporation d'acides carboxyliques aromatiques dans des structures hétérocycliques est une stratégie efficace pour générer de nombreux groupements carboxyliques ⁱⁱ.

A partir de là, nous avons choisi dans ce travail, deux acides carboxyliques à savoir : l'acide benzoïque et l'acide 4-hydroxybenzoïque (**Figure 1**) visant la synthèse de deux dérivés hétérocycliques de type 1,3,4-oxadiazoles en vue d'étudier leur pouvoir pharmacologique.

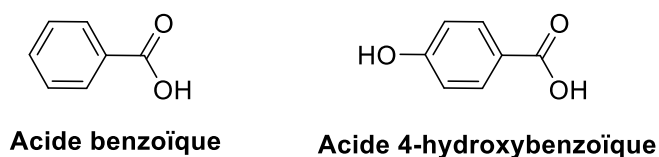


Figure 1 - Structures de l'acide benzoïque et l'acide 4-hydroxybenzoïque.

Et pour y parvenir, ce travail se divisera de la manière suivante :

La première partie A : étant la partie bibliographie, est partagée en trois chapitres : le premier chapitre comporte une étude sur les 1,3,4-oxadiazoles : différentes méthodes de synthèses, applications pharmacologiques et dérivés. Le chapitre qui suit concerne l'activité antioxydante : les substances antioxydantes et méthodes d'évaluation ainsi que le principe de la méthode utilisée. Et le troisième chapitre concerne l'activité antimicrobienne : les bactéries et levure utilisée et le principe de la méthode choisie.

La deuxième partie B : qui est la partie expérimentale, regroupe aussi trois chapitres : le premier chapitre concerne la synthèse organique des 1,3,4-oxadiazole-5-thionyls en partant de deux acides carboxyliques différents le deuxième chapitre concerne l'évaluation de l'effet antioxydant et la mesure de la valeur IC_{50} et le dernier chapitre parle sur la mise en évidence de l'effet antimicrobien.

La troisième partie C : regroupe à son tour trois chapitres et c'est la partie des interprétations et la discussion des résultats obtenus suite à la synthèse des produits finaux et leurs intermédiaires et leur valorisation par l'étude de leur activité pharmacologique.

Enfin, on achève cette thèse par une conclusion générale qui représente l'ensemble des résultats obtenus, les perspectives, les références bibliographiques et webographiques et l'annexe qui comporte tous les spectres infrarouge,

-
- ^{i.} Belkhadem F. (2018). Synthèses, Caractérisation et Evaluation Biologique des 1,3,4-oxadiazoles Dérivés des Acides halo-nitro-aromatiques et leurs Applications en Agrochimie. Thèse de Doctorat en Sciences. *USTO-MB*.
- ^{ii.} Mahi F. I. (2023). Synthèse, Caractérisation et Activités Pharmacologiques des 1,3,4-oxadiazoles-5-thionyl Dérivés de Quelques Acides Hydroxylés et d'un cis-Clérodane Diterpénoïde Extrait de *Cistus monspeliensis*. Thèse de Doctorat en Sciences. *USTO-MB*.

Partie A. Bibliographie

Chapitre A.I.

1,3,4-Oxadiazoles

Chapitre A.I

1,3,4-Oxadiazoles

1. Introduction

Les hétérocycles ou composés hétérocycliques sont des composés organiques possédants une structure cyclique comportant au moins deux éléments différents [1], généralement de carbone et un hétéroatome (O, S, N, P, As, Si, B, etc.) [2]. Selon la classification, les hétérocycles azotés à 5 et 6 chaînons sont les plus stables et les plus fréquents d'où leur synthèse est devenue un sujet très important [3].

2. Les oxadiazoles

Les oxadiazoles appartiennent au groupe des hétérocycliques de la famille des azoles [4], connus sous le nom de furodiazoles d'où la molécule d'oxadiazole est dérivée du furane où deux atomes de carbone sont remplacés par des atomes d'azote de type pyridine [5] d'une formule moléculaire $C_2H_2N_2O$ [6]. Il existe quatre isomères possibles de l'oxadiazole [4], selon la position de l'atome d'azote dans le cycle (**Figure A.I.1**) :

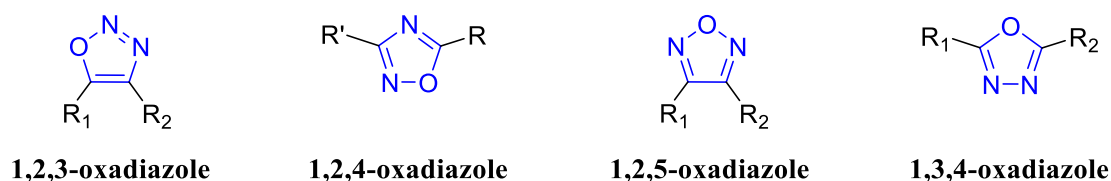


Figure A.I.1 - Les quatre isomères d'oxadiazole

Les molécules d'oxadiazoles ont de nombreuses propriétés et des effets thérapeutiques très puissants [4], ce qui permet de les appliquer dans différents domaines en tant qu'agents actifs par exemple, comme agents antimicrobiens [5].

Les analogues des composés hétérocycliques ont attiré une large attention [4]. Parmi eux, les 1,3,4-oxadiazoles [4], qui ont fait l'objet d'une étude récente [5], c'est une grande classe fascinante et polyvalente de composés ayant un large éventail d'activités biologiques, ce qui les rend très recherchés dans différents domaines [7].

3. Méthodes de synthèses des 1,3,4-oxadiazoles

Le 1,3,4-oxadiazole a une structure isomérique la plus stable thermiquement et partiellement aromatique parmi tous les oxadiazoles isomériques [6]. Elles représentent une série de composés synthétiques d'une importance considérable [8]. Le 1,3,4-oxadiazole a acquis une grande renommée en raison de son importance pratique [9], et son activité pharmacologique significatives. Ces activités pharmacologiques (**Schéma A.I.1**) ont incité les chercheurs à synthétiser de nouveaux composés de 1,3,4-oxadiazoles [10].

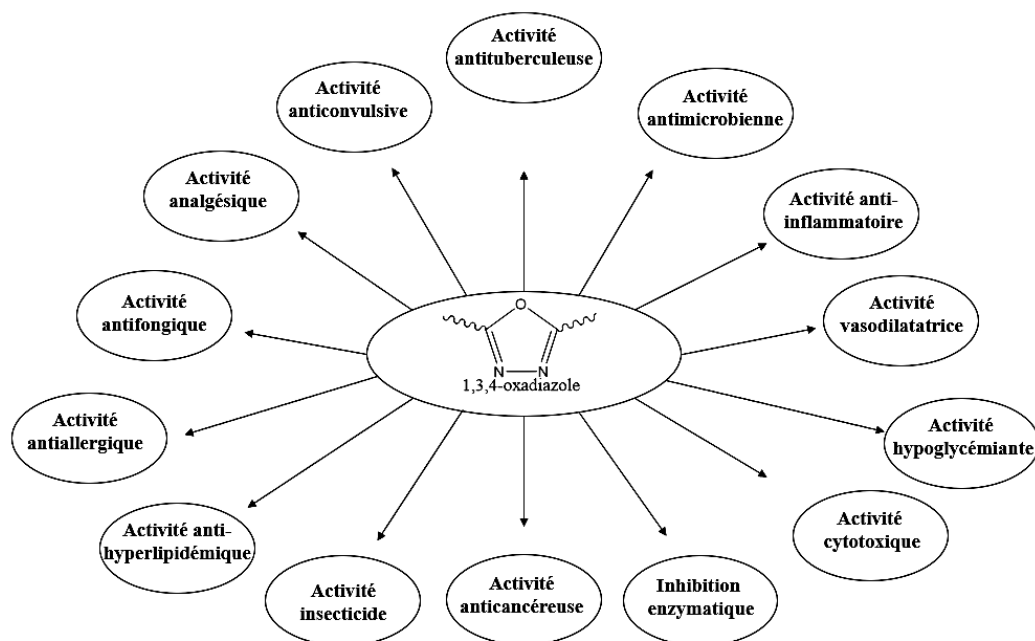


Schéma A.I.1 – Activités biologiques des 1,3,4-oxadiazoles.

La première synthèse de ce cycle a été décrite en 1899 par Robert Stolle, exploite une réaction de condensation d'hydrazides de N,N'-diacides dans des conditions vigoureuses [9, 11]. La littérature fait état de plusieurs méthodes variées pour synthétiser le 1,3,4-oxadiazole [7] (**Schéma A.I.2**).

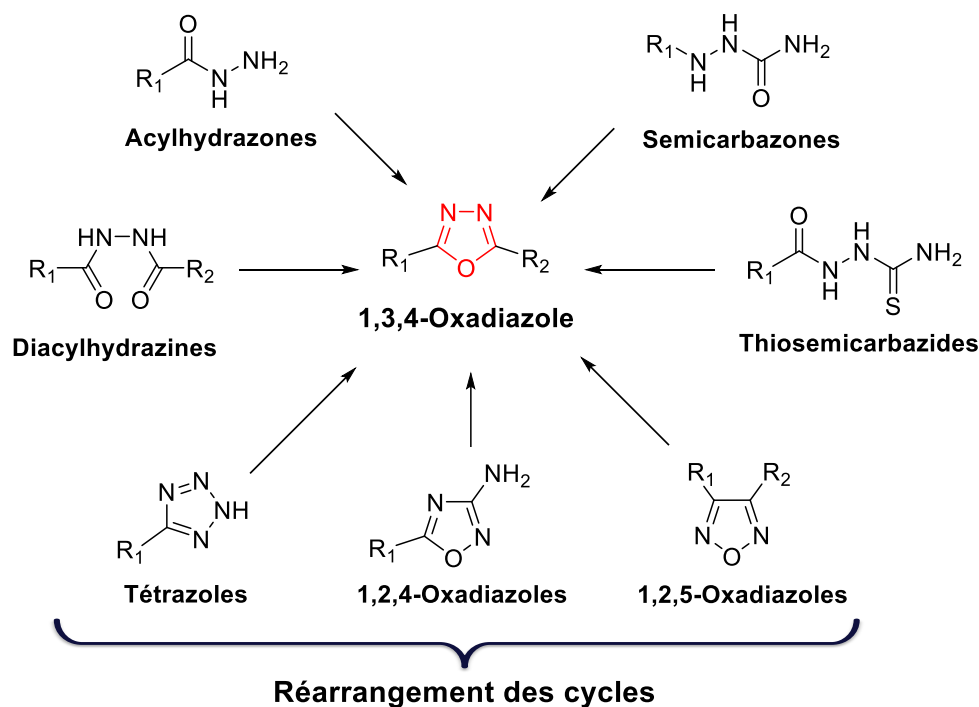


Schéma A.I.2 - Les Différentes méthodes de synthèses des 1,3,4-oxadiazoles.

1. La cyclisation oxydative des acylhydrazones (1) est une méthode pratique pour la synthèse des 1,3,4-oxadiazoles (4) [12] par condensation d'acides arylcarboxyliques hydrazides (3) avec des orthoesters [9, 13]. Divers 1,3,4-oxadiazoles ont été synthétisés à partir d'acylhydrazones.

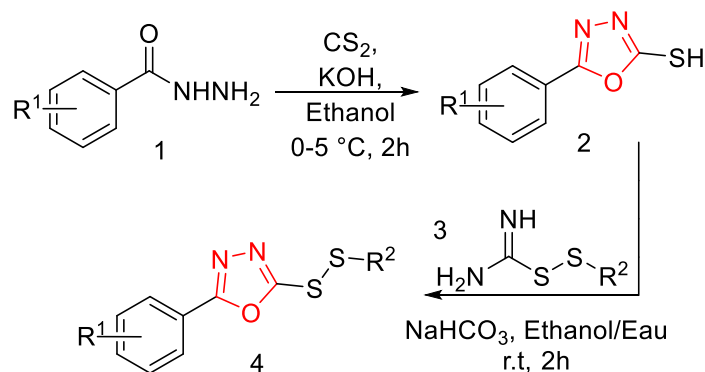


Schéma A.I.3 Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles à partir de la cyclisation des acylhydrazones.

Pour construire la partie 1,3,4-oxadiazole, en présence de disulfure de carbone et d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol (2), on fait réagir des benzohydrazides (1) différemment substitués, ce qui a donné des intermédiaires (3), ces derniers réagissent avec les oxadiazoles fournissant les disulfures (4) (**Schéma A.I.3**) [14].

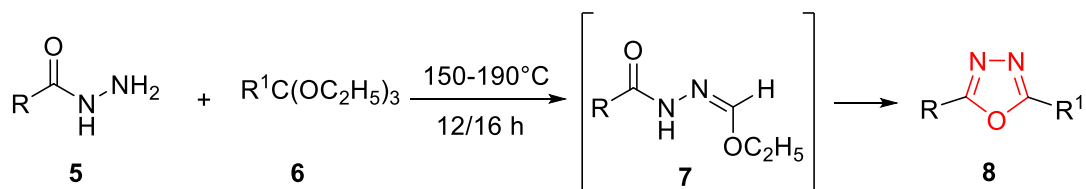


Schéma A.I.4 - Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles à partir de la cyclisation des acylhydrazones.

Varma *et al.*, (2008) ont révisée La réaction ci-dessus (**Schéma A.I.4**) ont réagissant divers hydrazides (5) avec des orthoalcanates de triéthyle ou de l'orthobenzoate de triéthyle (6), en présence de Nafion NR50, en l'absence de tout solvant sous irradiations micro-ondes [15].

2. La première synthèse de ce cycle a été faite par Robert Stolle en (1899) à partir d'une réaction de condensation d'hydrazides de N,N'-diacides pour produire avec des 2,5-diaryl(alkyl)-1,3,4 oxadiazoles [9, 11].

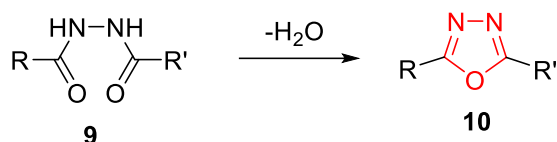
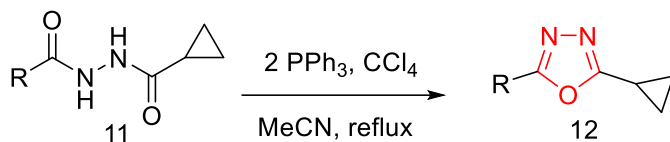


Schéma A.I.5 - Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles à partir de la cyclisation des diacylhydrazines.

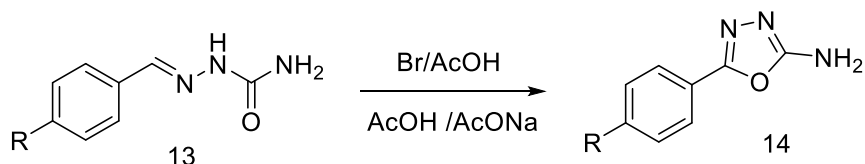
Selon Yang et Shi (2005), la formation des 1,3,4-oxadiazoles à partir d'un halogène en présence du composé de déshydratation PPh₃/CCl₄ (**Scheme A.I.6**) [16]



R = m,m-Me₂C₆H₃, C₆H₅, p-BuOC₆H₄ benzyl, naphthalen-2-yl, tridecyl

Schéma A.I.6 - Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles par déshydratation des diacylhydrazines.

3. Les 5-aryl-2-amino-1,3,4-oxadiazole-2-aminées (14) ont été synthétisés par cyclisation des semicarbazones (13) avec du brome dans de l'acide acétique par électro-cyclisation des semicarbazones [16].



R = H, 4-Cl, 4-NO₂, 4-Me, 4-OH, 4-F, 4-OMe, 2-Cl, 3-Cl, 4-NH₂, 4-N(CH₃)₂

Schéma A.I.7 - Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles par cyclisation des semicarbazones.

4. La cyclodésulfuration des thiosemicarbazides est une autre méthode de synthèse de 1,3,4-oxadiazoles, en utilisant soit le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), un mélange de I₂/NaOH ou KI/NaOH.

En utilisant le 1,3-dibromo-5,5 diméthylhydantoïne comme agent oxydant actif, une nouvelle série de 5-aryl-2-amino-1,3,4-oxadiazoles (16) a été synthétisée en utilisant des réactions de cyclisation de l'acylthio-semicarbazide (15) [16].

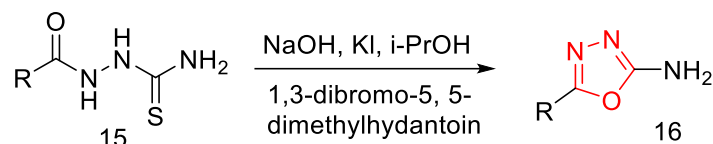


Schéma A.I.8 - Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles par cyclodésulfuration des thiosemicarbazides.

