

ملخص: تتناول الدراسة الحالية تحضير ثلاثة جزيئات جديدة من فئة الفا-امينو فوسفونات، والتي رمز لها ب: 5-HMAP، 5-HNAP و 4-HNAP، اعتمادا على تفاعل "كاباتشنيك" ثلاثي المكونات و وحيد المرحلة، وقد درست بنيتها بواسطة مطياف الأشعة السينية وحيدة البلورة RX، و الرنين المغناطيسي النووي RMN والامتصاص الجزيئي UV-Vis و الأشعة تحت الحمراء FT-IR.

أخضعت الجزيئات المحضرة لتجارب مخبرية مكثفة، لتحديد نشاطها كمضادات: الأكسدة و الزهايمر و مرض السكر و القرحة و الالتهابات و الميكروبات و التحلل، و قدرتها على الحماية من أشعة الشمس SPF.

في هذا العمل طبقت أيضا، ثلاث طرق لنمذجة الجزيئات، نظرية DFT لمعرفة خصائص التفاعل الكيميائي، ولتوضيح الارتباط بين بنية الجزيئات والنشاط البيولوجي. من جهة أخرى، تم تحليل العلاقة بنية الجزيئات بطريقة الQSAR، والتنبؤ بالتشابه بينها و بين أدوية نموذجية، باستخدام برنامج متخصص. نشير إلى أننا أجرينا دراسة تجريبية، بطريقة الالتحام الجزيئي، لتقدير التقارب بين AChE, BChE و alpha-amylase، والجزيئات المحضرة.

بينت الدراسة التجريبية و النظرية أن الجزيئات المحضرة، تملك نشاطا بيولوجيا هاما، وخواصا صيدلانية متميزة و واعدة.
الكلمات المفتاحية: اصطناع عضوي، الأشعة السينية، التحليل الطيفي، الزهايمر، النشاط البيوصيدلاني، DFT و QSAR.

Abstract: The present study focuses on the synthesis of three new α -aminophosphonate molecules: 5-HMAP, 5-HNAP and 4-HNAP, obtained according to the three-component reaction of Kabachnik-Fields. The structure of the molecules synthesized was characterized by physicochemical and spectroscopic methods: R-X, NMR, FT-IR and UV-Vis.

The synthesized molecules have been subjected to extensive laboratory-scale experiments to determine their biopharmaceutical activity as antioxidants, anti-Alzheimer's, anti-diabetic, anti-ulcer, anti-inflammatory, antimicrobial, anti-hemolytic, and protective power against SPF solar radiation. Molecular modeling is carried out by three methods; The DFT method is performed for the demonstration of chemical reactivity and to establish a correlation between molecular structures and biological activity. The structure-activity relationship QSAR and prediction of the similarity of our compounds to drugs was carried out using specialized software. The empirical study by the molecular docking method was used to estimate the affinity between (AChE, BChE and alpha-amylase).

The experimental and theoretical results show that the synthesized molecules possess important biological activities and promising pharmaceutical properties.

Keywords: Synthesis, X-rays, spectroscopy, Alzheimer's, biopharmaceutical activity, DFT and QSAR.

Résumé : La présente étude porte sur la synthèse de trois nouvelles molécules α -aminophosphonates : 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP, obtenues selon la réaction à trois composants de Kabachnik-Fields. La structure des molécules synthétisées a été caractérisée par les méthodes physicochimiques et spectroscopiques : R-X, RMN, FT-IR et UV-Vis.

Les molécules synthétisées ont été soumises à des expériences approfondies à l'échelle du laboratoire, pour déterminer leur activité biopharmaceutiques en tant qu'antioxydants, antiAlzheimer, antidiabétique, antiulcéreux, antiinflammatoire, antimicrobienne, antihémolytique, et le pouvoir de protection contre les rayonnements solaires SPF. La modélisation moléculaire est effectuée par trois méthodes ; La méthode DFT est effectuée pour la mise en évidence de la réactivité chimique et d'établir une corrélation entre les structures moléculaires et l'activité biologique. La relation structure-activité QSAR et prédiction de la similarité de nos composés avec les médicaments ont été menées à bien à l'aide des logiciels spécialisés. L'étude empirique par la méthode d'arrimage moléculaire "docking" a été utilisée afin d'estimer l'affinité entre (l'AChE, BChE et l'alpha-amylase).

Les résultats expérimentaux et théoriques montrent que les molécules synthétisées possèdent des activités biologiques importantes et des propriétés pharmaceutiques prometteuses.

Mots clés : Synthèse, rayons X, spectroscopie, Alzheimer, activité biopharmaceutique, DFT et QSAR.

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS - SETIF1

FACULTÉ DE TECHNOLOGIE

THÈSE

Présentée au Département de génie des procédés

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

Domaine : Sciences et Technologie

Filière: Génie des procédés

**Option: Génie des Procédés
Pharmaceutiques**

Par

Mme ZAOUT Samiya

THÈME

**Synthèse d'une nouvelle famille de phosphonates bioactives,
étude structurale et mise en évidence d'aspects
pharmacologiques.**

Soutenue le 24 /03/ 2022 devant le Jury:

MERBAH-ELKOLLI Meriem	Pr	U. F. ABBAS. SETIF-1	Présidente
CHAFAI Nadjib	MCA	U. F. ABBAS. SETIF-1	Rapporteur
HARKAT Hassina	Pr	U. M. B. BATNA-2	Examinatrice
SOBHI Widad	MCA	U. F. ABBAS. SETIF-1	Examinatrice
BELHOCINE Youghourta	MCA	Univ. Skikda	Examinateur
CHAFAA Salah	Pr	U. F. ABBAS. SETIF-1	Rapporteur en retraite

الإهداء

إلى روح أعز من أخذته مني المقابر وكان قدر الله أسبق وأنا في غمرة الانشغال بالدنيا وبهذا البحث، **أبي الغالي**

عمّار ألف رحمة ونور وسلام عليه ...

والدي العزيز لم يكن مدرسا ولا طبيبا ولا أستاذا باحثا، لكنه كان مهتما بالعلم والتعليم والبحث وباهتماماتي، دفعني للدكتوراه دفعا ودعمني بكل جوارحه، وحين كانت الرياح تعصف بي وتخف عزمي وأهمم بالتراجع يقف داعما يعرض مساعدته. وكانت آخر وصاياه أن أكمل المسيرة والمسار حتى أتوج بالشهادة، وهكذا كان دأبه في كل مراحل حياتي يفرح بإجازاتي وشهاداتي ويرمقني بنظرات دعم وافتخار صنعت مني امرأة صامدة أواجه الحياة بابتلاءاتها وامتحاناتها الصعبة... لقد كنت يا أبي مدرسة في التحدي والعطاء والتضحية لا يمر يوم بل ساعة لا أتذكر فيها دعمك وتفانيك فيه تفاصيل رائحتك وعطرك وكل شيء فيك... هذه الدكتوراه دكتوراك أبي احتفظ بإيجابياتها... كنت أكثر من سيفرح بهذا العمل وتقتلني فكرة أن لا تكون موجودا يوم المناقشة، لترى بعينيك ثمرة جهدك ودعمك لي في اللحظات الحرجة قبل العادية، أرجو من ربي العلي القدير أن يكرم مأواك ويبارك صلاتك ونسكك ويبعثك مقاما محمودا ...

وأرجو من كل من مر بهذا العمل أو استفاد منه أن يدعو له بالرحمة والمغفرة.