5. Cette méthode est la méthode de la réaction de Huisgen (1963), elle est largement utilisée pour la synthèse de différentes parties du 1,3,4-oxadiazole à partir des cycles.

Le 5-aryl/acyltétrazoles (17) et l'anhydride acide ou les chlorures acides (18) ont été utilisés pour la réaction de Huisgen (**Schéma A.I.9**) [16].

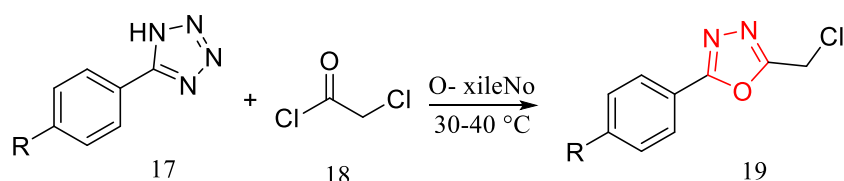


Schéma A.I.9 - Synthèse de 1,3,4-oxadiazoles par un réarrangement du cycle tétrazole.

4. Conclusion

Nous avons choisi de synthétiser certains 1,3,4-oxadiazoles dérivés de deux acides carboxyliques en utilisant la méthode de la cyclisation des acylhydrazones avec le disulfure de carbone.

Partie A. Bibliographie

Chapitre A.II.

Activité Antioxydante

Chapitre A.II

Activité Antioxydante

1. Introduction

L'étude des activités antioxydantes est d'un grand intérêt, d'où la recherche de nouvelles sources d'antioxydants. En effet, les composés bioactifs sont des composés largement répandus dans la vie et leur importance ne cesse de croître, notamment en raison de leurs bienfaits pour la santé. Le rôle antioxydants des composés bioactifs suscite un intérêt croissant dans la prévention et le traitement des maladies tous comme le cancer, elles sont également utilisées comme additifs dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques [17, 18].

2. Substances antioxydantes

Parmi les antioxydants les plus connus : le β -carotène (provitamine A), le tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C), ainsi que les composés d'origine naturelle et les antioxydants synthétiques [19].

2.1. Le β -carotène (provitamine A)

Le carotène a été isolé pour la première fois par Wackenroder en 1831 sous la forme d'un cristal rouge rubis, extrait de la carotte (*Daucus carota*). Les caroténoïdes sont des pigments responsables des couleurs rouge, jaune et orange. Elles sont connues comme un précurseur de la vitamine A (provitamine A). Contrairement à la vitamine A le β -carotène se trouve dans les produits d'origine végétale avec une capacité antioxydante indépendante de l'activité de la provitamine A, il est utilisé comme protecteur solaire pour prévenir la peau de nombreuses maladies [20].

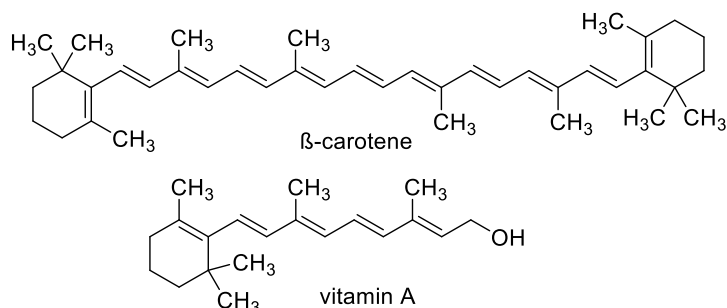


Figure A.II.1 - Structure chimique du β -carotène et de la vitamine A

2.2. Le tocophérol (vitamine E)

Les antioxydants phénoliques, tels que l' α -tocophérol, ont fait l'objet d'une grande partie des travaux de recherche. La description essentielle de son activité a été bien décrite et examinée, la mesure de l'action antioxydante du tocophérol est en fonction de plusieurs variables différentes [21]. Le tocophérol est un puissant anti-oxydant qui neutralise les radicaux libres, protégeant ainsi les membranes cellulaires de notre organisme du stress oxydatif. En outre, le tocophérol fixe l'hydratation dans la couche cornée, il est présent en grandes quantités dans les huiles végétales. Le terme tocophérol regroupe différents dérivés de la vitamine E [22].

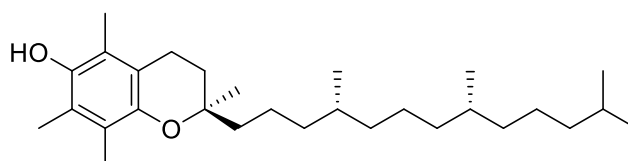


Figure A.II.2 - Structure chimique du tocophérol (vitamine E).

2.3. L'acide ascorbique (vitamine C)

La vitamine C ou l'acide ascorbique est présente dans de très nombreux aliments. On la retrouve en grande quantité dans les poivres, les agrumes et les fruits rouges dont les fraises, le cassis et la tomate. La vitamine C est un anti-oxydant puissant qui aide à lutter contre les radicaux libres qui agressent notre ADN et nos cellules [23].

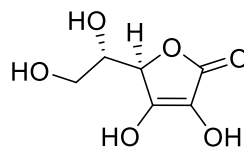


Figure A.II.3 - Structure chimique de l'acide ascorbique (vitamine C).

2.4. L'astaxanthine

C'est l'antioxydant le plus puissant des caroténoïdes à l'état naturel [17]. Les sources d'astaxanthine comprennent les algues vertes, les fruits de mer et les poissons, les bactéries, les champignons, les archées et les chromistes. L'astaxanthine a une capacité d'attaquer les espèces actives de l'oxygène 10 fois supérieure à celle de la zéaxanthine, de la lutéine, de la tunaxanthine, de la cathaxanthine et du β -carotène, et 100 fois supérieure à celle de l' α -tocophérol [24].

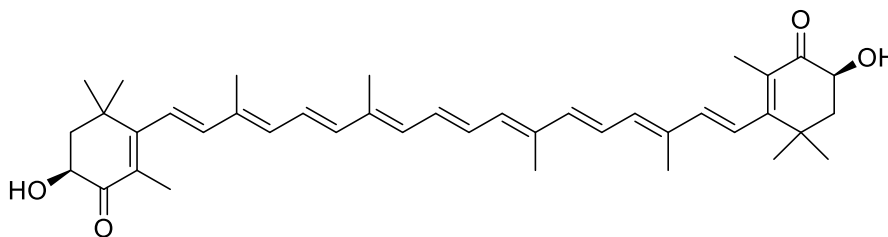


Figure A.II.4 - Structure chimique d'astaxanthine.

2.5. Le gallate de propyle

Le n-propyl gallate, n-propyl 3,4,5-trihydroxybenzoate ou le PG, est une substance synthétique importante utilisée comme antioxydant efficace dans les cosmétiques, les aliments, les produits pharmaceutiques et d'autres domaines. Le PG présente des propriétés anti-inflammatoires, anti-angiogéniques et antitumorales [25].

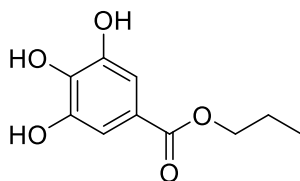


Figure A.II.5 - Structure chimique du gallate de propyle

3. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes

L'activité antioxydante correspond à la capacité d'un composé à résister à l'oxydation. Pour évaluer cette activité, plusieurs méthodes sont disponibles *in vitro* et *in vivo*, comme : le piégeage du peroxyde d'hydrogène, la réduction du fer par la méthode FRAP, la capacité antioxydante par réduction du cuivre CUPRAC, la capacité antioxydante par le test ABTS⁺•, le piégeage du radical DPPH•, que l'on va étudier en détail au cours de ce chapitre [19].

4. Radical libre

Les radicaux libres sont des molécules, atomes ou ions qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe d'électrons. Elles peuvent être fabriquées naturellement lors du fonctionnement normal de l'organisme dans nos cellules [19] et en faible quantité dans les mitochondries. Les radicaux libres sont des molécules qui peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire, d'une forte énergie, des ions oxygène, hydroxyde et de l'eau oxygénée libérés lors des réactions biochimiques et avant d'être neutraliser. Ils provoquent des lésions sur tous les éléments qu'ils côtoient et les détruisent [17, 26].

5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH

Ce test est l'un des premiers tests à recommander pour étudier la relation rapide et directe entre la structure et l'activité antioxydante, pour des composés contenant des fonctions -SH, -NH et -OH. [19], en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse [27].

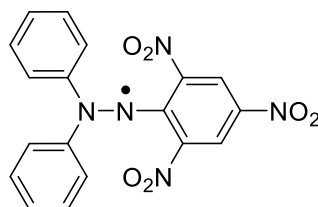


Figure A.II.6 - Structure chimique du radical libre DPPH.

5.1. Principe de la méthode

Le DPPH est un radical organique stable, coloré et centré sur l'azote [28]. Ce test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette) en présence des molécules dites "antioxydantes" afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical [27]. Les antioxydants donneurs d'atome H (RH) sont capables de réduire DPPH•, ce qui conduit à la formation du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine (DPPH-H) et au radical R•. La couleur violette disparaît lorsqu'il est réduit par un capteur de radicaux et apparition d'une couleur jaune (Schéma A.2) [28].

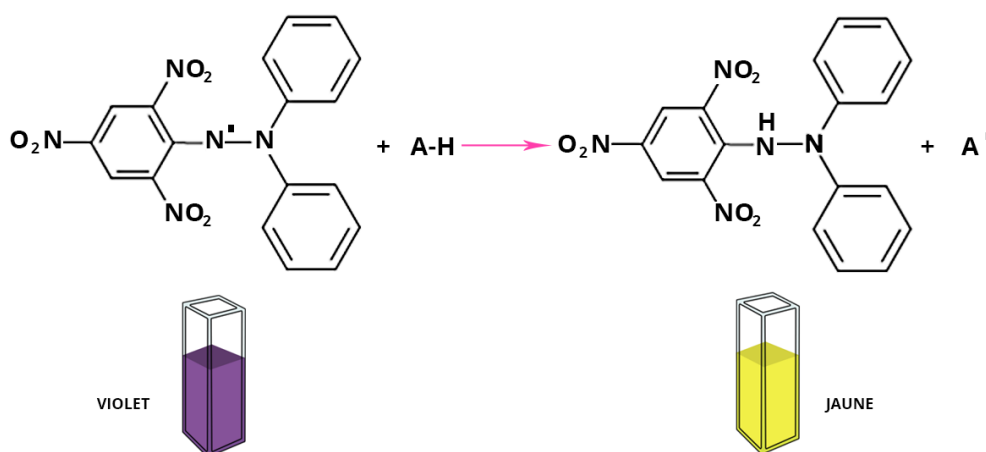


Schéma A.II.7 - Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Ce test est très utilisé, car il est rapide, facile et non coûteux. Cette réaction a pour but d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles qui s'effectue à température ambiante [27]. Son absorption se situe vers 517 nm dans le méthanol et à 196 nm dans l'éthanol [28].

Partie A. Bibliographie

Chapitre A.III.

Activité Antimicrobienne

Chapitre A.III

Activité Antimicrobienne

1. Introduction

Le monde est peuplé de choses minuscules, trop petites pour être vues par l'œil humain, nous les appelons des micro-organismes ou microbes-[29]. Les micro-organismes font partie des formes de vie les plus importantes sur Terre, en raison de leurs fonctions dans les écosystèmes [30], comme elles peuvent faire partie de nombreuses maladies infectieuses chez l'homme, les plantes ou les animaux [17, 31]. Parmi les micro-organismes, on retrouve les bactéries, les champignons, les archéobactéries, et les protistes ; des plantes microscopiques (appelées algues vertes) ; et des animaux tel que le plancton, la planaire et l'amibe.

2. Les bactéries

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires procaryotes, leur taille varie de 1 à 10 μm , et elles pèsent de l'ordre de 10-12 grammes. Les bactéries sont des petits sacs de molécules, séparés de l'environnement extérieur, présentes partout, elles ont le pouvoir de se copier à l'identique en puisant énergie et réactifs primaires dans le monde extérieur [32].

2.1 Morphologie

Les bactéries se composent de plusieurs éléments qui représentent souvent des critères de leurs classifications (**Figure A.III.1**). [33]

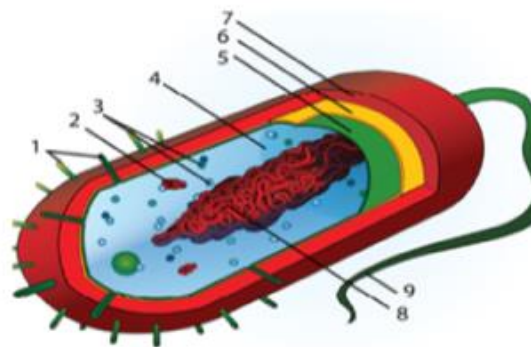


Figure A.III.1 - Morphologie de la bactérie.

1. **Pili** : structures semblables à des cheveux qui aident la bactérie à se fixer à des surfaces et à d'autres bactéries.
2. **Plasmides** : matériel génétique (molécules d'ADN).
3. **Ribosomes** : structures qui fabriquent des protéines.

4. **Cytoplasme** : matière vivante semblable à un gel dans laquelle les ribosomes et le matériel génétique sont contenus.
5. **Membrane plasmique** : fine couche de phospholipides et de protéines qui régule le mouvement des nutriments dans et hors de la cellule.
6. **Paroi cellulaire** : structure rigide qui entoure la cellule et protège la membrane plasmique.
7. **Capsule** : troisième couche qui aide à prévenir le dessèchement de la bactérie ou à empêcher qu'elle soit engloutie par des microorganismes plus gros (présente uniquement dans certains types de bactéries).
8. **Nucléoïde** : amas de matériel génétique (ADN).
9. **Flagelle** : prolongement cellulaire qui aide les bactéries à se déplacer et à percevoir leur environnement.

2.2. Classification des bactéries

Il existe différents types de classifications des bactéries. La classification de Linné permet de distinguer différents niveaux : le règne, l'embranchement, la famille, le genre et l'espèce. Et elles peuvent être classifiées selon d'autres critères, selon : la structure de la paroi, la forme, la mobilité, le métabolisme. [34]

2.2.1. La paroi cellulaire

La paroi cellulaire a plusieurs fonctions, ce qui fait que c'est une structure importante dans les cellules bactériennes. Son épaisseur aide à identifier et classer les différentes bactéries (selon la rétention de la coloration de Gram) en deux grandes classes (**Figure A.III.2**) [32] :

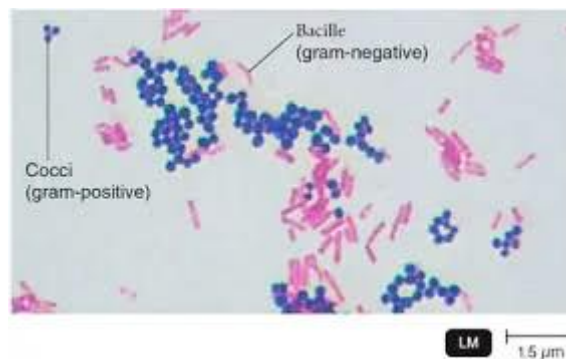


Figure A.III.2 - Observation sous microscope optique des bactéries à Gram positif et négatif après une coloration de Gram.

- Les bactéries appelées Gram négatif sont celles qui possèdent une épaisse couche de peptidoglycane entourant leur membrane plasmique. Elles se colorent en bleu ou violet [32].
- Les bactéries appelées Gram positif sont celles qui possèdent une fine couche de peptidoglycane entre la membrane externe et la membrane plasmique interne. Elles se colorent en roses ou rouges (**Figure A. III. 3**) [32].

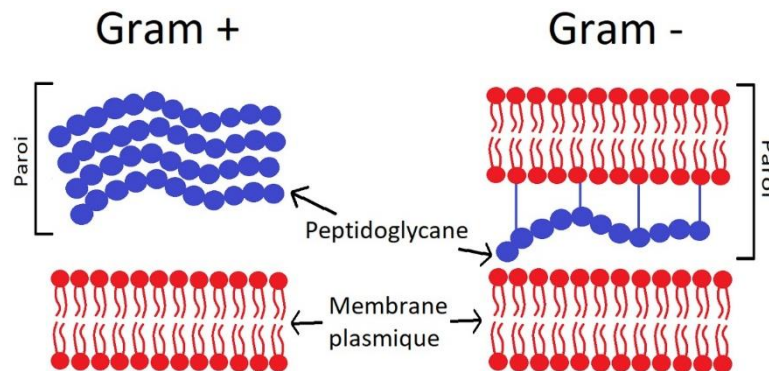


Figure A. III. 3 - Différences entre la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

2.2.2. La forme cellulaire

La forme et la taille diffèrent d'une bactérie à une autre. La taille peut varier entre 0,5 et 5 μm et jusqu'à même 750 μm pour certaines bactéries qui sont considérées comme géantes. La plupart des bactéries sont soit sphériques, en forme de bâtonnets ou en spirales qui peuvent être associées de manière différentes. Il existe d'autres formes de cellules (**Figure A. III. 4**).

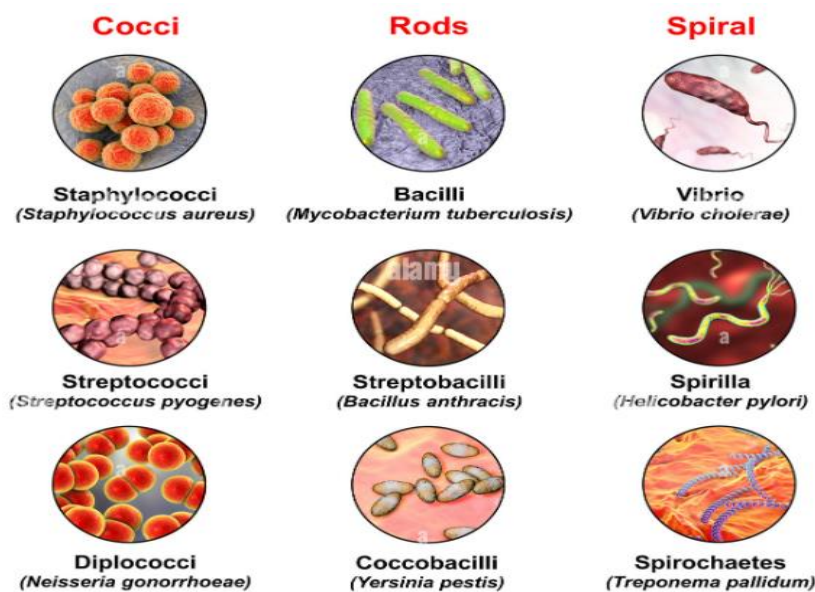


Figure A. III. 4 - Différentes formes et associations bactériennes.

2.2.3. La mobilité

La mobilité concerne les bactéries qui comportent des cils et/ou des flagelles.

2.2.4. Le métabolisme

Le métabolisme cellulaire est affecté par les facteurs environnementaux et nutritifs. Par exemple les bactéries aérobies ou anaérobies, en fonction de leur besoin en oxygène pour survivre. Lorsque l'environnement est favorable, en nutriments, température, pH, oxygène, etc. les cellules pourront alors survivre et se multiplier [34].

2.3. Bactéries utilisées dans le test antibactérien

2.3.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est un gram positif qui apparaît en *Cocci*, souvent connu par le nom de staphylocoque doré. On le trouve sous forme de diplocoques ou en amas dans la peau, muqueuses et fosses nasales et le pharynx [34].

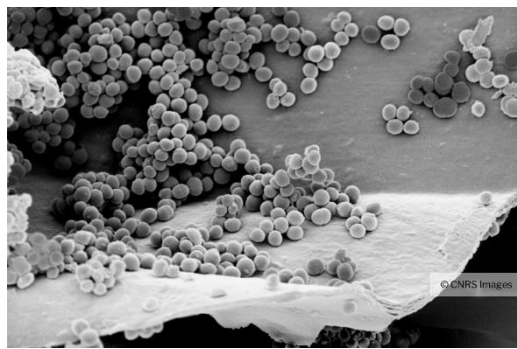


Figure A. III. 5 - *Staphylococcus aureus* (Vu sous microscope électronique à balayage).

2.3.2. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est un gram positif, sous forme de bâtonnet (de 1 μm de large pour 3 à 4 μm de long), sporulé et mobile grâce à une ciliature pérित्रиче. Il est aéro-anaérobie et thermorésistant, sa température de croissance varie de 5 à 50 °C. Elle est trouvée dans la terre, eaux et végétaux [17, 35].

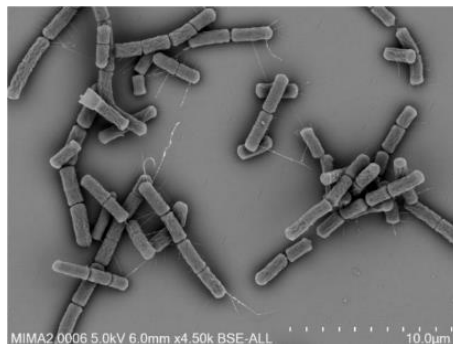


Figure A. III. 6 - *Bacillus cereus* (Vu au microscope électronique).

2.3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif aérobie non sporulé, mobiles grâce à un flagelle polaire. Il apparaît la plupart du temps isolés ou en diplobacilles dans les eaux usées, déversements, déversoirs, orage, pluie, égouts, baignades artificielles. [36]



Figure A. III. 7 - *Pseudomonas aeruginosa* (Vu au microscope).

2.3.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie à Gram négatif, aérobie ou anaérobie, en forme bâtonnet, asporulée et non mobile ou se déplace au moyen de flagelles péritriches. On la trouve dans le tube digestif de l'être humain et des organismes à sang chaud. La plupart des souches sont inoffensives [37].

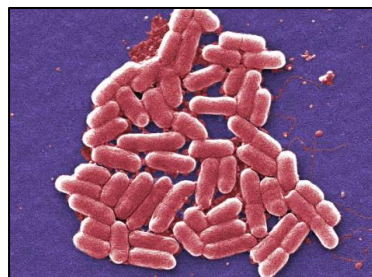


Figure A. III. 8 - *Escherichia coli* (Vu au microscope).

3. Champignons microscopiques

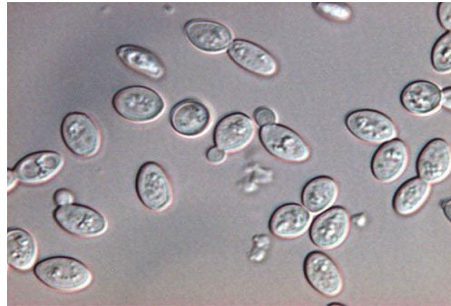
Les champignons microscopiques sont généralement classés en deux groupes : les mycètes et les levures et elles sont ubiquitaires dans la nature.

Les Mycètes : sont des champignons filamenteux ou "moisissures" du règne des *Fungi*. Mycètes ou *Mycota* sont capable d'absorber les éléments nutritifs sans être chlorophyllien [44]. Elles font partie des plus grands groupes des organismes vivants est une des plus vieux au même temps [38]. Ils sont essentiels au recyclage naturel de la matière organique dans les sols, mais provoquent aussi des infections fongiques par exemple, les aspergilloses (genre *Aspergillus*) [39].

Les levures : sont des micro-organismes eucaryotes unicellulaires qui appartiennent au domaine des champignons microscopiques. Elles composent notre "mycobiote", c'est-à-dire notre flore (ou plutôt, notre "fonge") digestive et cutanée [40]. Elles peuvent être utiles (*Saccharomyces cerevisiae* ou levure du boulanger), nuisibles (*Dekkera bruxellensis*, détériore le goût du vin) ou pathogènes (comme les candidoses, dues aux levures du genre *Candida*) [39].



Aspergillus niger (mycète)



Saccharomyces cerevisiae (levure)

Figure A. III. 9 – Champignons microscopiques (mycètes et levures).

3. 1. La levure choisie pour le test

3.1.1. *Candida albicans*

Cette espèce a été décrite en 1853 par Robin qui l'avait dénommée *Oidium albicans*. C'est un champignon levuriforme unicellulaire de forme circulaire ou ovale qui mesure environ 3 μm . On la trouve également dans l'appareil digestif, sur l'épiderme et dans l'appareil génital.

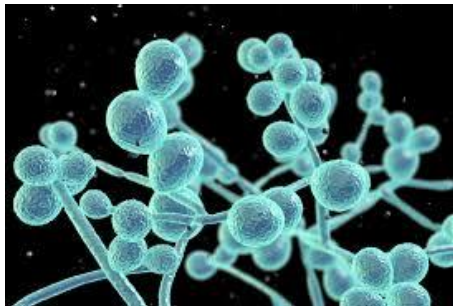


Figure A.III.10 - La levure *Candida albicans*.

4. Conclusion

Pour la mise en évidence du pouvoir antimicrobien, nous allons procéder à un antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu solide.

Partie B. Expérimentale

Généralités

Généralités

1. Matériels et appareils utilisés

Chromatographie sur couche mince (CCM) : La chromatographie sur couche mince est une technique d'analyse qualitative. Elle est couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse ou de purification. Cette technique a été réalisée sur des plaques de gel de silice (phase stationnaire) sur support aluminium F254 (0,25 mm) fabriquées par Merck, Allemagne. Après élution dans le solvant approprié (phase mobile), les plaques sont visualisées par une lampe UV puis révélées par une solution de permanganate de potassium (KMnO_4) à 5 % et par l'iode (I_2).

La distance parcourue par le composé est mesurée à partir du niveau de déposition jusqu'au centre de la tâche, tandis que la distance parcourue par l'éluant est mesurée à partir du niveau de déposition de l'échantillon jusqu'au front de l'éluant, marqué à la fin de l'élution. Le R_f est un nombre sans unités qui varie entre 0 et 1 calculé à l'aide de la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par l'éluant}}$$

Balance électronique : La balance électronique est un instrument de mesure parfait pour déterminer le poids des produits avec une précision de 10^{-4} g.

Plaque chauffante avec agitateur magnétique : Cette plaque sert de source de chaleur pour chauffer divers récipients et leur contenu. Elle permet également d'assurer une bonne homogénéisation de la solution à l'agitation magnétique.

Le banc Kofler : Le banc Kofler ou table chauffante de Kofler, est un appareil de mesure avec un gradient de température permettant d'estimer la température de fusion d'une matière.

Spectroscopie Infrarouge IR : La spectroscopie infrarouge est une technique d'analyse utilisée pour identifier les groupes fonctionnels des molécules organiques. Elle recouvre une large gamme de techniques, la plus commune étant un type de spectroscopie d'absorption. Elle a été réalisée au niveau du CRAPC de Mostaganem (BRUKER).

UV-visible : C'est une technique de spectroscopie mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (100 nm - 400 nm), du visible

(400 nm - 750 nm) ou du proche infrarouge (750 nm - 1 400 nm). Elle a été enregistrée sur un spectromètre Optizen View 4.2 pour l'activité antioxydante.

Papier pH : est un papier spécial qui est imbibé d'un indicateur universel. Lorsque l'on trempe un morceau de papier pH dans une solution, il prend la tonalité correspondant au pH du milieu.

Étuve : L'étuve, dite four, est utilisée pour sécher la verrerie nécessaire aux manipulations et réactions. Et aussi dite, incubateur utilisée pour favoriser la température nécessaire pour la croissance et la multiplication des différents microbes : 37 °C pour les bactéries et levure.

Bec bunsen : Le bec Bunsen est un appareil de laboratoire destiné à produire une flamme ouverte avec du gaz combustible afin de chauffer des préparations, stériliser du matériel ou brûler des substances.

Autoclave : Un autoclave est un récipient à parois épaisses et à fermeture hermétique conçu pour réaliser sous pression soit une réaction industrielle, soit la cuisson ou la stérilisation à la vapeur.

Densitomètre : Cet appareil utilisé dans les laboratoires de microbiologie pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes de sorte que le nombre de bactéries est à une concentration donnée pour standardiser l'analyse microbienne.

Vortex : C'est un appareil utilisé en biologie moléculaire et aussi dans les laboratoires de microbiologie pour bien mélanger les solutions en tube.

Boîte de Pétri : Une boîte de Pétri est une boîte cylindrique transparente peu profonde, en verre ou en plastique, munie d'un couvercle. Facilement manipulable, empilable et peu coûteuse, elle est utilisée en microbiologie pour la mise en culture de micro-organismes, de bactéries ou de cellules d'organismes supérieurs.

Micropipette : Une pipette à piston, aussi appelée pipette automatique, pipeteur automatique ou micropipette, est un système de pipetage de précision permettant de prélever et de transférer des volumes très faibles de liquide avec une grande précision.

Écouvillon : Un type de brosse à manche, à tête souvent cylindrique, servent au prélèvement et au transport des échantillons bactériologiques, sérologiques et cytologiques.

Gélose Mueller-Hinton : C'est une gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard recommandée pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries peu exigeantes.

2. Produits chimiques et solvants utilisés

Tableau B.1

Les produits chimiques et solvants utilisés.

Les Produits (pureté %)	Formules chimiques	mM (g/mol)	T _{éb} (°C)	T _f (°C)	d	Référence
Acide benzoïque (A1)	C ₇ H ₆ O ₂	122,12	250	122,3	1,27	SIGMA-ALDRICH
Acide 4-hydroxybenzoïque (B1)	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	250	213 - 215	1.46	SCHARLAU
Ethanol (99.8 %)	C ₂ H ₅ OH	46.07	78.37	-114	0,78	SIGMA-ALDRICH
Méthanol	CH ₃ OH	32.04	64.7	-97.6	0.79	SIGMA-ALDRICH
Acétone	(CH ₃) ₂ CO	58.08	56.05	-94.7	0.78	SIGMA-ALDRICH
Acétate d'éthyle	CH ₃ COOC ₂ H ₅	88.11	77	-83.06	0.89	SIGMA-ALDRICH
Cyclohexane (99.8)	C ₆ H ₁₂	84.16	80.75	6.47	0.78	SIGMA-ALDRICH
Permanganate de potassium	KMnO ₄	158,034	-	240	2.71	SIGMA-ALDRICH

Diode	I ₂	253,80	184,4	114	4,93	SCHARLAU
Acide Sulfurique	H ₂ SO ₄	98.07	337	3	1.84	SIGMA-ALDRICH
Bicarbonate de Sodium	NaHCO ₃	84	-	270	2.16	SIGMA-ALDRICH
Hydroxyde de Potassium	KOH	56.11	1327	406	2,12	SIGMA-ALDRICH
Acide Chlorhydrique	HCl	36.46	48	-30	1.18	SIGMA-ALDRICH
Sulfate de magnésium	MgSO ₄	120,366	-	1124	0,01	SIGMA-ALDRICH
Diméthyle Sulfoxyde (DMSO)	(CH ₃) ₂ SO	78.13	189	19	18.4	SIGMA-ALDRICH
Dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂	84.93	40	-95.1	1,33	SIGMA-ALDRICH
Hydrazine Hydraté (80 %)	H ₂ N.NH ₂ , H ₂ O	50.06	119	-51,7	1.03	PROLABO
Disulfure de Carbone (99,9 %)	CS ₂	76,14	46	-111	1.26	SIGMA-ALDRICH
2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	394,32	714.01	312,57	1,4	SIGMA-ALDRICH

Partie B. Expérimentale

Chapitre B.I.

Synthèse Organique

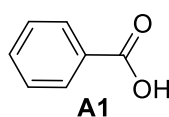
Chapitre B.I

Synthèse Organique

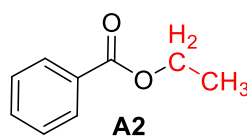
1. Introduction

Ce chapitre se consacrera à la synthèse des 1,3,4-oxadiazoles-5-thionyl dérivés de deux acides carboxyliques à citer, l'acide benzoïque et l'acide 4-hydroxybenzoïque, passant par plusieurs étapes ou intermédiaires.

2. Synthèse du 1,3,4-oxadiazoles-5-thionyl dérivé de l'acide benzoïque



2.1. Synthèse de l'éthyle benzoate (A2)

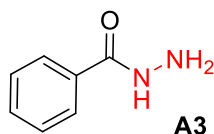


L'acide benzoïque (**A1**) 4 g est dissout dans 30 mL d'éthanol absolu. Ajouter 2 mL d'acide sulfurique goutte à goutte puis porter à reflux pendant 24 heures. Après refroidissement à température ambiante, neutralise avec une solution de NaHCO₃ à 10%. Extraire l'ester avec le dichlorométhane (3 × 25 mL). Sécher la phase organique sur du MgSO₄ anhydre et filtrer. Le composé (**A2**) est ensuite obtenu après évaporation du solvant.

Caractéristiques du produit

- Liquide transparent ;
- Rendement = 76 % (3.73 g) ;
- R_f = 0.92 (cyclohexane/acétate d'éthyle, 1 : 0.5) ;
- IR (film) ν_{\max} cm⁻¹ = 2981 (-CH phényle, -CH₂ ester, -CH₃ ester), 1716 (C=O ester), 1510 (C=C, phényle), 1274, 1108 (CO-O-C ester), 714 (-CH₂ ester, -CH phényle).