Dédicaces

- *A la mémoire de mon très cher père.*
 - *A ma très chère mère.*
 - *A mon très cher époux.*
- *A ma très chère grand-mère.*
 - *A mon très cher beau-père.*
- *A la mémoire de ma belle-mère.*
 - *A mon très cher frère.*
- *A toutes mes très chères sœurs.*
 - *A mes très chers enfants.*
- *A tous mes neveux et nièces.*
 - *A toute ma famille.*

..... *Samiya.....*

Remerciements

أَلْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Électrochimie des Matériaux Moléculaire et Complexes (LEMMC), Faculté de technologie, Département de Génie des Procédés de l'Université Ferhat ABBAS - SETIF-1 sous la direction du Professeur **Salah CHAFAA** et du Docteur **Nadjib CHAFAI**.*

*Je tiens à remercier de manière très particulièrement et à exprimer ma profonde reconnaissance au professeur **SALAH CHAFAA** mon directeur de thèse, qui a initié, suivi et dirigé ce travail durant ces années. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée, ainsi que pour sa collaboration, patience, ses conseils et son suivi jusqu'à la fin de ce travail.*

*Je tiens également à témoigner toute ma gratitude envers Monsieur **Nadjib CHAFAI**, maître de conférences A, MCA, Université Ferhat ABBAS SETIF-1, d'avoir accepté régulariser ma situation administrative en remplaçant mon encadreur partant à la retraite. Qu'il trouve ici mes sincères considérations et mon profond respect.*

*Je tiens à remercier Madame la Professeur **Meriem MERBAH-ELKOLLI**, Professeur à l'Université Sétif-1, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury. Qu'elle trouve ici l'expression de ma grande considération.*

*J'exprime toute ma gratitude à Madame **Hassina HARKET**, Professeur à l'université de Batna 2, qui m'a fait l'honneur de participer à ce jury et de juger mon travail de thèse, sa présence, afin de m'aider à avancer encore vers d'autres horizons.*

*J'exprime mes vifs remerciements à Madame **Widad SOBHI**, MCA à l'université de Sétif 1 pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.*

*Que Monsieur **BELHOCINE Youghourta** MCA à l'université de Skikda, trouve ici mes sincères considérations pour m'avoir fait l'honneur d'examiner le travail de ma thèse.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Madame **Lamia BENDJEDDOU**, Professeur à l'Université frères Mentouri, Constantine 1, pour m'avoir aidé dans ce travail. Merci pour vos encouragements et votre soutien quotidien, je ne peux oublier les qualités de vos conseils aussi bien sur le plan scientifique que moral.*

*J'exprime mes sincères remerciements à mes chères amies et sœurs **Amani Hind BENAHSENE**, **Wafa BOUKHMIS** et **Samia KOUT**, qui m'ont apporté leur soutien moral et*

intellectuelle et pour les bons moments partagés tout au long de ma démarche. Heureusement que vous étiez là.

*Je tiens à témoigner toute ma gratitude à Mr **CHERFAOUI Ibrahim** Maître de Recherche A au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques (CRAPC) pour ses conseils, sa confiance et ses qualités intellectuelles qui ont su nourrir mes réflexions.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Dr **BOUOUDEN Walid** et Dr **KRID Adel**, pour m'avoir aidé à réaliser la partie de Docking moléculaire de ma thèse. Qu'ils veuillent bien accepter ma profonde reconnaissance pour les précieux conseils qu'ils m'a prodigués.*

*J'adresse mes remerciements particuliers à Dr **BENCOUICI Chawki** et Mme **ASSIA** de centre de recherche et de biotechnologie -Constantine- (CRBT), Dr **DJENADI Katia** de l'université de Bouira, Dr **Ouahiba ALIANE** et Mr **ZIANI Issame** de l'université BBA, Pr **Hossine MERAZIG** et Pr **Ouahiba KOUTCHOUKALI** de l'université -Constantine 1- et à Mr **Mohamed NADJI** pour leur soutien, leur générosité et leurs précieux conseils.*

*Je présente mes remerciements les plus sincères à tous les membres du Laboratoire d'Électrochimie des Matériaux Moléculaires et Complexes (LEMMC), Faculté de technologie, Département de Génie des Procédés de l'Université Ferhat ABBAS - SETIF-1, avec qui j'ai pu agréablement travailler et échanger des connaissances riches pendant ces années. Merci **Mouna MEHRI**, **Khaoula DAOUADI**, **Louiza OUKSSEL**, **Rachida KERKOUR**, **Imene KIROUANI**, **Samia MAAMRI** Sans oublier d'évoquer les grands efforts et la patience des ingénieurs de laboratoire mesdames **Souad** et **Fouzia**. Merci mes amis pour l'ambiance très agréable au labo, aussi pour votre support et vos encouragements.*

J'exprime mes remerciements et ma reconnaissance à tout le personnel du laboratoire des analyses médicales de EPSP de MEDJANA, BBA, de m'avoir permis de réaliser les tests de la cytotoxicité et d'activité antimicrobienne.

*Je ne saurais oublier dans mes remerciements ma famille qui m'a soutenu dans mes choix et qui a toujours été présente à chaque fois que cela était nécessaire ; je citerai baba elaaaziz **RABI yerahmo**, ma mère elaaaziza **RABI yehfadheha**, nanna **Khedidja RABI yehfadheha**, mes sœurs, mon frère, mes enfants, ma belle-sœur **Souad BELAIDI** et notamment mon mari elaaaziz **Mustapha Elhadi** pour sa sympathie chaleureuse, son appui inestimable, son soutien illimité et le sourire dans les moments difficiles.*

Merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci à tous.

Samiya ZAOUT

TABLE
DES MATIÈRES

TABLE DES MATIERES

Table des matières	i
List des abréviations.....	xi

INTRODUCTION GENERALE 1

Références bibliographiques	4
--	----------

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1	Introduction	9
I.2	Les phosponates	10
I.2.1	Définition	10
I.2.2	Utilisations des phosphonates	11
I.2.2.1	La corrosion.....	11
I.2.2.2	Protection de l'environnement	12
I.2.2.3	Activités biochimiques et pharmacologiques.....	13
I.2.2.3.1	Les propriétés antivirales	13
I.2.2.3.2	Activités anticancéreuses	13
I.2.2.3.3	Médicaments d'antiresorption osseuse.....	14
I.2.2.3.4	Activité anti-inflammatoires	15
I.2.2.3.5	Substances antibiotiques	15
I.2.3	Classification des phosphonates.....	16
I.2.4	Méthodes d'accès aux composés contenant le motif phosphonate	16
I.2.4.1	Réactions pour l'obtention des esters α -aminophosphonates.....	16
I.2.4.1.1	Réaction de Kabachnik-Fields (phospha-Mannich).....	17
I.2.4.1.2	La réaction de Pudovik –Kabachnik	19
I.2.4.2	Réactions pour l'obtention des acides α -aminophosphoniques	20
I.2.4.2.1	Une voie directe	20

I.2.4.2.1.1	La réaction de Moedritzer et Irani	20
I.2.4.2.1.2	Voie indirecte.....	21
I.2.4.3	Méthodes de synthèse d'autres phosphonates	21
I.2.4.3.1	Réaction de Michaelis-Arbuzov	21
I.2.4.3.2	Réaction de Michaelis-Becker	22
I.2.4.3.3	La réaction de Mitsunobu.....	22
I.2.4.3.4	Réaction d'Abramov et Pudovik.....	23
I.3	Généralités sur les activités biologiques	24
I.3.1	L'activité antioxydante.....	24
I.3.1.1	Les radicaux libres	24
I.3.1.1.1	Principaux radicaux libres	24
□	Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	25
□	Les radicaux dérivés d'azote (ERN)	25
I.3.1.1.2	Les sources des radicaux libres	26
□	Les sources endogènes	26
□	Les ions métalliques	26
□	Les sources exogènes	26
I.3.1.2	Stress oxydant et pathologies	27
I.3.1.2.1	Stress oxydant	27
I.3.1.2.2	Pathologies associées au stress oxydant.....	27
A	Théorie radicalaire du vieillissement	27
B	L'inflammation.....	28
C	Le processus de cancérisation	28
D	Maladies neurodégénératives	28
E	Le diabète	29
I.3.1.3	Les antioxydants.....	29
I.3.1.3.1	Différents types des antioxydants	30
A	Le système antioxydant enzymatique	30