2.2. Synthèse du benzohydrazide (A3)

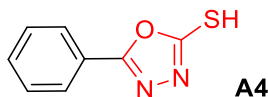


1 g d'hydrazine hydratée (80 %) est ajouté goutte à goutte avec agitation sur 1 g de l'ester **A2** préalablement dissout dans 10 mL d'éthanol, et chauffé à reflux pendant 5 heures. On laisse refroidir et on rince le solide formé à l'eau glacée et on filtre. Le composé **A3** est ensuite obtenu après séchage à l'air libre [6, 41].

Caractéristiques du produit

- Poudre blanche ;
- Rendement = 95 % (0.867 g) ;
- $T_f = 115\text{ °C}$;
- $R_f = 0.20$ (cyclohexane/acétate d'éthyle, 1 : 0.5) ;
- IR (film) $\nu_{\max}\text{ cm}^{-1} = 3012$ (-NH, -NH₂), 1612 (C=O), 1557 (C=C, phényle), 670 (-CH phényle).

2.3. Synthèse du 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione (A4)



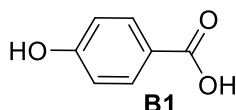
Une solution d'hydroxyde de potassium formée de KOH (0.5 g, 0.00956 mol) et d'éthanol (15 mL) est graduellement additionnée à l'hydrazide **A3** (0.5 g, 0.00367 mol) préalablement dissout dans 15 mL d'éthanol. Ensuite, 2 mL du disulfure du carbone (CS₂) est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est chauffé à 85 °C pendant 24 heures. Après refroidissement à température ambiante, une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 1N est ajoutée jusqu'à obtenir un pH proche à 5. Extraction avec l'acétate d'éthyle (3 × 25) et la phase organique, est séchée sur du MgSO₄ anhydre. Le composé **A4** est ensuite obtenu après évaporation du solvant. [42]

Caractéristiques du produit

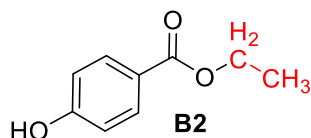
- Cristaux orangés ;
- Rendement = 96 % (0.639 g) ;
- $T_f = 215\text{ °C}$;
- $R_f = 0.769$ (cyclohexane/acétate d'éthyle, 1 : 0.5) ;

- IR (film) ν_{\max} cm^{-1} = 1507, (-NH), 2921 (-CH phényle), 2700 (-SH), 1609 (C=N, C=C phényle), 1446 (C=S), 1275 (C-O-C), 693 (-CH phényle).

3. Synthèse du 1,3,4-oxadiazoles-5-t,hionyl dérivé de l'acide 4-hydroxybenzoïque



3.1. Synthèse de l'éthyle 4- hydroxybenzoate (B2)

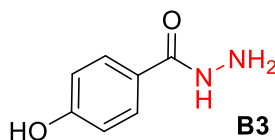


L'acide 4-hydroxybenzoïque (**B1**) 2 g est dissout dans 15 mL d'éthanol absolu, puis ajouter 1 mL d'acide sulfurique et porter à reflux pendant 24 heures. Après refroidissement, on neutralise avec une solution de NaHCO_3 à 10 %. On extrait l'ester à l'acétate d'éthyle (2×20 mL). Sécher la phase organique sur du MgSO_4 anhydre et filtrer. Le composé **B2** est ensuite obtenu après évaporation du solvant.

Caractéristiques du produit

- Poudre blanche ;
- Rendement = 95 % (2.28 g) ;
- $T_f = 118 - 120$ °C ;
- $R_f = 0.8$ (cyclohexane/acétate d'éthyle, 1:1) ;
- IR (film) ν_{\max} cm^{-1} = 3191 (-OH), 2977 (-CH phényle, -CH₂ ester, -CH₃ ester), 1669 (C=O ester), 1605 (C=C, phényle), 1285, 1167 (CO-O-C ester), 847 (-CH phényle);

3.2. Synthèse du 4-hydroxybenzohydrazide (B3)



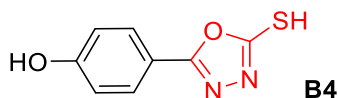
1 g d'hydrazine hydratée (80 %) est ajouté goutte à goutte avec agitation sur 1 g de l'ester **B2** dans 10 mL d'éthanol, et chauffer à reflux pendant 2 heures. On laisse refroidir et on rince

le solide formé à l'eau glacée et filtrer. Le composé **B3** est ensuite obtenu après évaporation du solvant [6, 41].

Caractéristiques du produit

- Poudre blanche ;
- Rendement = 60 % (0.55 g) ;
- $T_f = 265\text{ °C}$;
- $R_f = 0.28$ (cyclohexane/acétate d'éthyle, 1:1) ;
- IR (film) $\nu_{\max}\text{ cm}^{-1} = 3313$ (-OH), 3270 (-NH, -NH₂), 1740 (C=O), 1605 (C=C, phényle), 614 (-CH phényle).

3.3. Synthèse du 5-(4-hydroxyphényl) -1,3,4-oxadiazole-2(3H) -thione (**B4**)



Une solution d'hydroxyde de potassium formée de KOH (0.3 g, 0.00574mol) et d'éthanol absolu (10 mL) est graduellement additionnée à l'hydrazide **B3** (0.2 g, 0.00131mol) préalablement dissout dans 10 mL d'éthanol sous agitation, ensuite 1.5 mL du disulfure du carbone (CS₂) est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est chauffé à 80 °C pendant 15 heures. Après refroidissement à température ambiante, une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 1N est ajoutée jusqu'à obtenir un pH égal à 5. Extraction avec l'acétate d'éthyle (3 × 20) et la phase organique, est séchée sur du MgSO₄ anhydre. Le composé **B4** est obtenu après évaporation du solvant. [42]

Caractéristiques du produit

- Cristaux orangés ;
- Rendement = 85 % (0.45 g) ;
- $T_f = 216\text{ °C}$;
- $R_f = 0.69$ (cyclohexane/acétate d'éthyle, 1:1) ;
- IR (film) $\nu_{\max}\text{ cm}^{-1} = 3200 - 3500$ (-OH), 3256 (-NH), 2948 (-CH phényle), 2700 (-SH), 1608 (C=N, C=C phényle), 1437 (C=S), 1067 (C-O-C), 836 (-CH phényle).

Partie B. Expérimentale

Chapitre B. II.

Activité Antioxydante

Chapitre B.II

Activité Antioxydante

1. Introduction

La détermination de l'activité antioxydante et l'une des méthodes pour évaluer la qualité biologique d'un composé, pour déterminer le pouvoir des substances synthétisées, il existe plusieurs méthodes. La méthode la plus utilisée généralement pour déterminer la capacité antioxydante est la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl) [43], pour sa simple réalisation et la rapidité de ses résultats comme il est employé pour le ciblage des molécules dotées d'activité antioxydante [44] (**Figure B.II.1**).

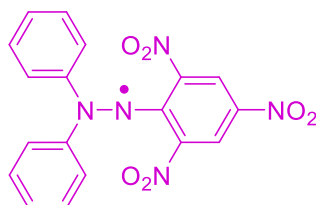


Figure B.II.1 - Structure chimique du radical libre DPPH.

2. Principe

Le DPPH• est un radical libre stable de couleur violet en solution [44], ayant une absorption maximale vers 517 nm [45], il accepte l'hydrogène qui est cédé par l'antioxydant pour former le DPPH (**Schéma B.II.1**).

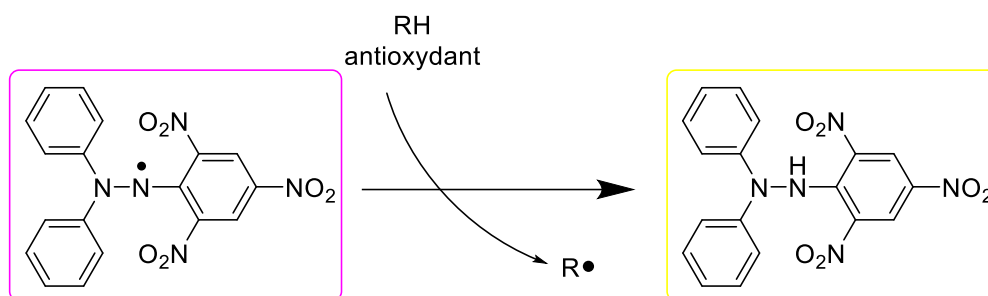


Schéma B.II.1 - Réaction du composé antioxydant et le radical DPPH• formant le DPPH-H.

L'effet de l'antioxydant provoque la disparition du radical DPPH• par la formation de 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH-H) et la décoloration de la solution du violet au jaune [46] (**Figure B.II.2**).

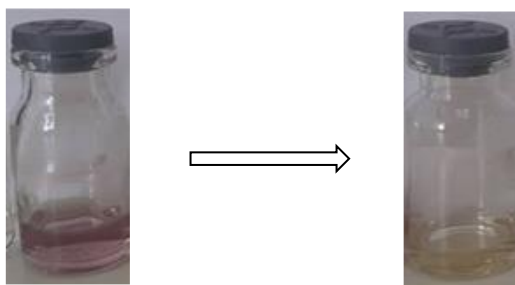


Figure B.II.2 - Décoloration de la solution DPPH du violet au jaune

3. Evaluation de l'effet antioxydant

Le pouvoir antioxydant des composés préparés (**A2**, **A3**, **A4**, **B2**, **B3**, **B4**) ainsi que les produits de départ l'acide benzoïque (**A1**) et l'acide 4-hydroxybenzoïque (**B1**) et la référence acide ascorbique a été fait par la méthode du DPPH (2,2 -diphényl 1 -picrylhydrazyl), ensuite on compare les résultats à celui de l'acide ascorbique [47]. Cette méthode consiste à :

- Préparer une solution de DPPH à 0.004% et la laisser au réfrigérateur pendant 12 heures.
- Préparer des solutions mères de l'acide ascorbique et toutes les molécules à tester à une concentration de 1000 ppm dans du DMSO.
- Prélever 1 mL de chaque solution mère et mettre dans un tube scellé.
- Ajouter un volume de 0.5 mL de la solution DPPH préparée précédemment.
- Pour le control, ajouter 1 mL de solution DPPH à 0.5 mL de DMSO.
- Incuber à une température ambiante (24 °C) pendant 30 min à l'abri de la lumière.
- Après incubation, mesurer l'absorbance à 517 nm en utilisant l'UV-Visible.
- Le calcul du pourcentage d'inhibition (**PI**) se fait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{PI (\%)} = [(A_0 - A_E) / A_0] \times 100$$

A_0 représente l'absorbance du contrôle ;

A_E l'absorbance de l'échantillon.

4. Mesure de la valeur IC_{50}

La valeur de la IC_{50} représente la concentration de la substance qui inhibe à 50 % [48]. Donc les produits ayant un PI supérieur à 50 % doivent subir une dilution (500, 250, 125, 62,5, 31,5 ppm) et répéter la même expérience précédente. Les IC_{50} sont déterminées par extrapolation graphique sur la courbe tracée par l'absorbance à 517 nm en fonction de la concentration [47].

Partie B. Expérimentale

Chapitre B.III.

Activité Antimicrobienne

Chapitre B.III

Activité Antimicrobienne

1. Introduction

L'objectif de l'étude du pouvoir antimicrobien est de mettre en évidence la sensibilité ou la résistance des composés synthétisés sur des microbes pathogènes et comparer leur efficacité avec une référence.

2. Les micro-organismes utilisés

Les micro-organismes ou les souches indicatrices utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne, sont des souches bactériennes pathogènes et/ou d'altérations à Gram positif et à Gram négatif et une levure pathogène (**Tableau B.III.1**).

L'antibiotique utilisé comme référence est l'**Amikacine (AK)** à 30 µg/disque.

Tableau B.III.1

Les souches microbiennes pathogènes utilisées.

	Noms	Source
Bactéries à Gram Positif	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 33862)	Institut Pasteur d'Oran
	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 10876)	
Bactéries à Gram Négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	
Levure	<i>Candida albicans</i> (ATTC 10231)	

3. Mise en évidence de l'effet antimicrobien

3.1. Principe

La méthode utilisée est celle de diffusion en milieu solide. Son principe est de procéder à un antibiogramme qui consiste à disposer dans une boîte de pétri contenant une gélose Mueller

Hinton (M.H) ensemencée par une souche en surface, des disques de papier imprégnés des produits synthétisés à tester à une concentration déterminée.

Après incubation, il est possible de voir la croissance microbienne ainsi que des zones d'inhibition claires de la croissance, au tour de chaque disque. Plus la zone d'inhibition est grande, plus grande est la sensibilité de la souche vis-à-vis du produit testé.

3.2. Mode opératoire

Pour effectuer cet examen, les étapes suivantes ont été suivies (**Schéma B.III.1**) :

- Les produits testés (**A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3** et **B4**) sont dissous dans du DMSO pour préparer les solutions mère à une concentration de 10000 ppm.
- Les disques en papier, d'un diamètre de 5mm, déjà stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min, sont imprégnés par 10 µL de chaque solution préparée.
- Ensemencer à l'aide d'un écouvillon à partir d'une solution d'eau physiologique contenant une suspension bactérienne à 0.5 McFarland, à partir d'une souche microbienne jeune de 18-24 h, sur une boîte de pétri contenant une gélose M.H.
- Placer à l'aide d'une pince les disques imprégnés des produits à tester sur la gélose M.H. déjà ensemencée par les souches indicatrices.
- Incuber à 37 °C pendant 18-24 h. [4, 17]

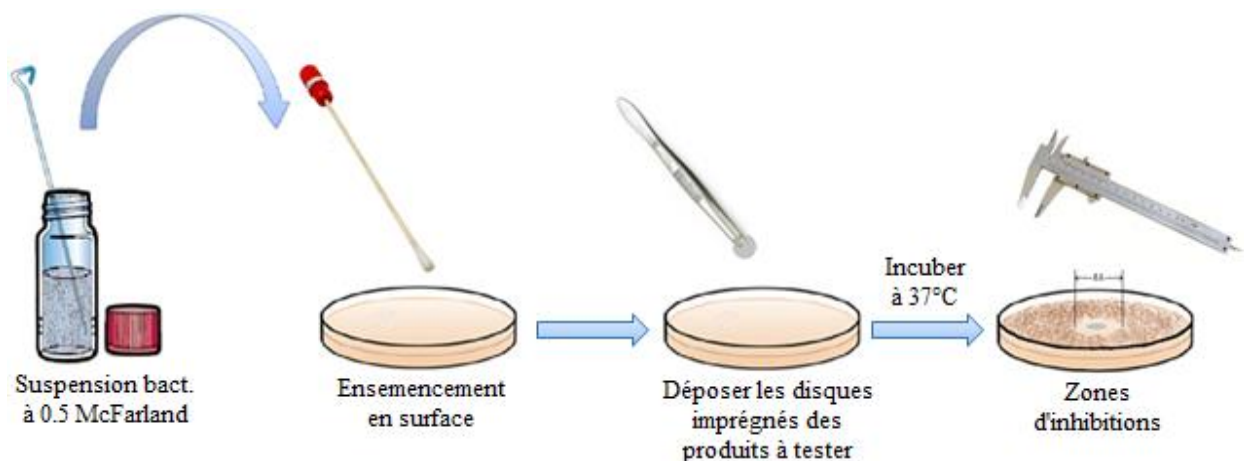


Schéma B.III.1 - Mise en évidence de l'effet antimicrobien.

- La lecture des résultats se fait par la mesure des dimensions des zones d'inhibitions (zones claires) qui entourent les disques contenant les molécules à tester et représentée en millimètre (mm) à l'aide d'un pied à coulisse (**Figure B.III.1**).

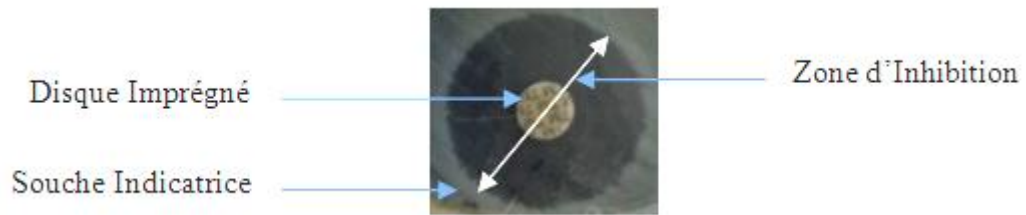


Figure B.III.1 - Représentation schématique des zones d'inhibitions.