B	Systèmes antioxydant non enzymatiques.....	30
□	Systèmes antioxydant endogène non enzymatiques.....	30
□	Systèmes antioxydants exogènes non enzymatiques	30
I.3.1.3.2	Mécanisme antioxydant.....	31
□	Transfert d'atome d'hydrogène	31
□	Transfert mono-électronique d'électron.....	32
□	Chélation des métaux de transition	32
I.3.2	Activité anticholinestérase	32
I.3.2.1	Définition de La maladie d'Alzheimer.....	32
I.3.2.2	Traitement de La maladie d'Alzheimer	32
I.3.2.3	Les cholinestérases et la maladie d'Alzheimer	33
I.3.3	Activité anti-amylase (antidiabétique)	34
I.3.3.1	Le diabète	34
I.3.3.2	Classification du diabète	35
I.3.3.3	Traitements du diabète de type 2.....	35
I.3.3.3.1	Traitements non médicamenteux	35
I.3.3.3.2	Traitements médicamenteux	35
I.3.3.3.3	Insulinothérapie.....	36
I.3.4	Activité inhibitrice d'uréase.....	36
I.3.5	Activité anti-inflammatoire	37
I.3.5.1	Rappel sur l'inflammation.....	37
I.3.5.2	Types d'inflammation	37
I.3.5.2.1	L'inflammation aiguée	37
I.3.5.2.2	L'inflammation chronique.....	38
I.3.5.3	Les anti-inflammatoires.....	38
I.3.5.3.1	Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	38
I.3.5.3.2	Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)	39
I.3.6	Facteur de protection solaire (SPF).....	39

I.3.6.1	Le rayonnement solaire	39
I.3.6.2	La peau	40
I.3.6.3	Effets néfastes du soleil sur la peau	40
I.3.6.4	La photoprotection	41
I.3.6.4.1	La photoprotection naturelle	41
I.3.6.4.2	La photoprotection cosmétique	41
□	Les filtres UV chimiques (ou organiques)	41
□	Les écrans minéraux	42
□	Les filtres d'origine naturelle	42
I.3.7	L'activité antimicrobienne	42
I.3.7.1	Généralités sur les bactéries	42
I.3.7.2	Familles en fonction de Leur paroi : comparatif Gram + et Gram –.....	43
I.3.7.3	Les antibiotiques	43
I.3.7.3.1	Généralités.....	43
I.3.7.3.2	Critères de classification	43
□	L'origine.....	43
□	Le site d'action spécifique à chacun :	43
□	Spectres d'activité antibactérienne :	44
□	Les modalités d'action :	44
I.3.7.4	Résistance bactérienne aux antibiotiques	44
I.3.7.4.1	La résistance naturelle	45
I.3.7.4.2	La résistance acquise	45
	Référence bibliographique	46

Chapitre II : Analyses et méthodes expérimentales

II.1	Introduction	65
II.2	Méthodes analytiques et appareils	65
II.2.1	Point de fusion.....	65

II.2.2	Chromatographie	65
II.2.3	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR).....	65
II.2.4	Spectrophotométrie ultraviolet visible UV-Vis.....	65
II.2.5	Résonance magnétique nucléaire (RMN)	66
II.2.6	La diffraction des rayons X sur monocristal	66
II.3	Méthodes d'évaluation des activités biologiques	66
II.3.1	L'activité antioxydante	66
II.3.1.1	Matériels et réactifs	67
II.3.1.1.1	Instrument utilisé :.....	67
II.3.1.1.2	Réactifs.....	67
II.3.1.2	Pouvoir de piégeage du radicale DPPH	70
II.3.1.3	Pouvoir de piégeage du radicale ABTS*	71
II.3.1.4	Pouvoir de piégeage du radicale Galvinoxyl (GOR) :	73
II.3.1.5	Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	73
II.3.1.6	Capacité de réduire l'ion ferrique (Pouvoir réducteur ou FRAP).....	74
II.3.1.7	L'activité de la Phénanthroline	75
II.3.1.8	Test de blanchiment au β -carotène-acide linoléique.....	76
II.3.2	Activité anti-enzymatiques.....	77
II.3.2.1	Instrument utilisé :	77
II.3.2.2	Réactifs utilisés	78
II.3.2.3	Activité anticholinestérase	79
II.3.2.4	Activité inhibitrice de l' α - amylase	81
II.3.2.5	Evaluation de l'activité anti-uréase.....	82
II.3.3	Inhibition de la dénaturation des protéines	83
II.3.3.1	Instrument utilisé	84
II.3.3.2	Réactifs utilisés	84
II.3.3.3	Préparation de la solution protéine	84
II.3.3.4	Préparation des échantillons	84

II.3.4	Essai de l'activité hémolytique <i>in vitro</i> des esters α -aminophosphonates synthétisés	85
II.3.4.1	Matériels	85
II.3.4.2	Réactifs	85
II.3.4.3	Préparation de la suspension de globules rouges	85
II.3.4.4	Préparation des échantillons des molécules synthétisées.....	85
II.3.5	L'activité de protection solaire (SPF)	86
II.3.6	Activités Antimicrobiennes.....	88
II.3.6.1	Matériels et réactifs.....	89
II.3.6.2	Les germes à tester.....	89
II.3.6.3	Technique de diffusion en milieu gélosé « la technique de diffusion en puits »	89
II.3.6.3.1	Solubilisation des produits à tester.....	90
II.3.6.3.2	Préparation des pré-cultures	90
II.3.6.3.3	Préparation de l'inoculum.....	90
II.3.6.3.4	Mode opératoire	90
II.3.6.4	Définition de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	91
II.3.6.5	Détermination de La Concentration Minimale Bactéricide CMB	91
II.3.6.6	Evaluation du pouvoir bactéricide et bactériostatique	92
II.3.7	Etudes statistiques	92
Références bibliographiques :		93

Chapitre III : Synthèse et caractérisation

III.1	Introduction	98
III.2	Synthèse des molécules ciblées.....	98
III.2.1	Réactifs et solvants utilisés	98
III.2.2	Synthèse des molécules ciblées :.....	99

III.2.2.1	Synthèse du composé diethyl {[2-hydroxy-5-methylphenyl]amino} (phenyl)methyl}phosphonate, 5-HMAP	100
III.2.2.2	Synthèse de la molécule diethyl {[2-hydroxy-5-nitrophenyl]amino} (phenyl)methyl}phosphonate, 5-HNAP	101
III.2.2.3	Synthèse de diethyl {[2-hydroxy-4-nitrophenyl]amino} (phenyl)methyl}phosphonate, 4-HNAP	102
III.2.3	Mécanismes réactionnels.....	102
III.2.3.1	Calculs pour prédire le mécanisme réactionnel	103
III.3	Caractérisation des produits synthétisés.....	108
III.3.1	Détermination des propriétés physiques des produits synthétisés	108
III.3.1.1	Analyse chromatographique par CCM	108
III.3.1.2	Aspects générales des molécules synthétisées	109
III.3.1.3	La solubilité des α -aminophosphonates synthétisés	109
III.3.1.4	Points de fusion des α -aminophosphonates synthétisés.....	110
III.3.2	Propriétés spectroscopiques des produits synthétisés	111
III.3.2.1	Analyse par la spectroscopie infrarouge (FT-IR)	111
III.3.2.2	Analyse par la spectrophotométrie UV-visible.....	115
III.3.2.3	Analyse par la spectrométrie de résonance magnétique RMN.....	118
III.3.2.3.1	Analyse RMN de la molécule 5-HMAP.....	119
III.3.2.3.2	Analyse RMN de la molécule 5-HNAP	123
III.3.2.3.3	Analyse RMN de la molécule 4-HNAP	127
III.3.3	Résolution structurale par diffraction des rayons X sur monocristal.....	133
III.3.3.1	Enregistrement des intensités :.....	133
III.3.3.2	Résolution et affinement de la structure	133
III.3.3.3	Etude structurale et Analyse des surfaces Hirshfeld.....	135
III.3.3.3.1	Description structurale du composé 5-HMAP.....	135
III.3.3.3.2	Description structurale du composé 5-HNAP	138
III.3.3.3.3	Analyse de la structure cristalline.....	141

III.3.3.3.4 Analyse des Surfaces Hirshfeld (HS) des composés	143
Références bibliographiques	148

Chapitre IV : Aspects biochimiques des molécules synthétisées

IV.1 Introduction	152
IV.2 L'activité antioxydante.....	152
IV.2.1 Activité anti-radicalaire.....	153
IV.2.1.1 Activité de piégeage de radical DPPH.....	153
IV.2.1.2 Test de piégeage des radicaux ABTS	157
IV.2.1.3 Activité de piégeage du radical Galvinoxyl (GOR).....	160
IV.2.2 Activité réductrice	164
IV.2.2.1 Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC).....	164
IV.2.2.2 Capacité des molécules synthétisées à réduire l'ion ferrique FRAP	167
IV.2.2.3 Activité antioxydante basée sur l'effet de la phénanthroline.....	170
IV.2.3 Activités inhibitrices de peroxydation des lipides (le blanchiment de b-carotène) 174	
IV.3 Activité anti-enzymatiques.....	178
IV.3.1 Activité anticholinestérase	178
IV.3.2 L'activité antidiabétique (anti-amylase).....	182
IV.3.3 Evaluation de l'activité anti-uréase	185
IV.4 Inhibition de la dénaturation des protéines	187
IV.5 Essai de l'activité hémolytique <i>in-vitro</i> des α -aminophosphonates.....	189
IV.6 L'activité de protection solaire SPF	192
IV.7 Evaluation des propriétés antimicrobiennes.....	194
IV.7.1 Antibiogramme.....	194
IV.7.2 Paramètres de l'activité antibactérienne.....	198
Références bibliographiques	201

Chapitre V : Modélisation Moléculaire des Dérivés Synthétisés

V.1	Introduction	207
V.2	Calculs de chimie quantique par la méthode DFT	207
V.2.1	Résultats des calculs de chimie quantique	208
V.2.1.1	Propriétés structurelles et électroniques.....	209
V.2.1.2	Analyse des orbitales moléculaires frontières (FMO)	209
V.2.1.3	Le moment dipolaire	213
V.2.1.4	Charges atomiques des molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP	215
V.3	Etude qualitative de la relation structure-activité QSAR	218
V.3.1	Introduction	218
V.3.2	Les descripteurs moléculaires utilisés dans l'analyse QSAR.....	218
V.3.2.1	Le poids moléculaire.....	218
V.3.2.2	Coefficient de partage (octanol-water) log P	219
V.3.2.3	Superficie topologique de la surface polaire (TPSA)	219
V.3.2.4	Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène (HBD).....	219
V.3.2.5	Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène (HBA).....	220
V.3.2.6	Nrotb	220
V.3.2.7	Volume.....	220
V.3.3	Les propriétés « drug-like »	220
V.3.3.1	La règle de Lipinski	221
V.3.3.2	La règles de Veber	221
V.3.3.3	Règle de Ghose	221
V.3.4	Propriétés ADME-Tox (d'absorption, distribution, métabolisme, excrétion, et de toxicité)	222
V.3.5	Logiciels de calcul des descripteurs moléculaires.....	222
V.3.5.1	Molinspiration.....	222
V.3.5.2	Molsoft.....	222
V.3.5.3	OSIRIS	223

V.3.5.4	SwissADME	223
V.3.6	Résultats de la modélisation des dérivés synthétisés par QSAR.....	223
V.3.6.1	Prévision des propriétés physicochimiques (drug-likeness).....	223
V.3.6.2	Score de bioactivité.....	229
V.3.6.3	Propriétés ADME –TOX	230
V.3.6.3.1	Absorption et distribution	231
V.3.6.3.2	Métabolisme.....	232
V.3.6.3.3	Risques de toxicité	234
V.4	Méthodes non quantiques (empirique) par l’amarrage moléculaire.....	236
V.4.1	Docking Moléculaire.....	236
V.4.2	Logiciel et protocole utilisés	236
V.4.3	Les Résultats du docking moléculaire.....	238
V.4.3.1	Résultats du docking moléculaire avec l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase.....	238
V.4.3.2	Résultats du docking moléculaire avec l’ α -amylase.....	249
	Références bibliographiques	255

CONCLUSION GENERALE264

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

2-A4MP : 2-amino-4-méthylphenol.

2-A4NP : 2-amino-4-nitrophénol.

2-A5NP : 2-amino-5-nitrophénol.

2D-FPs : 2 Dimensional Fingerprints Plots

4BDS : Butyrylcholinestérase humaine en complexe avec la tacrine.

4EY6 : l'acétylcholinestérase humaine en complexe avec la galantamine.

4-HNAP : diethyl {[(2-hydroxy-4-nitrophenyl)amino] (phenyl)methyl}phosphonate.

4W93 : Alpha-amylase pancréatique humaine en complexe avec la montbrétine A.

5-HMAP : diethyl {[(2-hydroxy-5-methylphenyl)amino] (phenyl)methyl}phosphonate.

5-HNAP : diethyl {[(2-hydroxy-5-nitrophenyl)amino] (phenyl)methyl}phosphonate.

A : Affinité électronique.

Å : Angström.

A_{0.5} : la concentration du produit correspondant à une absorbance égale à 0.5.

Abs : l'absorbance du produit.

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).

ACAR : acarbose.

AChE : l'enzyme d'acétylcholinestérase.

ACI : Acetylthiocholine iodide.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADO : antidiabétiques oraux.

AINS : Antiinflammatoires non stéroïdiens.

AIS : Antiinflammatoires stéroïdiens.

ATCC : American Type Culture Collection.

B3LY P : Becke Three Parameters Lee-Yang-Parr.

BBA : bordj bou arreridj.

BChE : l'enzyme de butyrylcholinestérase.

BHA : 3-tertiobutyl-4- hydroxyanisole.

BHE : La barrière hémato-encéphalique.

BHT : 3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène.

BSA : Albumine du sérum bovin.

BuCl : S-Butyryl-thiocholine iodide.

C : Concentration.

CAT : Capacité antioxydante totale.

CCM : chromatographie sur couche mince.

CF: facteur de correction (= 10).

ChEs : Les cholinestérasés.

CLSI: Clinical And Laboratory Standards Institute.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

CMI : la concentration minimale inhibitrice.

COP : composé organophosphoré.

CRAPC : Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques.

CRBT: Centre de Recherche en Biotechnologie.

CRP : C-reactive protein.

CUPRAC : Cupric Reducing Antioxidant Capacity.

CYP : L'enzyme cytochrome P.

d : doublet.

Da : Dalton.

d_e : distances externes

DFT : Density Functional Theory ou La théorie de la fonctionnelle de la densité électronique.

d_i : distances internes

DL: Drug-likeness.

DL50 : dose létale 50.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DMSO-d6 : dimethyl sulfoxide-d6.

d_{norm} : la distance des contacts normales

DO: Densité optique.

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil.

DS: Drug-Score.

DTNB : 5,5'-Disulfanediylbis(2-nitrobenzoic acid).

DZI : diamètre de la zone d'inhibition.

EI : Inhibiteur d'enzyme.

EPSP medjana : établissement public de santé de proximité de medjana.

ERN : les espèces réactives de l'azote.

ERO : les espèces réactives de l'oxygène.

EtOH : ethanol.

FMO : orbitales moléculaires frontières.

FRAP : Pouvoir Antioxydant Réducteur Ferrique (Ferric Reducing Antioxidant Power).

GALANT : galantamine.

GENT : Gentamycine.

GI : Absorption gastro-intestinale.

GOR: 4-[(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dien-1-ylidene)methyl]-2,6-di-tert-butylphenoxy (**Galvinoxyl**).

GPCRL : récepteur des ligands couplés à la protéine G.

GRH : globules rouges humains.

GSHPX : glutathion peroxydases.

H. pylori : la bactérie *de Helicobacter pylori*.

HAT : Hydrogen Atom Transfert.

HBA : Nombre d'accepteurs de liaison hydrogène.

HBD : Nombre de donneurs de liaisons hydrogène .

HMBC : Heteronuclear Multiple Bonds Correlation (corrélation ^1H - ^{13}C longue distance, deux ou trois liaisons).

HOMO : Highest Occupied Molecular Orbital (Orbitale Moléculaire Haute Occupée).