- Les zones d'inhibition sont définies comme suit :
 - + Le produit est actif pour un diamètre supérieur à 15 mm.
 - + Le produit est modérément actif pour un diamètre entre 8 et 15 mm.
 - + Le produit est inactif pour un diamètre inférieur à 8mm.

Partie C. Expérimentale

Chapitre C.I.

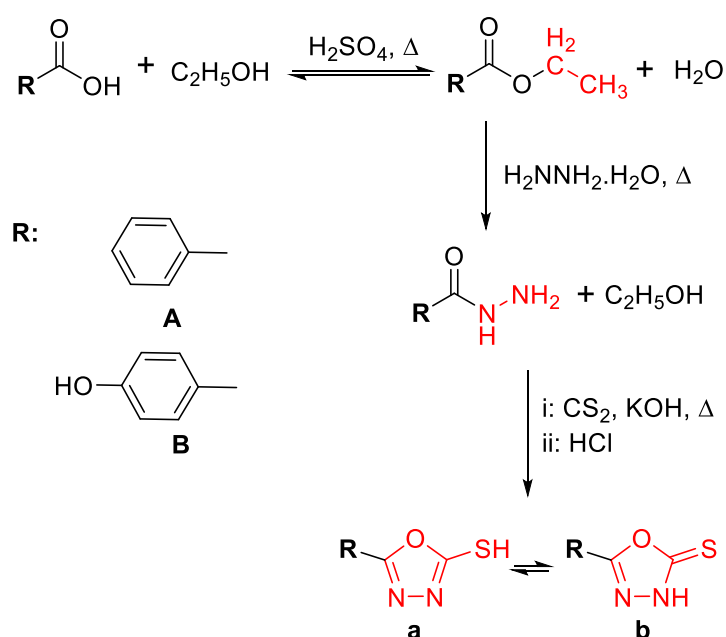
Synthèse Organique

Chapitre C. I

Synthèse Organique

1. Introduction

L'objectif de ce travail, est basé sur la synthèse des 1,3,4-oxadiazoles dérivé d'acide benzoïque et acide 4-hydroxybenzoïque (**Schéma C.I.1**) Pour optimiser les rendements des produits, plusieurs facteurs sont mis en en jeu tels que : la température, le changement du solvant, le temps du reflux, les proportions des réactifs. Les produits synthétisés ont été caractérisés par le point de fusion, IR, et l'avancement des réactions par CCM.



2. Synthèse du 1,3,4-oxadiazoles-5-thionyl dérivé de l'acide benzoïque

2.1. Synthèse de l'éthyle benzoate (A2)

L'estérification de l'acide benzoïque (**A1**) avec l'éthanol en milieu acide pendant 24 h de chauffage à 80 °C, a permis d'obtenir l'ester (**A2**) avec un rendement de 76 %. Le produit obtenu est sous forme de liquide transparent, soluble dans l'acétate d'éthyle, éthanol, acétone et le cyclohexane. Son rapport frontal R_f est égal à 0.92 (hexane/acétate d'éthyle, 1:0.5) (**Schéma C.I.2**).

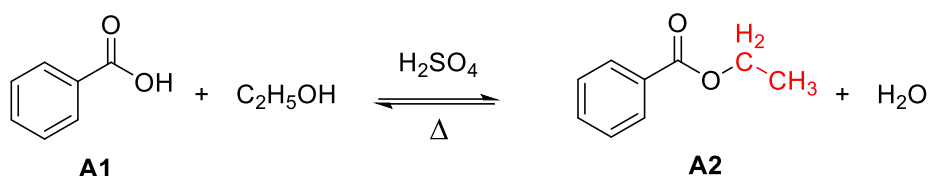


Schéma C.1.2 - Réaction de synthèse de l'éthyle benzoate (A2).

Le spectre infrarouge de l'éthyle benzoate (A2) indique l'intensité d'une bande aigue concentrée à 1716 cm^{-1} qui caractérise le groupement carbonyle C=O de l'ester, ainsi que l'intensité du pic C-O-C à 1108 cm^{-1} (Annexe 2).

2.2. Synthèse du benzohydrazone (A3)

L'hydrazone (A3) a été obtenu avec un rendement élevé de 95 % en faisant réagir l'ester A2 avec de l'hydrazine hydratée à 80 °C pendant 5 heures. La filtration nous a permis d'obtenir une poudre blanche ($T_f = 115\text{ °C}$) avec un rapport frontal $R_f = 0.20$ (cyclohexane/acétate d'éthyle, 1:0.5). Il est soluble dans l'acétate d'éthyle, éthanol, acétone et le cyclohexane (Schéma C.1.3).

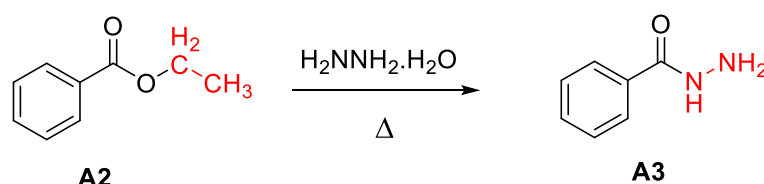


Schéma C.1.3 - Réaction de synthèse du benzohydrazone (A3).

Le spectre infrarouge (Annexe 3) indique une bande large à 3012 cm^{-1} pour -NH (1612 cm^{-1}) et -NH₂ (1557 cm^{-1}) et le groupement carbonyle C=O apparaît à 1612 cm^{-1} .

2.3. Synthèse du 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione (A4)

L'hydrazone A3 a été réagi avec le CS₂ en milieu basique sous reflux pour obtenir l'hétérocycle A4. Après traitement, le produit est obtenu avec un rendement de 96 % et sous forme de cristaux orangés ($T_f = 215\text{ °C}$) avec un $R_f = 0.769$ (cyclohexane/acétate d'éthyle, 1:0.5) (Schéma C.1.4).

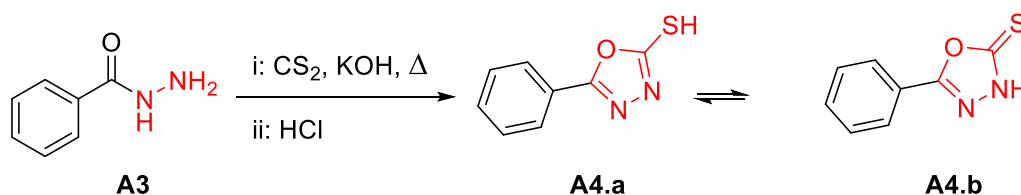


Schéma C.1.4 - Réaction de synthèse du 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione (A4).

Le spectre infrarouge présente une bande large 2921 cm^{-1} pour le -CH du phényle. La vibration d'élongation de la liaison C=N et C=C du phényle est assignée avec la bande située en 1609 cm^{-1} et démontre aussi une bande en 1275 cm^{-1} qui caractérise la liaison C-O-C de l'hétérocycle.

Le composé **B4** est un dérivé de 1,3,4-oxadiazole, son groupement mercapto est capable d'établir une tautomérie entre une forme thiol (**A4.a**) et thione (**A4.b**). Ces dernières sont confirmées par l'apparition des bandes qui correspondent aux groupements -SH dans la région 2700 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} pour le -NH et 1446 cm^{-1} pour le C=S (**Annexe 4**).

3. Synthèse du 1,3,4-oxadiazoles-5-t,hionyl dérivé de l'acide 4-hydroxybenzoïque

3.1. Synthèse de l'éthyle 4- hydroxybenzoate (**B2**)

L'estérification de l'acide 4-hydroxybenzoïque (**B1**) avec l'éthanol en milieu acide pendant 24 h à reflux, a permis d'obtenir l'ester **B2** avec un rendement élevé 95 %. Le produit obtenu est sous forme de poudre blanche ($T_f = 118 - 120\text{ °C}$). Son rapport frontal R_f est égal à 0.8 (cyclohexane/acétate d'éthyle, 1:1) (**Schéma C.1.5**).

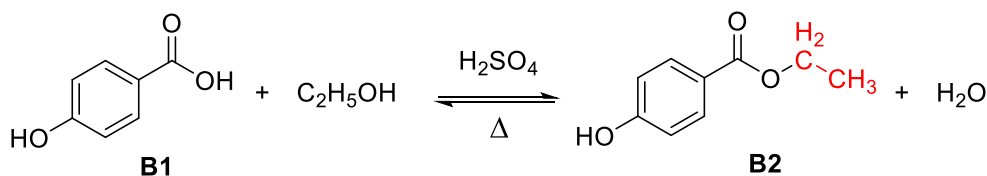


Schéma C.1.5 - Réaction de synthèse de l'éthyle 4- hydroxybenzoate (**B2**).

Le spectre infrarouge (**Annexe 6**) de l'éthyle 4-hydroxybenzoate (**B2**) indique la diminution de la bande dans le domaine $3200-3700\text{ cm}^{-1}$ caractérisant l'élongation du -OH du groupement carboxylique, l'intensité de la bande aigue est concentrée à 1669 cm^{-1} caractérise le groupement carbonyle C=O de l'ester, ainsi que l'intensité du pic C-O-C à 1131 cm^{-1} .

3.2. Synthèse du 4-hydroxybenzohydrazide (**B3**)

L'hydrazide (**B3**) a été obtenu avec un rendement moyen de 60 % en faisant réagir l'ester (**B2**) avec l'hydrazine hydratée à 85 °C pendant 5 heures. La filtration nous a permis d'obtenir une poudre blanche partiellement soluble dans les alcools ($T_f = 265\text{ °C}$) avec un rapport frontal $R_f = 0.28$ (cyclohexane/acétate d'éthyle, 1 :1) (**Schéma C.1.6**).

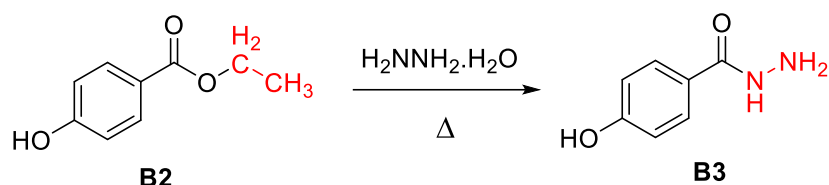


Schéma C.1.6 - Réaction de synthèse du 4-hydroxybenzohydrazide (B3).

Le spectre infrarouge indique une bande large à 3313 cm^{-1} attribuée au groupement $-\text{OH}$ et une autre en 3270 cm^{-1} pour $-\text{NH}$ (1588 cm^{-1}) et $-\text{NH}_2$ (1605 cm^{-1}) (. Le groupement carbonyle $\text{C}=\text{O}$ apparaît à 1740 cm^{-1} (**Annexe 7**).

3.3. Synthèse du 5-(4-hydroxyphenyl)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione (B4)

L'hydrazide **B3** a été réagi avec le CS_2 en milieu basique sous reflux pour obtenir l'hétérocycle **B4**. Après traitement, le produit obtenu avec un rendement de 85 % est sous forme de cristaux orangés ($T_f = 216\text{ }^\circ\text{C}$) avec un $R_f = 0.69$ (cyclohexane/acétate d'éthyle, 1:1) (**Schéma C.1.7**).

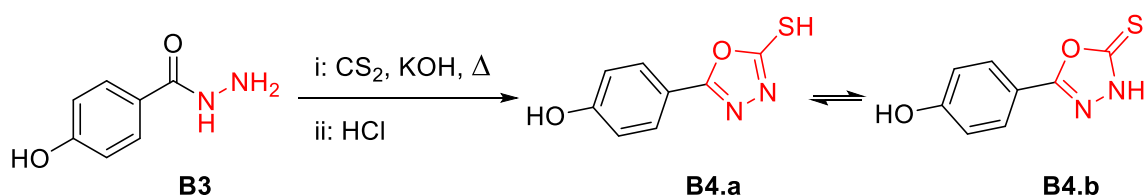


Schéma C.1.7 - Réaction de synthèse du 5-(4-hydroxyphenyl)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione (B4).

Le spectre infrarouge (**Annexe 8**) présente une bande large dans le domaine $3200 - 3500\text{ cm}^{-1}$ pour l'hydroxyle et une autre en 3256 cm^{-1} pour le groupement $-\text{NH}$, la vibration d'élongation de la liaison $\text{C}=\text{N}$ et $\text{C}=\text{C}$ du phényle est assignée avec la bande située en 1608 cm^{-1} et démontre aussi une bande en 1067 cm^{-1} qui caractérise la liaison $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ de l'hétérocycle.

Le composé **B4** est un dérivé de 1,3,4-oxadiazole, son groupement mercapto est capable d'établir une tautomérie entre une forme thiol (**B4.a**) et thione (**B4.b**). Ces dernières sont confirmées par l'apparition des bandes qui correspondent aux groupements $-\text{SH}$ dans la région 2700 cm^{-1} , 1513 cm^{-1} pour le $-\text{NH}$ et 1477 cm^{-1} pour le $\text{C}=\text{S}$ (**Annexe 4**).

4. Conclusion

La méthode de cyclisation des hydrazides par le disulfure de carbone a permis d'obtenir des 1,3,4-oxadiazole-5-thionyls avec des rendements importants.

Partie C. Expérimentale

Chapitre C. II.

Activité Antioxydante

Chapitre C. II

Activité Antioxydante

1. Introduction

L'objectif de cette étude est de tester la capacité antioxydante des composés synthétisés, en la comparant avec celle de l'acide ascorbique utilisé comme référence par la méthode du radical DPPH.

2. Evaluation de l'activité antioxydante

Après l'incubation à l'obscurité pendant 30 minutes, les molécules ont été testées à une concentration de 1000 ppm, en utilisant l'UV-Visible à 517 nm pour définir le pourcentage d'inhibition (**PI**) de chacune. Chaque valeur représente la moyenne de deux répétitions (**Tableau C.II.1**).

Tableau C.II.1

Activité antioxydante (%) et IC₅₀ des composés testés par rapport à l'acide ascorbique à une concentration de 1000 ppm.

<i>Produits Testés</i>	<i>A₅₁₇</i>	<i>Inh. à 1000 ppm (%)</i>	<i>IC₅₀ (µg/mL)</i>
A1	0,489	28,61	ID
A2	0,606	11,53	ID
A3	0,109	84,08	85.38
A4	0,061	91,09	20,76
B1	0,437	36,20	ID
B2	0,501	26,86	ID
B3	0,082	88,02	70
B4	0,042	93,86	15
Acide Ascorbique	0.030	96.07	2.94

ID : Indéterminé.

Les dérivés obtenus des acides carboxyliques l'acide benzoïque (**A1**) et l'acide 4-hydroxybenzoïque (**B1**), ont montré que seulement les hydrazides (**A3**, **B3**) et les 1,3,4-oxadiazoles (**A4**, **B4**) ont une activité antioxydante avec un pourcentage élevé, entre 84,08 et 88,02 % pour les hydrazides et entre 91,09 et 93,86 % pour les hétérocycles.

L'acides benzoïque (**A1**) et l'acide 4-hydroxybenzoïque (**B1**), ainsi que l'éthyle 4-hydroxybenzoate (**B2**) ont une activité antioxydante moyenne avec 28,61 %, 36,20 % et 26,86 respectivement.

L'éthyle benzoate (**A2**) était le moins actif, car le groupement carboxylique été occupés par la fonction ester pour 11,53 % et n'ayant aucun autre groupement fonctionnel donneur d'hydrogène.

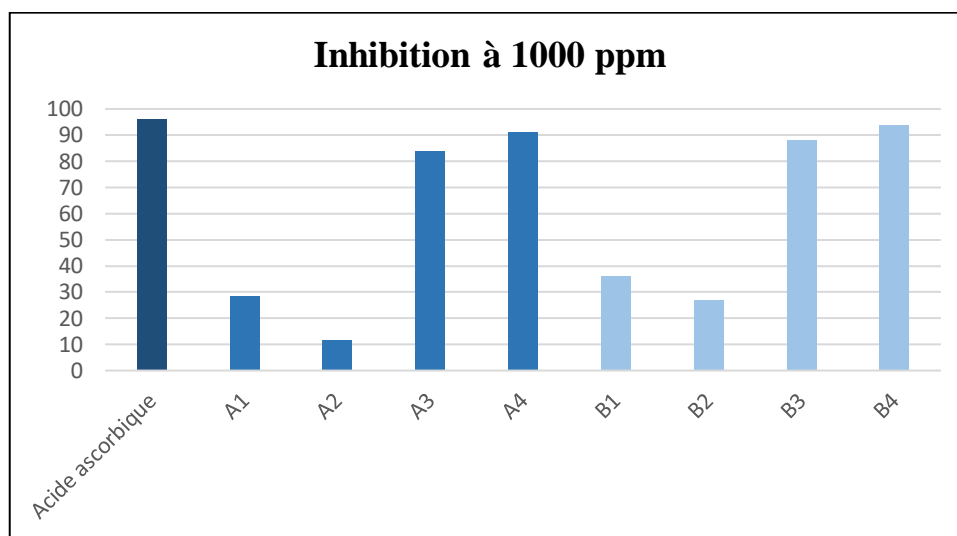


Figure C.II.1 - Pouvoir antioxydant des composés testés par rapport à l'acide ascorbique à une concentration de 1000 ppm.