HS : surface de Hirshfeld

HSQC : Heteronuclear Simple Quantum Correlation (corrélation ^1H - ^{13}C simple liaisons).

Hz : Hertz.

I : Energie d'ionisation.

I : spectre d'intensité solaire.

IBUP : Ibuprofène.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50.

ICM : Modulateur de canal ionique.

IR : La spectroscopie infrarouge.

IRRI : Irritant.

J : constantes de couplage.

KI : Inhibiteur de l'enzyme Kinase.

LEMMC : le Laboratoire d'Electrochimie des Matériaux Moléculaires et Complexes.

Log P : Logarithme de la partition composée.

Log-*k_p* : Coefficient de perméabilité cutanée.

LUMO : Lowest Unoccupied Molecular Orbital (Orbitale Moléculaire Basse Occupée).

m : multiplet.

MeOH : méthanol.

MEP : Surfaces du potentiel électrostatique moléculaire.

MH : Gélose Mueller-Hinton.

MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium.

MUT : Mutgénique.

MV : Volume moléculaire.

MW : Poids moléculaire.

N.atom : le nombre d'atome.

NCCLS: National Commitee for Clinical Laboratory Standards.

nrot : Nombre de liaisons rotatives.

NV : Nombre de violation.

OMS : Organisation mondiale de la Santé.

PDB : La banque de données sur les protéines.

P-gp : P-glycoprotéine.

phenanthroline : Benzo[b][1,10]phenanthroline-7-ol.

PI : Inhibiteur des enzymes Protéases.

ppm : partie par million.

q : quadruplet.

QSAR: Quantitative structure – activity relationship.

R_f : Le rapport frontal.

r_{vdw}: les rayons de van der Waals

RM : éfractivité molaire.

RMN (1D et 2D) : Résonance Magnétique Nucléaire (mono- et bidimensionnelle).

RX : rayons X.

S : Douceur moléculaire.

s : singulet.

S : Solubility.

SD : Erreur standard (ou erreur type).

SET: le transfert d'un électron ou Single Electron Transfert.

SOD : superoxydes dismutases.

SPF : facteur de protection solaire ou (Sun Protection Factor).

t : triplet.

TEP : Triethylphosphyte.

T_f : Températures de fusion.

TMS : tétraméthylsilane.

TPSA : Superficie topologique de la surface polaire.

Tris-HCl : Tris-(hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride.

Trp: Tryptophane.

TUMO : tumorigenique.

Tween 40 : Monopalmitate de polyoxyéthylène sorbitane.

UV-Vis : La spectrophotométrie d'absorption ultra-violette visible.

VHB : le virus de l'hépatite B.

VIH : le virus de l'immunodéficience humaine.

Vol : Volume.

WLOGP : Logarithme de la partition composée calculé par la méthode atomistique cité par Wildman et Crippen.

δ : Les déplacements chimiques.

ΔE_{GAP} : Gap énergétique.

ΔG° : Energie libre de Gibbs.

η : Dureté moléculaire.

μ : Potentiel chimique électronique.

χ : Electronegativité.

ω : Indice d'électrophilie.

INTRODUCTION
GENERALE

Introduction générale

Le phosphore joue un rôle primordial dans la chimie du vivant en raison de son importance pour le biote. C'est un composant essentiel de l'ADN, de l'ATP et des phospholipides et représente environ 2 à 4 % du poids sec de la plupart des cellules [1]. Les phosphonates sont des molécules organiques contenant une liaison covalente entre le carbone et le phosphore [2].

En tant qu'analogues d'acides aminés naturels, les α -aminophosphonates constituent une classe importante de composés phosphonates ayant des activités biologiques diverses et susceptibles d'être employés comme inhibiteurs d'enzymes, antibiotiques et agents anticancéreux. Ils ont également un large éventail de propriétés antivirales et antifongiques et sont largement utilisés comme insecticides et herbicides [3–8].

Pour ces raisons, plusieurs approches ont été développées pour la synthèse des composés α -aminophosphonates depuis la première synthèse réalisée par Fields. Deux voies principales ont été adaptées et développées :

- La réaction à trois composants de Kabachnik-Fields, dans laquelle un carbonyle, une amine et un di- ou tri-alkylphosphite réagissent en un seul pot [9].
- La réaction de Pudovik, dans laquelle les dialkylphosphites sont ajoutés aux imines [10].

Dans certains rapports, ces réactions ont été réalisées dans des procédures simples effectuées en une seule étape, sans aucun catalyseur, alors que, dans la plupart des cas, elles sont réalisées en utilisant des catalyseurs, tels que l'acide tartrique [11], l'acide sulfamique [12], le polyborate sulfaté [13], l'acide sulfurique de silice [14], l'acide sulfurique de xanthane [15], HfCl_4 [16], $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_n$ [17], LnCl_3 [18], TiO_2 [19], ... etc.

Au cours des dernières années, des articles synthétiques intensifs ont été publiés sur la préparation des dérivés α -aminophosphonates, cependant, la synthèse par une réaction à trois composants en une seule étape (*one-pot*) d' α -aminophosphonates, reste la réaction favorite en raison de son parcours polyvalent et le haut rendement de cette méthode [20–22].

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans la plupart des problèmes de santé, tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (MA), l'athérosclérose, le diabète du type 2, les maladies

rhumatismales et le COVID-19 [23–29]. Ainsi, il est légitime de penser que si l'on supplémente la population en antioxydants, toutes ces pathologies pourraient tendre à disparaître. Les antioxydants ont fait l'objet d'une grande attention dans le traitement de plusieurs maladies.

L'activité antioxydante comprend l'inhibition de la peroxydation lipidique [30], la capacité de piégeage des radicaux libres [31], la capacité de chélation des ions métalliques et la capacité de réduction [32]. Il existe donc plusieurs méthodes pour évaluer l'activité antioxydante des composés. Ces techniques impliquent différents mécanismes pour déterminer l'activité antioxydante. La recherche et le développement d'agents thérapeutiques efficaces antioxydants, anti-Alzheimers, antidiabétiques, anti-inflammatoires et antibiotiques, est actuellement l'une des tâches les plus urgentes et les plus recherchées en chimie médicinale.

Ce travail de thèse a été effectué dans la continuité des travaux précédents de notre équipe de recherche, du laboratoire LEMMC sur la synthèse de nouvelles dérivées phosphonates et l'étude de leurs activités biologiques, leurs propriétés complexantes et leurs applications dans la lutte contre la corrosion [5,33–43]. A cet effet et pour contribuer à l'enrichissement de la catégorie des molécules à visée multidisciplinaires, la découverte d'une nouvelle famille de molécules actives et de l'exploration du potentiel de cette famille, on a visé dans ce travail, la synthèse de certains membres de cette catégorie de composés organophosphorés. Pour se faire et vu l'importance des phénols et leurs analogues, notamment les aminophénols d'une part et des dérivés du type α -aminophosphonates d'autre part, nous avons synthétisé trois esters acides α -aminophosphonates à base d'amines phénoliques, puis on a effectué des applications biologiques différentes sur leurs aspects pharmacologiques principaux. Cette classe de composés peut être perçue comme une combinaison entre les phénols et les α -hydroxyaminophosphonates.

Le manuscrit est subdivisé en cinq chapitres :

- Dans le premier chapitre, nous avons présenté des notions générales sur les phosphonates, leurs dérivées, leurs méthodes de synthèse et une brève revue bibliographique sur les applications réalisées : activités antioxydants, anti-enzymatiques, anti-inflammatoires et antibiotiques...etc.

- Le second chapitre décrit les procédés expérimentaux appliqués dans la synthèse et les méthodes physicochimiques et d'analyses structurales exploitées dans la caractérisation des molécules synthétisées, ainsi que, les principes de différentes méthodes d'analyse utilisées pour évaluer *in vitro*, l'activité antioxydante, anti Alzheimer, antidiabétique, antiulcéreuse, protection contre les rayons solaires, antiinflammatoire, la cytotoxicité par le test d'hémolyse et l'activité antimicrobienne des molécules ciblées.

- Le troisième chapitre regroupe les résultats de la synthèse et la caractérisation des α -aminophosphonates, préparés selon la réaction de *Kabachnik-Fields*.

- Dans le quatrième chapitre nous avons exposé les résultats et la discussion de l'étude des propriétés bioactives des molécules synthétisées.

- Le cinquième chapitre, regroupe les résultats de modélisation moléculaire par trois méthodes: La méthode de mécanique quantique, la DFT, pour déterminer certaines propriétés moléculaires importantes comme les propriétés électroniques, la stabilité et la réactivité, qui sont liées à la structure moléculaire; Nous avons utilisé également la modélisation semi-empirique QSAR [(Quantitative) Structure Activity Relationship] pour la prédiction des effets d'une variation de la structure moléculaire sur l'activité biologique; Et enfin on a utilisé la modélisation empirique par la méthode d'arrimage moléculaire "docking" afin d'estimer l'affinité entre (l'ACHé, BChE et l'alpha-amylase) et les molécules testées et pour analyser les interactions intermoléculaires impliquées.

On terminera ce travail de thèse par une conclusion générale donnant un récapitulatif sur les principaux résultats obtenus au cours de ce travail, ainsi que les perspectives qui feront l'objectif d'ultérieurs travaux.

Références bibliographiques

- [1] D.M. Karl, Phosphorus, the staff of life, *Nature*. 406 (2000) 31–33.
- [2] P. Savignac, B. Iorga, *Modern phosphonate chemistry*, CRC press, 2003.
- [3] P. Kafarski, B. Lejczak, *Aminophosphonic Acids of Potential Medical Importance*, *CMCACA*. 1 (2001) 301–312. <https://doi.org/10.2174/1568011013354543>.
- [4] P. Kafarski, B. Lejczak, Biological activity of aminophosphonic acids, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 63 (1991) 193–215.
- [5] R. Damiche, S. Chafaa, Synthesis of new bioactive aminophosphonates and study of their antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities as well the assessment of their toxicological activity, *Journal of Molecular Structure*. 1130 (2017) 1009–1017.
- [6] H.H. Amer, S.H. Alotaibi, A.H. Trawneh, A.M. Metwaly, I.H. Eissa, Anticancer activity, spectroscopic and molecular docking of some new synthesized sugar hydrazones, Arylidene and α -Aminophosphonate derivatives, *Arabian Journal of Chemistry*. 14 (2021) 103348.
- [7] S. Chortani, M. Horchani, M. Znati, N. Issaoui, H.B. Jannet, A. Romdhane, Design and synthesis of new benzopyrimidinone derivatives: α -amylase inhibitory activity, molecular docking and DFT studies, *Journal of Molecular Structure*. 1230 (2021) 129920.
- [8] I. Romero-Estudillo, J.L. Viveros-Ceballos, O. Cazares-Carreño, A. González-Morales, B.F. de Jesús, M. López-Castillo, R.S. Razo-Hernández, G. Castañeda-Corral, M. Ordóñez, Synthesis of new α -aminophosphonates: Evaluation as anti-inflammatory agents and QSAR studies, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 27 (2019) 2376–2386.
- [9] M.I. Kabachnik, T.Y. Medved, New synthesis of aminophosphonic acids, in: *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1952: pp. 689–692.
- [10] A.N. Pudovik, I.V. Konovalova, Addition Reactions of Esters of Phosphorus(III) Acids with Unsaturated Systems, *Synthesis*. 1979 (1979) 81–96. <https://doi.org/10.1055/s-1979-28566>.
- [11] N. Gangwar, V.K. Kasana, Tartaric acid-catalyzed synthesis of α -aminophosphonates under solvent-free conditions, *Synthetic Communications*. 41 (2011) 2800–2804.
- [12] S.D. Mitragotri, D.M. Pore, U.V. Desai, P.P. Wadgaonkar, Sulfamic acid: An efficient and cost-effective solid acid catalyst for the synthesis of α -aminophosphonates at ambient temperature, *Catalysis Communications*. 9 (2008) 1822–1826.

- [13] C.K. Khatri, V.B. Satalkar, G.U. Chaturbhuj, Sulfated polyborate catalyzed Kabachnik-Fields reaction: An efficient and eco-friendly protocol for synthesis of α -amino phosphonates, *Tetrahedron Letters*. 58 (2017) 694–698.
- [14] M.T. Maghsoodlou, S.M.H. Khorassani, N. Hazeri, M. Rostamizadeh, S.S. Sajadikhah, Z. Shahkarami, N. Maleki, An efficient synthesis of α -Amino phosphonates using silica sulfuric acid as a heterogeneous catalyst, *Heteroatom Chemistry: An International Journal of Main Group Elements*. 20 (2009) 316–318.
- [15] G.-Y. Sun, J.-T. Hou, J.-J. Dou, J. Lu, Y.-J. Hou, T. Xue, Z.-H. Zhang, Xanthan Sulfuric Acid as an Efficient Biodegradable and Recyclable Catalyst for the One-Pot Synthesis of α -Amino Phosphonates, *Journal of the Chinese Chemical Society*. 57 (2010) 1315–1320.
- [16] G. Sravya, A. Balakrishna, G.V. Zyryanov, G. Mohan, C.S. Reddy, N. Bakthavatchala Reddy, Synthesis of α -aminophosphonates by the Kabachnik-Fields reaction, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 196 (2020) 353–381.
- [17] J. Wu, W. Sun, H.-G. Xia, X. Sun, A facile and highly efficient route to α -amino phosphonates via three-component reactions catalyzed by Mg(ClO₄)₂ or molecular iodine, *Organic & Biomolecular Chemistry*. 4 (2006) 1663–1666.
- [18] F. Xu, Y. Luo, J. Wu, Q. Shen, H. Chen, Facile one-pot synthesis of α -amino phosphonates using lanthanide chloride as catalyst, *Heteroatom Chemistry: An International Journal of Main Group Elements*. 17 (2006) 389–392.
- [19] M. Hosseini-Sarvari, TiO₂ as a new and reusable catalyst for one-pot three-component syntheses of α -aminophosphonates in solvent-free conditions, *Tetrahedron*. 64 (2008) 5459–5466.
- [20] Y. Dai, L. Zheng, D. Chakraborty, B. Borhan, W.D. Wulff, Zirconium-catalyzed asymmetric Kabachnik–Fields reactions of aromatic and aliphatic aldehydes, *Chemical Science*. 12 (2021) 12333–12345.
- [21] N. Ravi, M. Venkatanarayana, H. Sharathbabu, K.R. Babu, Synthesis of novel α -aminophosphonates by methanesulfonic acid catalyzed Kabachnik–Fields reaction, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 196 (2021) 1018–1024.
- [22] J. Ma, J. Li, P. Guo, X. Liao, H. Cheng, Synthesis and antitumor activity of novel indole derivatives containing α -aminophosphonate moieties, *Arabian Journal of Chemistry*. 14 (2021) 103256. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103256>.
- [23] J. Wu, Tackle the free radicals damage in COVID-19, *Nitric Oxide*. 102 (2020) 39–41.