Nous avons aussi observé que l'acide 4-hydroxybenzoïque (**B1**) ainsi que tous ses dérivés synthétisés (**B2**, **B3**, **B4**) ont des pourcentages d'anti-oxydation supérieurs à ceux de l'acide benzoïque (**A1**) et ses dérivés (**A2**, **A3**, **A4**) grâce au groupement hydroxyle présent dans leurs structures chimiques. Cela confirme ce que Shahidi *et al.*, (1992) ont rapporté [49].

3. Mesure de la valeur IC₅₀

La mesure de l'absorbance des molécules qui ont un pourcentage supérieur à 50 % avec un graduant de concentrations décroissant (500, 250, 125, 62,5, 31,5 ppm) à aider à définir leur IC₅₀ en extrapolant les pourcentages d'inhibition, calculés précédemment.

Les concentrations sont présentées dans la (**Figure C.II.1**).

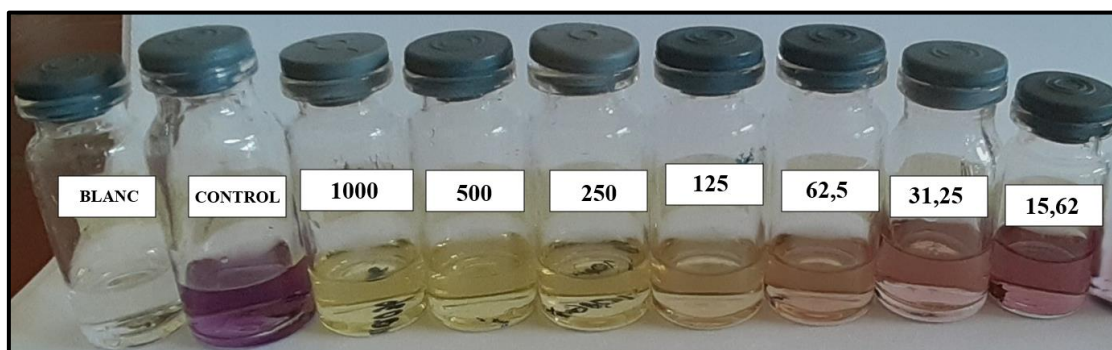


Figure C.II.2 - Décoloration des produits testés par la réduction des radicaux DPPH en fonction des différentes concentrations (en ppm).

Les valeurs de la IC_{50} des composés hétérocycliques dérivés d'acide benzoïque et l'acide 4-hydroxybenzoïque (**A4**, **B4**) ont enregistré les valeurs les plus basses, 20,76 et 15 $\mu\text{g/mL}$ respectivement, mais toujours supérieures à celle d'acide ascorbique, 2,94 $\mu\text{g/mL}$.

Les valeurs des hydrazides (**A3**, **B3**) étaient variables par ordre croissant, en allant du plus actif au moins actif le **A3** (85,38 $\mu\text{g/mL}$) puis le **B3** (70 $\mu\text{g/mL}$).

Les résultats d'Activité antioxydante des produits testés à des différentes concentrations et les valeurs de la IC_{50} sont présentés dans la **figure C.II.2**.

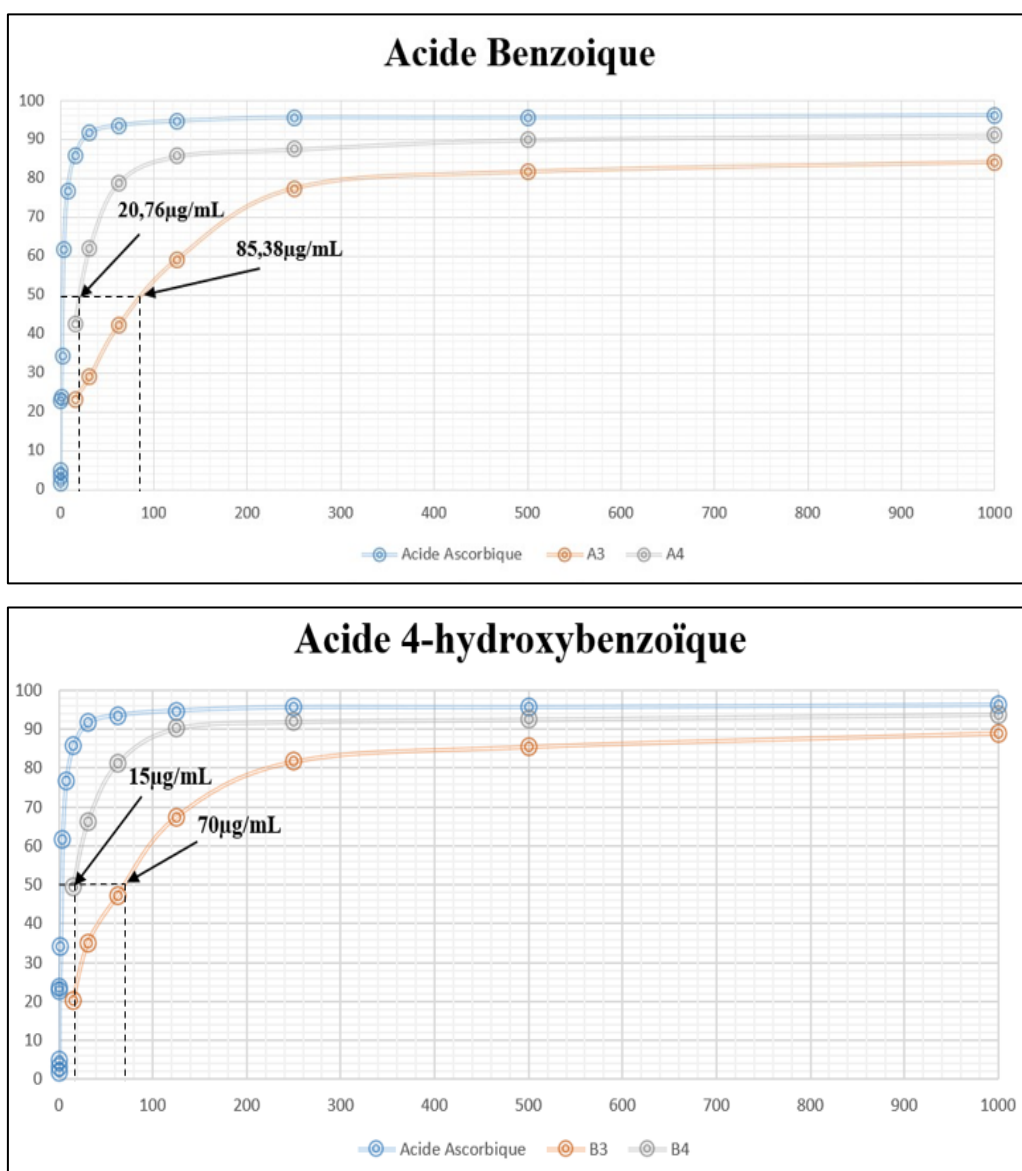


Figure C.II.3 - Détermination des IC_{50} des produits testés par extrapolation sur l'axe des concentrations ($\mu\text{g/mL}$).

Malgré les valeurs basses de (**A4**) et (**B4**) 20,96 et 15,53 $\mu\text{g/mL}$ respectivement, ils et les autres échantillons testés précédemment restent très élevées par rapport à celle de la référence (2.94 $\mu\text{g/mL}$). Ceci nous amène à déduire que (**A4** et **B4**) sont les moins actifs.

4. Conclusion

Ces résultats montrent que tous les deux hétérocycles synthétisés et leurs hydrazides comportant des groupements thiols (-SH) et amines (-NH) ainsi que les molécules possédant un hydroxyle dans leurs structures possèdent le pouvoir de libérer des hydrogènes, et donc ils ont le pouvoir d'inhiber l'oxydation des cellules vivantes par les radicaux libres qui causent la dégradation et le vieillissement prématurés des cellules d'un organisme vivant [42].

Partie C. Expérimentale

Chapitre C.III.

Activité Antimicrobienne

Chapitre C.III

Activité Antimicrobienne

1. Introduction

Le pouvoir antimicrobien était nécessaire pour vérifier la bioactivité des molécules synthétisées qui a réalisé sur une série de quatre souches bactériennes et une levure pathogène, en utilisant la méthode de la diffusion sur gélose. Le test a donné les résultats présentés dans le tableau (Tableau C.III.1)

2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Tableau C.III.1

Effet antimicrobien des produits de synthèse sur les microorganismes pathogènes (Les zones d'inhibition sont données en mm).

Molécules Testées	<i>S. aureus</i> (ATCC 33862)	<i>B. cereus</i> (ATCC 10876)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>Candida albicans</i> (ATTC 10231)
A1	/	/	/	/	/
A2	/	/	/	/	/
A3	/	/	/	/	/
A4	7	/	/	8	/
B1	/	/	/	/	/
B2	/	/	/	/	/
B3	/	/	/	/	/
B4	8	/	/	8	/
Amikacine	22	24	22	25	NT
DMSO	/	/	/	/	/

/ : Produit inactif ; NT : Non testé.

Après incubation des boîtes de Pétri à 37 °C pendant 18-24 h, nous avons remarqué que les hétérocycles (**A4** et **B4**) dérivés des deux acides carboxyliques **A1** et **B1** respectivement, ainsi que les produits intermédiaires (**A2**, **A3**, **B2**, **B3**) n'ont eu aucun effet inhibiteur sur les quatre souches bactériennes utilisées et la levure *Candida albicans*. Ces résultats peuvent être expliqués par l'inactivité des composés ou bien à la faible concentration de la solution mère. On remarque que toutes les bactéries indicatrices sont hautement sensibles à l'amikacine (**AK**) (Figures C.III.1 - C.III.5).

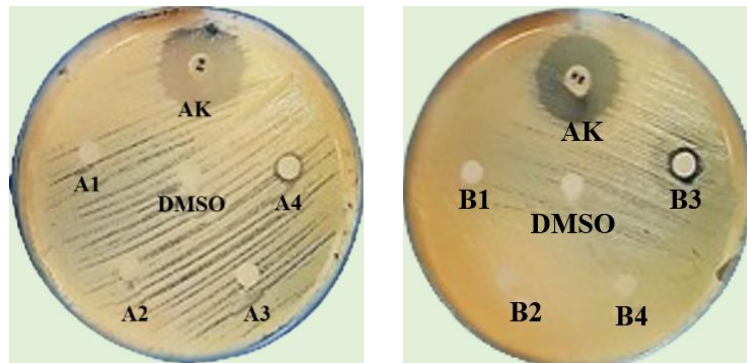


Figure C.III.1- *Staphylococcus aureus* (ATCC 33862).

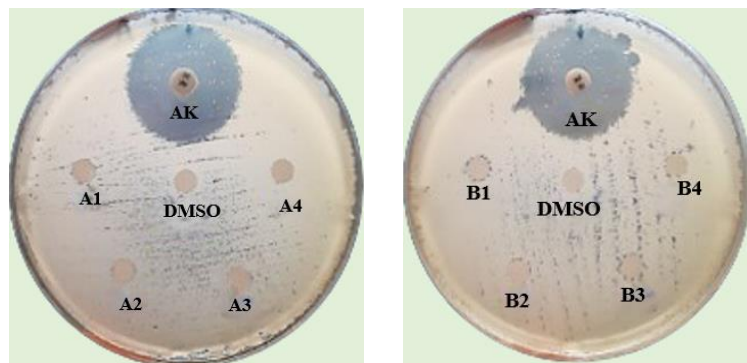


Figure C.III.2- *Bacillus cereus* (ATCC 10876).

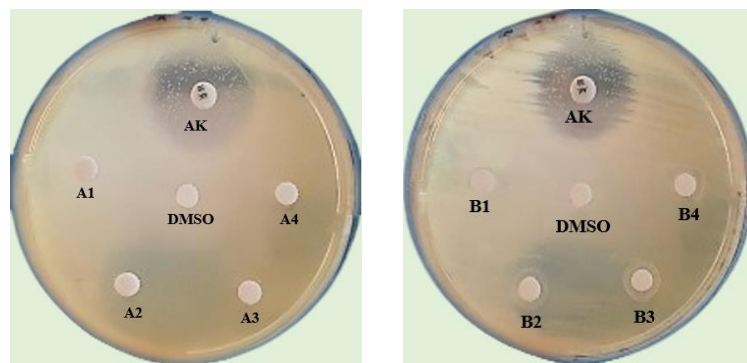


Figure C.III.3- *Pseudomonas aeruginosa*.

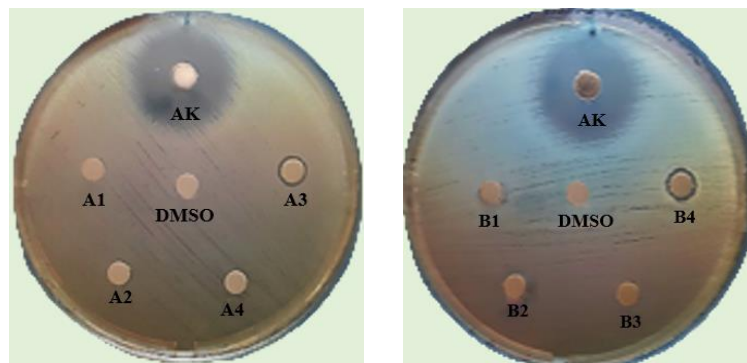


Figure C.III.4 - *Escherichia coli* (ATCC 25922).

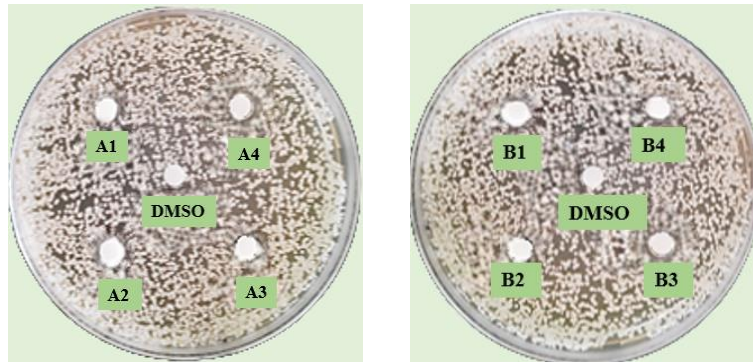


Figure C.III.5 - *Candida albicans* (ATTC 10231).

3. Conclusion

L'étude de l'activité antimicrobienne des composés synthétiques et les produits de départ a révélé qu'aucun des composés possèdent un effet inhibiteur ou létal sur les quatre bactéries et la levure mises en œuvre.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Le travail présenté dans ce mémoire avait l'objectif de synthétiser de nouveaux 1,3,4-oxadiazoles à partir de deux acides carboxyliques à savoir l'acide benzoïque et l'acide 4-hydroxybenzoïque et tester leur activité pharmacologique : activité antioxydante et antimicrobienne.

Pour aboutir à ces molécules, nous sommes passés par des réactions d'estérifications pour la synthèse des produits intermédiaires (**A2**, **B2**) ensuite, la formation des hydrazides (**A3**, **B3**) avec l'hydrazine hydratée, et enfin les hétérocycles cibles (**A4**, **B4**) en utilisant le CS₂, avec de bons rendements 96% et 85% respectivement.

Nos composés synthétisés ont été identifiés par point de fusion, chromatographie sur couche mince et la spectroscopie infrarouge).

Les résultats du test antioxydant qui a été fait par la méthode du DPPH a révélé que les produits intermédiaires (**A3** et **B3**) et surtout les deux hétérocycles (**A4**, **B4**) ont le potentiel d'inhiber l'oxydation des cellules vivantes.

L'activité antimicrobienne des composés chimiques synthétisés et les produits de départ ont montré qu'ils ne possèdent aucun effet inhibiteur sur les bactéries et la levure choisies.

Ce travail constitue une approche dans la conception de quelques composés dérivés des acides carboxyliques commercialisés pouvant servir comme antioxydants.

Il serait beaucoup plus intéressant d'obtenir :

- Des composés organométalliques en associant les deux oxadiazoles synthétisés à différents métaux.
- Des glycosides en les associant aussi à différents glucides.
- De synthétiser d'autres hétérocycles à cinq chaînons comme les thiadiazoles, triazoles et à six chaînons (azines).