- [24] S. Di Meo, P. Venditti, Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020 (2020).
- [25] F. Zargari, The role of oxidative stress and free radicals in diseases, *Iran Uni Med Sci*. 27 (2020) 10–22.
- [26] X.-Q. Wang, W. Wang, M. Peng, X.-Z. Zhang, Free radicals for cancer theranostics, *Biomaterials*. 266 (2021) 120474.
- [27] T.D. Presley, Free radicals, (n.d.).
- [28] J. Moskovitz, M.B. Yim, P.B. Chock, Free radicals and disease, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 397 (2002) 354–359.
- [29] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39 (2007) 44–84.
- [30] A.M. Nuutila, R. Puupponen-Pimiä, M. Aarni, K.-M. Oksman-Caldentey, Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity, *Food Chemistry*. 81 (2003) 485–493.
- [31] H.-Y. Chen, G.-C. Yen, Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves, *Food Chemistry*. 101 (2007) 686–694.
- [32] L.L. Canabady-Rochelle, C. Harscoat-Schiavo, V. Kessler, A. Aymes, F. Fournier, J.-M. Girardet, Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods, *Food Chemistry*. 183 (2015) 129–135.
- [33] A. Hellal, D. Rachida, S. Zaout, M. Elkolli, S. Chafaa, L. Touafri, N. Chafai, M. Mehri, K. Benbougerra, Structural, electronic, vibrational, optical and thermodynamic properties of 3-Oxo-3-p-tolylpropylphosphonic acid and 4-Oxo-4-p-tolyl-butyric acid: Density functional theory study, *Journal of Molecular Structure*. 1171 (2018) 527–540.
- [34] M. Mehri, N. Chafai, L. Ouksel, K. Benbougerra, A. Hellal, S. Chafaa, Synthesis, electrochemical and classical evaluation of the antioxidant activity of three α -aminophosphonic acids: Experimental and theoretical investigation, *Journal of Molecular Structure*. 1171 (2018) 179–189.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.05.074>.
- [35] L. Ouksel, R. Bourzami, S. Chafaa, N. Chafai, Solvent and catalyst-free synthesis, corrosion protection, thermodynamic, MDS and DFT calculation of two environmentally friendly inhibitors: Bis-phosphonic acids, *Journal of Molecular Structure*. 1222 (2020) 128813. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128813>.

- [36] K. Benbouguerra, N. Chafai, S. Chafaa, Y.I. Touahria, H. Tlidjane, New α -Hydrazinophosphonic acid: Synthesis, characterization, DFT study and in silico prediction of its potential inhibition of SARS-CoV-2 main protease, *Journal of Molecular Structure*. 1239 (2021) 130480.
- [37] K. Benbouguerra, S. Chafaa, N. Chafai, M. Mehri, O. Moumeni, A. Hellal, Synthesis, spectroscopic characterization and a comparative study of the corrosion inhibitive efficiency of an α -aminophosphonate and Schiff base derivatives: Experimental and theoretical investigations, *Journal of Molecular Structure*. 1157 (2018) 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.12.049>.
- [38] N. Chafai, S. Chafaa, K. Benbouguerra, D. Daoud, A. Hellal, M. Mehri, Synthesis, characterization and the inhibition activity of a new α -aminophosphonic derivative on the corrosion of XC48 carbon steel in 0.5M H₂SO₄: Experimental and theoretical studies, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 70 (2017) 331–344. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.10.026>.
- [39] M. Djenane, S. Chafaa, N. Chafai, R. Kerkour, A. Hellal, Synthesis, spectral properties and corrosion inhibition efficiency of new ethyl hydrogen [(methoxyphenyl) (methylamino) methyl] phosphonate derivatives: Experimental and theoretical investigation, *Journal of Molecular Structure*. 1175 (2019) 398–413. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.07.087>.
- [40] S. Chafaa, J. Meullemeestre, M.-J. Schwing, F. Vierling, V. Böhmer, W. Vogt, (*o*-Hydroxyphenyl)methylphosphonic Acids: Spectrophotometric determination of their pK_a values and of the deprotonation sequence, *HCA*. 76 (1993) 1425–1434. <https://doi.org/10.1002/hlca.19930760403>.
- [41] O. Moumeni, S. Chafaa, R. Kerkour, K. Benbouguerra, N. Chafai, Synthesis, structural and anticorrosion properties of diethyl (phenylamino) methyl phosphonate derivatives: Experimental and theoretical study, *Journal of Molecular Structure*. 1206 (2020) 127693.
- [42] H.A. Youcef, S. Chafaa, R. Doufnoune, T. Douadi, Synthesis, characterization and thermal behavior of tetrakis (melamine²⁺) bis (melamine⁺) pentakis (monohydrogenphosphate) tetrahydrate, *Journal of Molecular Structure*. 1123 (2016) 138–143.
- [43] H. Tlidjane, N. Chafai, S. Chafaa, C. Bensouici, K. Benbouguerra, New Thiophene-Derived α -aminophosphonic acids: Synthesis under microwave irradiations, antioxidant

and antifungal activities, DFT investigations and SARS-CoV-2 main protease inhibition, Journal of Molecular Structure. (2021) 131853.

CHAPITRE I

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUES.

I.1 Introduction

La chimie du phosphore est une science très ancienne et prolifique vu les diverses propriétés de cet élément. Sa technologie et ses applications scientifiques sont nombreuses, elles ont pris un grand essor ces dernières années [1]. Le phosphore se présente sous plusieurs formes de couleurs différentes : blanc-jaune, rouge et violet-noir, il est absent à l'état naturel sous sa forme élémentaire, il est omniprésent en tant que constituant moléculaire [2].

Le phosphore peut former des liaisons avec de nombreux autres éléments. Il peut également former des liaisons avec un nombre d'atomes (Nombre de coordinations) qui peut varier de 1 à 6 et plus. Il joue un rôle de tout premier plan dans la chimie du vivant, entrant aussi bien dans la composition des lipides, d'acides nucléiques ou des tissus osseux. Le phosphore est un élément structural essentiel de l'ADN et de l'ARN, autrement-dit c'est un élément intégral des acides nucléiques, des nucléotides, des phospholipides, et de plusieurs protéines. Il peut intervenir presque dans toutes les réactions chimiques cellulaires et participe aussi à l'absorption et la transformation de certains nutriments [2,3].

Les dérivés phosphorés, notamment les composés organophosphorés, s'avèrent très précieux pour la synthèse organique. Ils offrent aux chimistes synthétistes de nombreux outils permettant la réalisation de couplages, de transformation de fonctions, de cyclisation, étapes primordiales pour l'élaboration des molécules cibles. Ils sont aussi utilisés comme huiles additives, insecticides [4], agents plastifiants [5], additifs dans les carburants [6], antioxydants [7], agents ignifuges [8], surfactants [9], antiviraux [10,11], agents complexant ou extractant [12,13],... etc, également, la médecine et la pharmacochimie ont largement intégré ces familles de composés [14].

Les sociétés « *American Chemical Society* » et « *Royal Chemical Society of London* » ont publié un système de nomenclature largement adopté où ils considèrent les composés organophosphorés comme des dérivés des hydrures, des oxyacides et des oxydes du phosphore. Les composés servant à cette nomenclature sont les acides correspondants (schéma I 1). Tandis que les composés, ayant des liaisons carbone-phosphore, sont considérés comme des produits de substitution résultants du remplacement de l'atome d'hydrogène d'une liaison H-P par un groupement alkyle ou aryle (schéma I 1). Les composés organophosphorés se répartissent en différentes classes selon le degré d'oxydation du phosphore et la nature des substituants [15].

Le schéma I 1 représente les structures des composés du phosphore tri coordonnés et tétra coordonnés liés aux oxyacides avec leurs noms généraux. Ils sont organisés en fonction de l'état d'oxydation et du nombre de liaisons de type carbone – phosphore [15,16].