Et de se retourner vers d'autres applications biologiques (antifongique et anti-inflammatoire) et non biologique (anticorrosion).

Références Bibliographiques et Webographiques

Références Bibliographiques et Webographiques

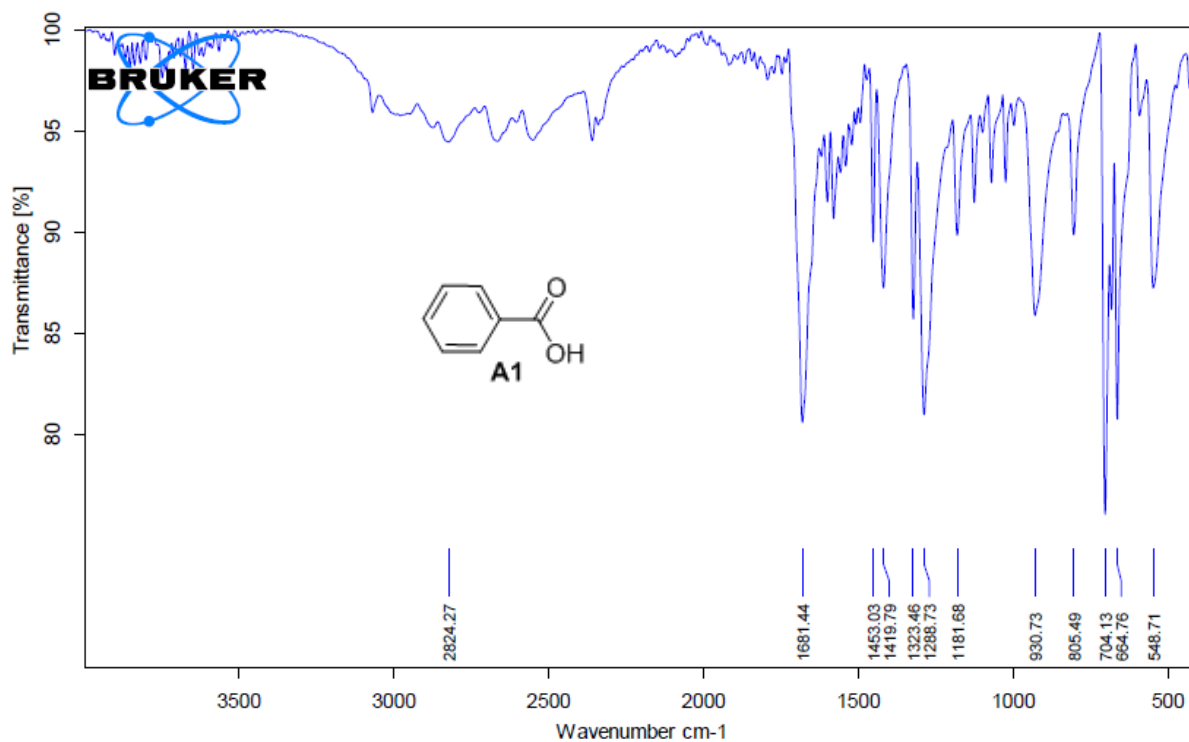
- [1] Joule J. A., et Mills K. (2014). *Chimie Hétérocyclique*. 1^{ère} Ed. De Boeck.
- [2] Habchi A. (2013). Synthèse des hétérocycles azotés à cinq chaînons dérivés de l'acide sorbique et détermination de leurs activités biologiques. Mémoire de Magister en Chimie Organique Bioactive. *Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf*.
- [3] Nacer I. (2023). Essai de synthèse de nouvelles molécules hétérocycliques et étude de leur caractère donneur- π . Thèse de Doctorat. *Université Echahid Chikh Larbi Tébessi-Tébessa*.
- [4] Abbassi M. S. (2021). Synthèse, caractérisation et étude de l'activité biologique des hétéroatomes de diazole dérivés de L-cystéine. Thèse de Doctorat en Sciences en Chimie Organique. *Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf*.
- [5] Luczynski M., Kudelko, A. (2022). Synthesis and biological activity of 1, 3, 4-oxadiazoles used in medicine and agriculture. *Applied Sciences*, vol. 12, no 8, p. 3756.
- [6] Giovanni R., Ugo C. (2011). *Modern Heterocyclic Chemistry: Oxadiazoles*. pp. 1047-1252. DOI :10.1002/9783527637737.ch13.
- [7] Salim H. A., Saoud S. A. (2023). A Review of Modern Methods of Synthesis 1, 3, 4-Oxadiazole as a Bioactive Compound. *Wasit Journal for Pure Sciences*, 2(4). DOI : 10.31185/wjps.262.
- [8] Khalilullah H., Ahsan M. J., Hedaitullah M., Khan S., Ahmed, B. (2012). 1, 3, 4-oxadiazole: a biologically active scaffold. *Mini reviews in medicinal chemistry*.12(8) : 789-801. DOI : 10.2174/138955712801264800.
- [9] Mahi F. I. (2023). Synthèse, Caractérisation et Activités Pharmacologiques des 1,3,4-oxadiazoles-5-thionyl Dérivés de Quelques Acides Hydroxylés et d'un cis-Clérodane Diterpénoïde Extrait de *Cistus monspeliensis*. Thèse de Doctorat en Sciences en Chimie Organique. *Université d'Oran des Sciences et de la Technologie-Mohamed Boudiaf*.
- [10] Sattar A., Abbasi M. A., Siddiqi S. Z., Nafeesa K., Ahmad I. (2016). Synthesis and antibacterial study of some s-substituted aliphatic analogues of 2-mercapto-5-(1-(4-toluenesulfonyl) piperidin-4-yl)-1,3,4-oxadiazole. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 15 (6): 1267-1274. DOI : 10.4314/tjpr.v15i6.20.
- [11] Stolle R. (1899). Ueber die Ueberführung der secundären Säurehydrazide in Derivate des Furodiazols, Pyrrodiazols und Thiodiazols. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 32 (1): 797-798. DOI : 10.1002/cber.189903201122.
- [12] Ammour S. (2021). Caractéristiques chimiques et biologiques (Champignons microscopiques) d'un sol agricole irrigué avec des eaux usées épurées et amendé avec des boues de station d'épuration, cas d'un vignoble dans la wilaya de Boumerdes. Thèse de Doctorat. *Université Mouloud Mammeri*.

- [13] Ainsworth C. (1955). The Condensation of Aryl Carboxylic Acid Hydrazides with Orthoesters. *Journal of the American Chemical Society*. 77 (5): 1148-1150. DOI: 10.1021/ja01610a019.
- [14] Pitasse-Santos P., Sueth-Santiago V., Lima M. E. (2018). 1, 2, 4-and 1, 3, 4-Oxadiazoles as Scaffolds in the Development of Antiparasitic Agents. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 29 (3): 435-456. DOI : 10.21577/0103-5053.20170208.
- [15] Polshettiwar V., Varma R. S. (2008). Greener and rapid access to bio-active heterocycles: one-pot solvent-free synthesis of 1, 3, 4-oxadiazoles and 1, 3, 4-thiadiazoles. *Tetrahedron Letters*. 49 (5) : 879-883. Doi: 10.1016/j.tetlet.2007.11.165.
- [16] Panchal V., Variyab H. H., Patelb G. R. (2019). Advanced in the Synthesis of 1, 3, 4-oxadaizole. A review. *Department of Chemical Engineering, Sal College of Engineering, SAL Education, Science City, Ahmedabad, Gujarat, India*.
- [17] Guermouche Y. et Chougrani A. Z. I. (2022). Étude des Activités Antioxydante, Antimicrobienne et Antifongique de Quelques Cycles Thiazoliques. Mémoire de Master en Génie Pharmaceutique. *Université d'Oran des Sciences et de la Technologie-Mohamed Boudiaf*.
- [18] Rostamizadeh S., Housaini S. G. (2004). Microwave assisted syntheses of 2, 5-disubstituted 1, 3, 4-oxadiazoles. *Tetrahedron letters*. 45 (47): 8753-8756. Doi: 10.1016/j.tetlet.2004.09.095.
- [19] Bouhanika Z., et Boulasel K. (2020). Etude bibliographique autour des méthodes de synthèse des dérivés de la quinoléine et leurs intérêts biologiques : antioxydants et méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante. Thèse de Doctorat. *Université de Jijel*.
- [20] Ribeiro B. D., Barreto D. W., Coelho M. A. Z. (2011). Technological aspects of β -carotene production. *Food and Bioprocess Technology*. 4 : 693-701. Doi: 10.1007/s11947-011-0545-3.
- [21] Atkinson J., Harroun T., Wassall S. R., Stillwell W., Katsaras, J. (2010). The location and behavior of α -tocopherol in membranes. *Molecular nutrition & food research*. 54 (5): 641-65. Doi: 10.1002/mnfr.200900439.
- [22] Käser H. (2011). Naturkosmetische Rohstoffe. Wirkung, Verarbeitung, kosmetischer Einsatz. *Linz FreyaVerlag*. vol. 2.
- [23] <https://www.cerballiance.fr>
- [24] Brotosudarmo T. H. P., Limantara L., Setiyono E., Heriyanto. (2020). Structures of astaxanthin and their consequences for therapeutic application. *International Journal of Food Science*. 2020 (1): 2156582. Doi: 10.1155/2020/2156582.
- [25] Nguyen V. H., Le M. N., Nguyen H. B., Ha K. O., Pham T. H. V., Nguyen T. H., Dao N. S. H., Nguyen V. G., Nguyen D. L., Trinh N. T. (2021). Propyl gallate. *Molbank*. 2021 (2): M1201. Doi: 10.3390/M1201.

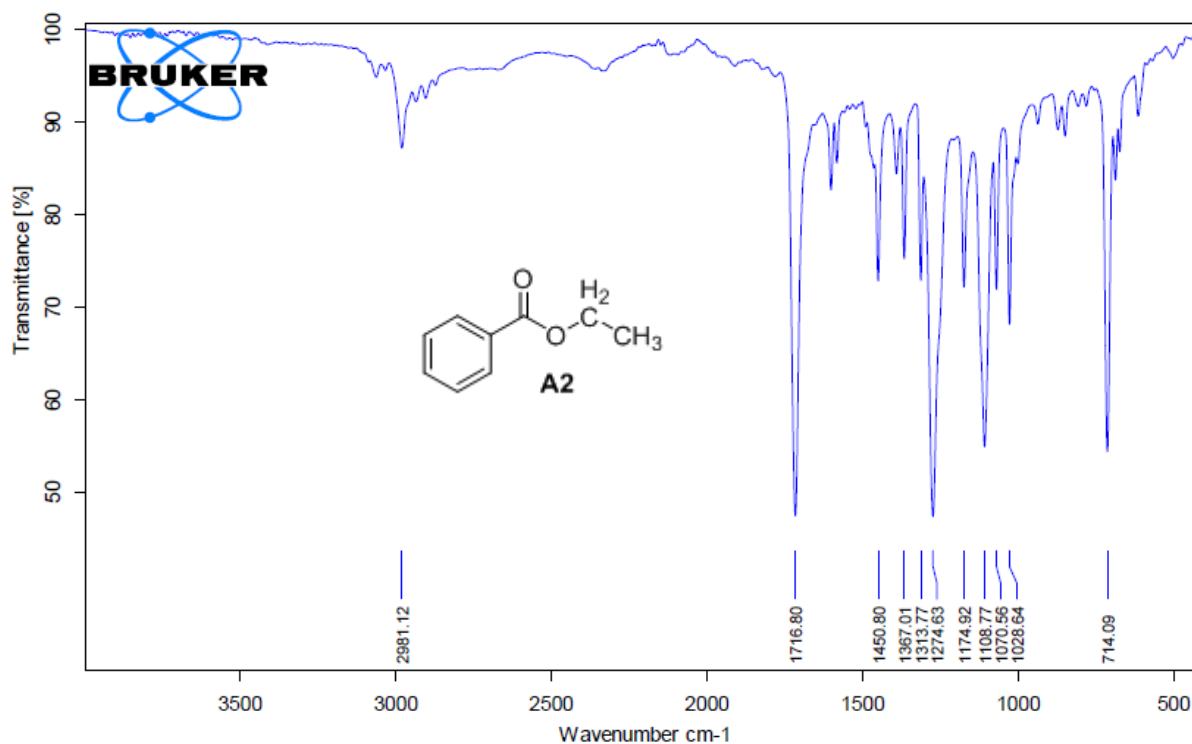
- [26] Rostamizadeh S., Housaini S. G. (2004). Microwave assisted syntheses of 2, 5-disubstituted 1, 3, 4-oxadiazoles. *Tetrahedron letters*. 45 (47): 8753-8756. Doi: 10.1016/j.tetlet.2004.09.095.
- [27] Haddouchi F., Chaouche T. M., Halla N. (2016). Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*. p. 1-9. Doi: 10.1007/s10298-016-1086-8.
- [28] Nazir M., Abbasi M. A., Siddiqui S. Z., Khan K. M., Salar U., Shahid M., Khan F. A. (2018). New indole based hybrid oxadiazole scaffolds with N-substituted acetamides: As potent anti-diabetic agents. *Bioorganic chemistry*. 81: 253-263. Doi: 10.1016/j.bioorg.2018.08.010.
- [29] Brian-Jaisson F. (2014). Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat. *Université de Toulon*.
- [30] Guasto J. S., Rusconi R., Stocker R. (2012). Fluid mechanics of planktonic microorganisms. *Annual Review of Fluid Mechanics*. 44: 373-400. Doi: 10.1146/annurev-fluid-120710-101156.
- [31] Chen C. J., Song B. A., Yang S., Xu G. F., Bhadury P. S., Jin L. H., Chen Z. (2007). Synthesis and antifungal activities of 5-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl)-2-sulfonyl-1, 3, 4-thiadiazole and 5-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl)-2-sulfonyl-1, 3, 4-oxadiazole derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 15 (12): 3981-3989. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.04.014.
- [32] George O'Toole, Heidi B. Kaplan, Roberto Kolter. (2009). Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology*. 54 : 49-79. DOI : 10.1146/annurev.micro.54.1.49.
- [33] El Amri J., El Babaoui K., Zair T., Bouharb H., Chakir S., Alaoui T. (2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*. 82 : 7481-7492. DOI: 10.4314/jab.v82i1.16.
- [34] Fathi M. A. A., Abd El-Hafeez A. A., Abdelhamid D., Abbas S. H., Montano M. M., Abdel-Aziz M. (2019). 1, 3, 4-oxadiazole/chalcone hybrids: Design, synthesis, and inhibition of leukemia cell growth and EGFR, Src, IL-6 and STAT3 activities. *Bioorganic chemistry*. 84: 150-163. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.11.032.
- [35] El-Sayed W. A., Fathi N. M., Gad W. A., El-Ashry E. S. H. (2008). Synthesis and Antiviral Evaluation of Some 5-N-Arylaminomethyl-2-glycosylsulphonyl-1, 3, 4-oxadiazoles and Their Analogs against Hepatitis A and Herpes Simplex Viruses. *Journal of Carbohydrate Chemistry*. 27 (6): 357-372. DOI: 10.1080/07328300802262778.
- [36] Ceylan S. (2016). Synthesis and biological evaluation of new Mannich and Schiff bases containing 1, 2, 4-triazole and 1, 3, 4-oxadiazole nucleus. *Medicinal Chemistry Research*. 25: 1958-1970. DOI: 10.1007/s00044-016-1640-9.
- [37] Wang P. Y., Wang M. W., Zeng D., Xiang M., Rao J. R., Liu Q. Q., Yang S. (2019). Rational optimization and action mechanism of novel imidazole (or imidazolium)-labeled 1, 3, 4-oxadiazole thioethers as promising antibacterial agents against plant

- bacterial diseases. *Journal of agricultural and food chemistry*. 67 (13): 3535-3545. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b06242.
- [38] <https://regnemycetes.weebly.com/>
- [39] <https://www.geo.fr/sciences>
- [40] <https://www.toutsurlalevure.fr/quest-ce-que-la-levure/quest-ce-que-la-levure/>
- [41] Balachandran K. S., George M. V. (1973). Oxidation with metal oxides-VI: Oxidation of benzoylhydrazones of aldehydes, ketones and 1, 2-diketones with nickel peroxide. *Department of Chemistry, Indian Institute of Technology, Kanpur-16, India*. 29 (14): 2119-2128. DOI: 10.1016/0040-4020(73)80152-8.
- [42] Brahimi F. T., Belkhadem F., Trari B., Othman A. A. (2020). Diazole and triazole derivatives of castor oil extract: synthesis, hypoglycemic effect, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Grasas y Aceites*. 71 (4): e378-e378. DOI:10.3989/gya.0342191.
- [43] Nouredine A., Saidat B., Bakchiche B., Maatallah M. (2015). Etude comparative des indices d'activité antioxydante des extraits du Cérium et du DPPH: Application sur trois plantes médicinales locales. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. 13 (3): 681.
- [44] Haddoudi M., Mellouk H., Bejjany B., Dani A., Digua K. (2014). Valorisation du marc du café : extraction de l'huile et évaluation de son activité antioxydante. *Laboratoire de Génie des Procédés et Environnement, Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia, Université Hassan, Maroc*. vol. 8, no 36.
- [45] Wang P. Y., Wang M.W., Zeng D., Xiang M., Rao J. R., Liu Q. Q., Liu L. W., Wu Z. B., Li Z., Song B. A., Yang S. (2019). Rational optimization and action mechanism of novel imidazole (or imidazolium)-labeled 1,3,4-oxadiazole thioethers as promising antibacterial agents against plant bacterial diseases. *Journal of agricultural and food chemistry*. 67 (13): 3535-3545. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b06242.
- [46] Sarr S. O., Fall A. D., Gueye R., Diop A., Diatta K., Diop N., Diop Y. M. (2015). Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (*Verbenaceae*). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 9 (3):1263-1269.
- [47] Mechernene B. (2014). Évaluation de l'Activité Antioxydante de Quelques Extraits de la Racine de *Bryonia dioica*. Mémoire de Master. Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire. *Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen*.
- [48] Tanoh S. K., N'Gaman-Kouassi C., Boa D., Mamyrbekova-Békro J. A., Békro Y. A. (2019). Activité antioxydante des extraits bruts hydroéthanoliques et hydroacétoniques des organes de quatre plantes de Côte d'Ivoire médicinales. *Nature & Technology*. 11 (21) : 28-34.
- [49] Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M., Chaabouni M. M. (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*. 10: 119-125.

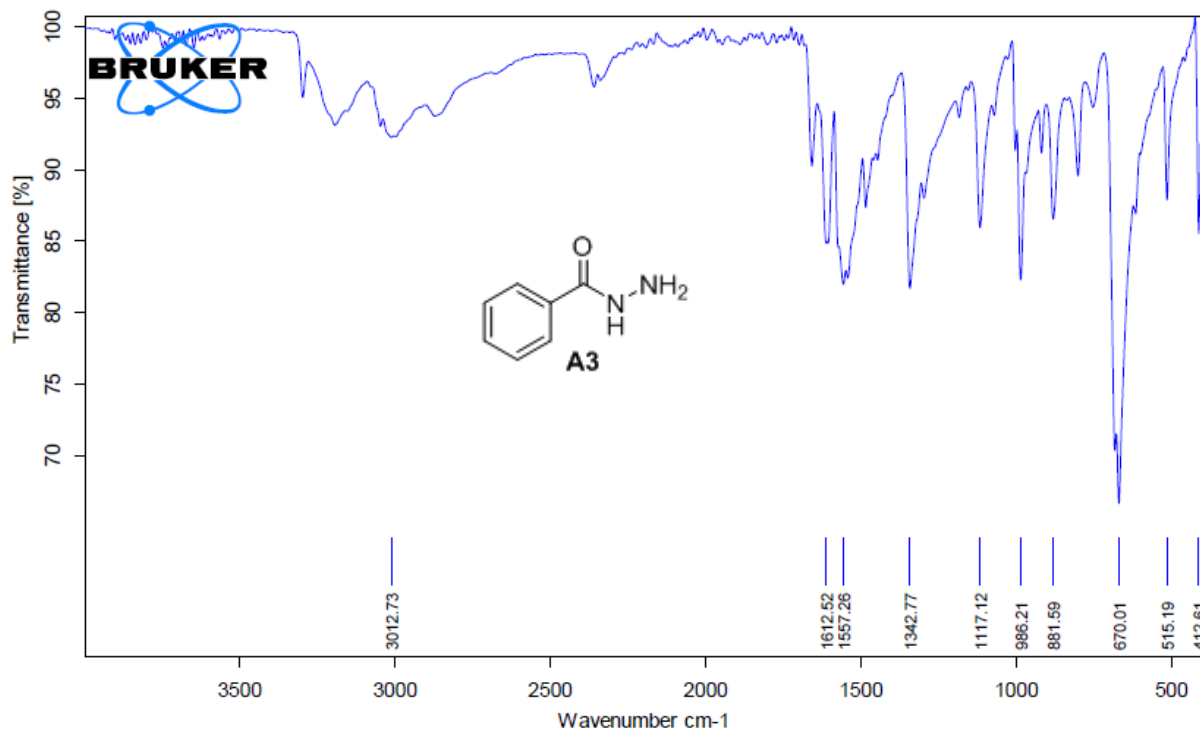
Annexe



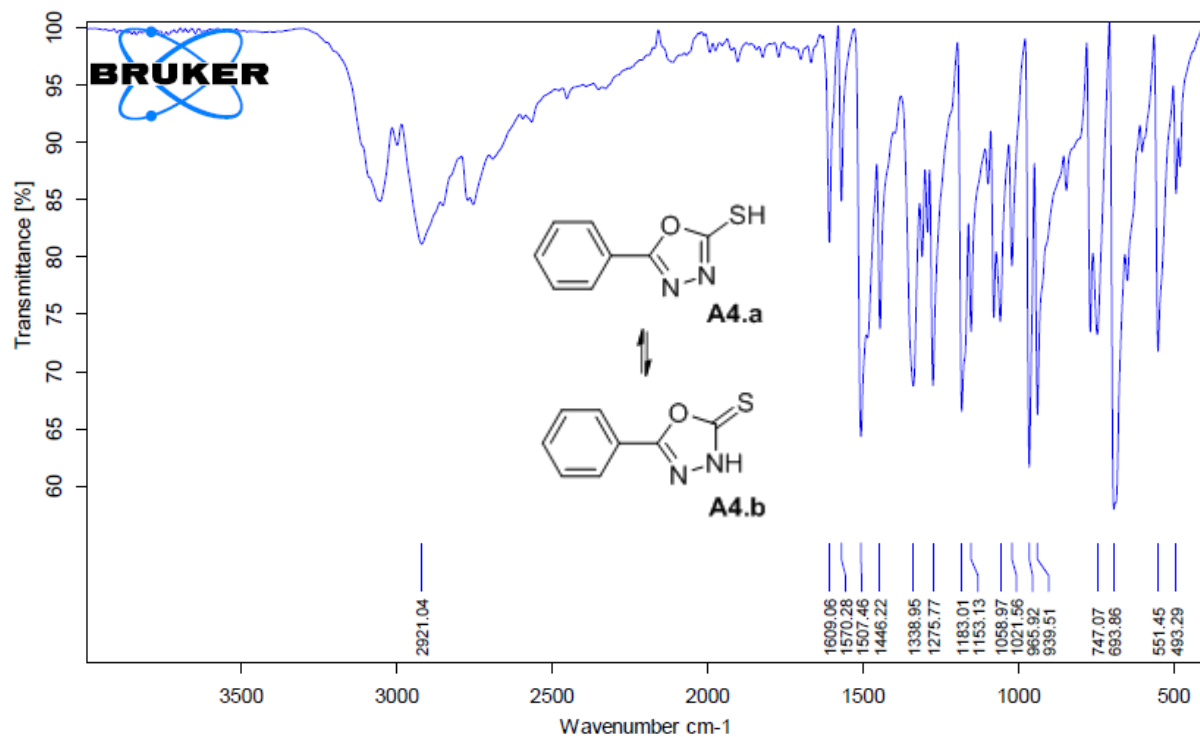
Annexe 1 – Spectre infrarouge de l'acide benzoïque (A1).



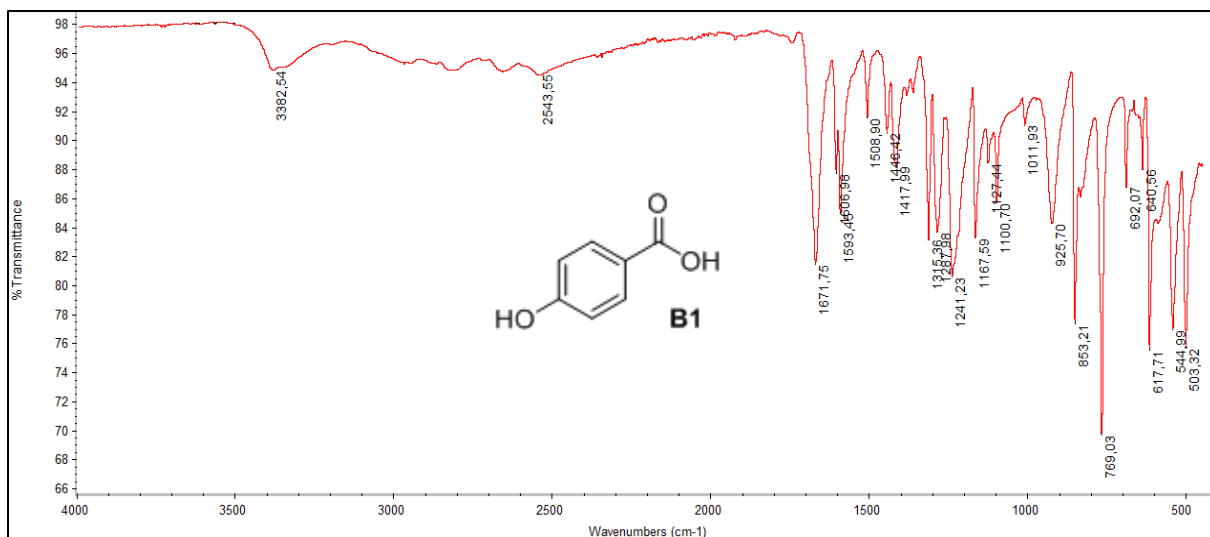
Annexe 2 – Spectre infrarouge de l'éthyle benzoate (A2).



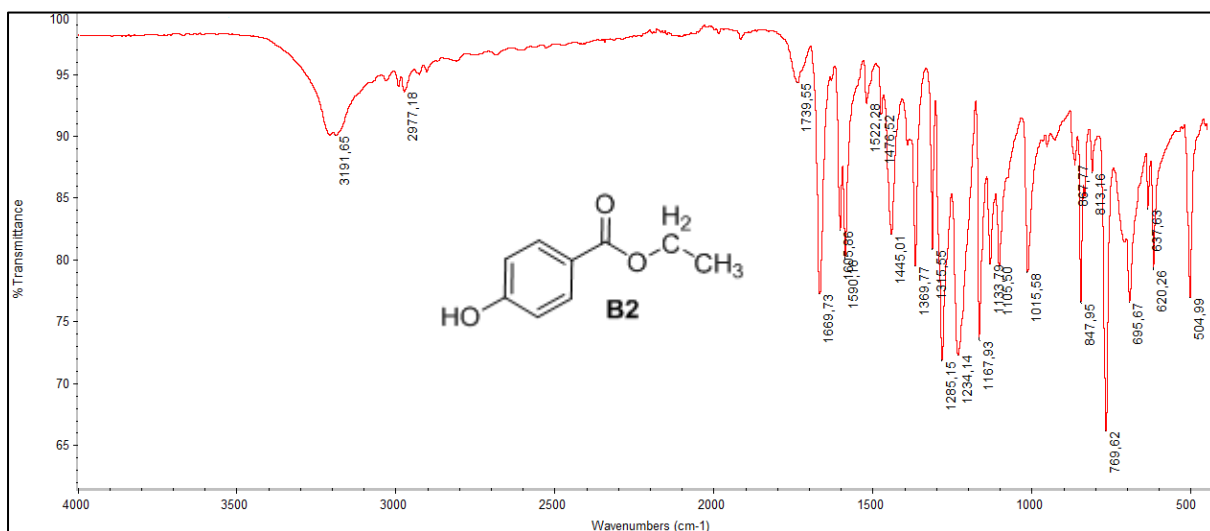
Annexe 3 – Spectre infrarouge du benzohydrazide (A3).



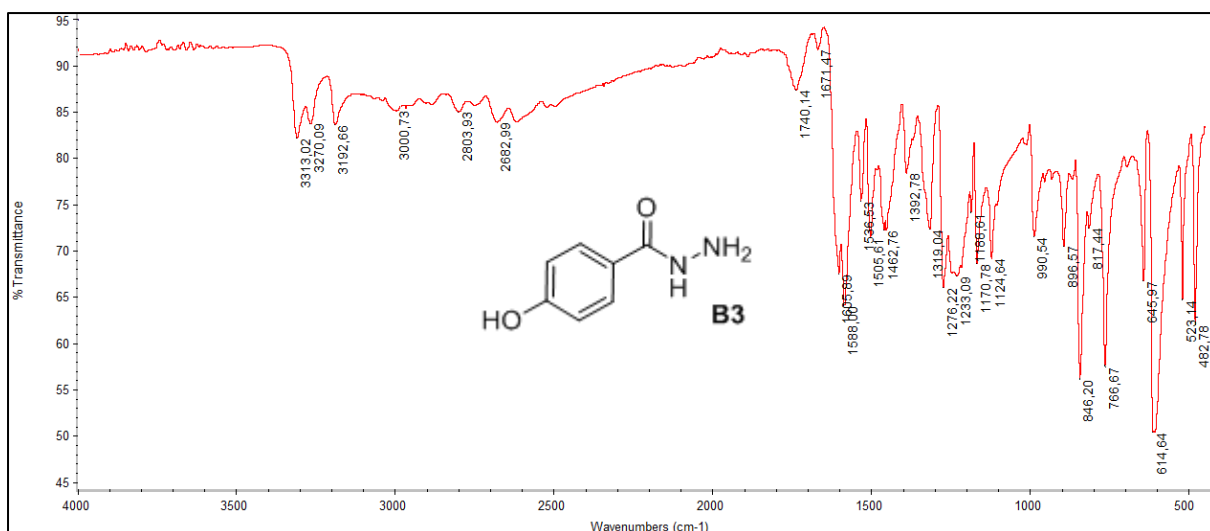
Annexe 4 – Spectre infrarouge du 5-phényl-1,3,4-oxadiazole-2-thione (A4).



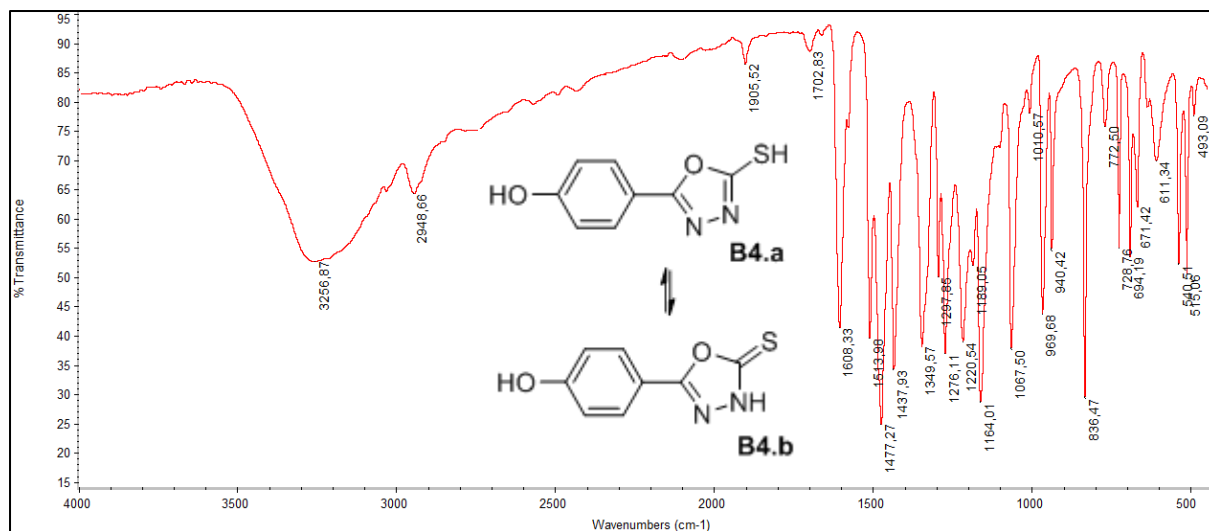
Annexe 5 – Spectre infrarouge de l'acide 4-hydroxybenzoïque (B1).



Annexe 6 – Spectre infrarouge de l'éthyle 4-hydroxybenzoate (B2).



Annexe 7 – Spectre infrarouge du 4-hydroxybenzohydrazide (B3).



Annexe 8 – Spectre infrarouge du 5-(4-hydroxyphenyl)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione (B4).