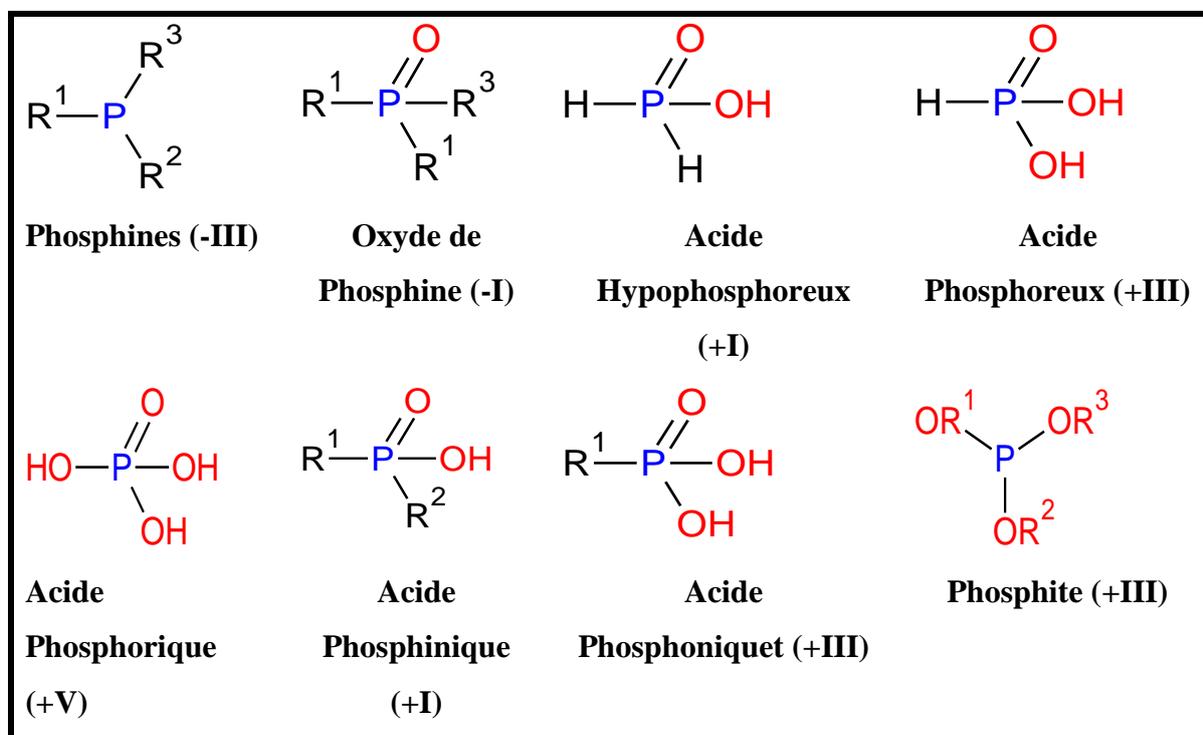
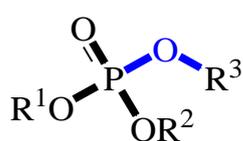


Schéma I 1 : Les différentes classes des composés organophosphorés

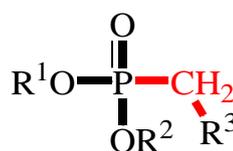
I.2 Les phosponates

I.2.1 Définition

Les phosponates représentent une classe importante de composés organophosphorés, ils sont des molécules comprenant un atome de phosphore tétracoordiné, possédant une liaison carbone-phosphore (schéma I 2).



phosphate



phosponate

Schéma I 2 : Comparaison phosphate-phosponate

Ce sont des analogues aux phosphates naturels (phosphates glycosidiques, nucléotidiques, phospholipides, phosphates produits par la glycolyse), ils ont des propriétés chimiques et biologiques différentes [14]. Dans ces composés la liaison P-O est remplacée par une liaison P-C plus stable, ce qui empêche leur hydrolyse par les phosphatases.

Ils sont d'excellents intermédiaires en chimie organique puisqu'ils permettent la création de liaisons carbone-carbone de manière efficace. L'utilisation des phosphonates dans une variété d'applications est un axe de recherche important comme en témoignent les nombreuses publications qui paraissent chaque année.

I.2.2 Utilisations des phosphonates

Les champs d'applications des phosphates, phosphonates, phosphinates et autres phosphines, sont extrêmement nombreux et touchent pratiquement l'ensemble des aspects de la vie de tous les jours. Leur activité serait reliée à la nature relativement inerte du lien C-P mais aussi aux similitudes physiques entre les groupements acides phosphoniques, les phosphates et les acides carboxyliques. D'autre part, les applications dans lesquelles les phosphonates synthétisés ont été utilisés sont innombrables. Nous présentons quelques domaines d'application ainsi que les travaux antérieurs cités dans la littérature.

I.2.2.1 La corrosion

Les phosphonates jouent un rôle important en tant qu'inhibiteurs de corrosion dans les systèmes de refroidissement d'eau [17,18]. L'utilisation de phosphonate pour la protection de l'acier au carbone contre la corrosion dans différents milieux a été signalée par diverses recherches[19–23].

N. Chafai et al [24] ont étudié l'inhibition de la corrosion de l'acier XC48 dans l'acide sulfurique 0.5M par L'acide 4-(2-[[ethoxy (hydroxy) phosphonyl] (3-nitrophenyl) methyl] hydrazinyl) benzoïque AEHPNMHB (schéma I 3(a)).

K. Benbouguerra et al [25], ont synthétisé de nouveaux composés α -aminophosphonates dérivés des bases de Schiff, ensuite ils ont mis en évidence l'efficacité inhibitrice de la corrosion d'un ester α -aminophosphonates correspondant à savoir, le diéthyle(4-(diméthyl amino) phényl) (phénylamino) méthyl) phosphonate, vis à vis de l'acier au carbone XC48 en milieu H_2SO_4 0.5 M (schéma I 3(b)).

L. Ouksel *et al* [26] ont synthétisé deux familles d' α -hydroxyphosphonates ainsi que leurs acides correspondants, ensuite, ils ont étudié ces molécules tant qu'inhibiteur de la corrosion vis à vis de l'acier XC48 dans une solution agressive d'HCl (schéma I 3(c,d))

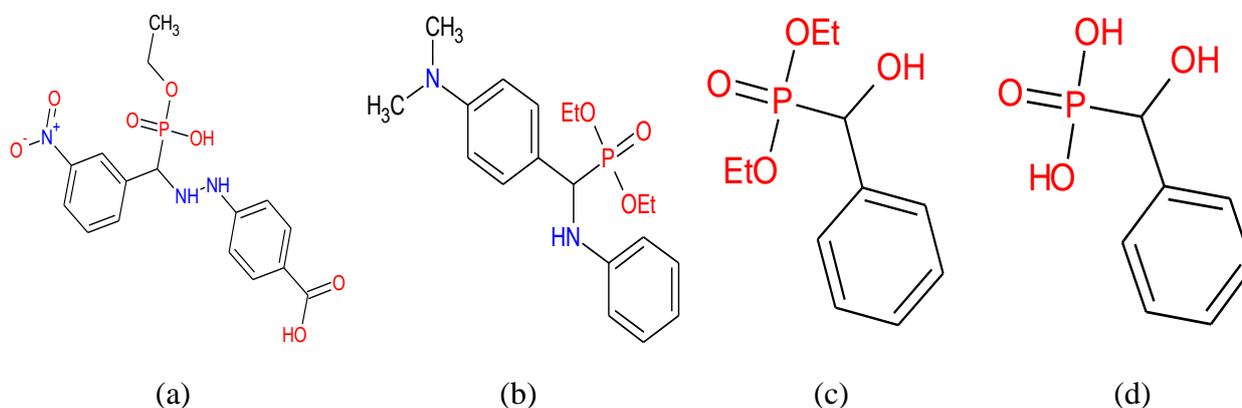


Schéma I 3 : certains exemples des inhibiteurs de la corrosion contenant le motif phosphonate

I.2.2.2 Protection de l'environnement

Les acides phosphoniques sont largement utilisés dans le domaine du traitement des eaux et pour réduire les risques de corrosion des canalisations, contrôler la teneur en plomb dans l'eau de distribution, prévenir le dépôt de calcaire, contrôler le pH de l'eau ou encore contrôler les phénomènes d'eaux rouges et d'eaux noires. Dans ce contexte plusieurs études dans la littérature ont été effectuées afin de déterminer leurs impacts dans ces domaines [27–29].

S. Chafaa *et al* [30], ont étudié le pouvoir chélatant de certains ligands dérivés de phosphonates à base du phénol substitué vis-à-vis de quelques métaux de transition et alcalinoterreux, en utilisant les techniques potentiométriques et spectroscopiques UV-vis. Ils ont déterminé que les ligands étudiés forment des complexes très stables avec les métaux utilisés.

N. Aliouane *et al* [31], ont synthétisés en premier lieu de nouvelles molécules des phosphonates avec un nombre de groupement phosphonates variant de un à quatre groupements selon la réaction de Michaelis-arbuzov, en second lieu ils ont étudiés les propriétés de complexation de ces molécules vis-à-vis des ions (Fe^{3+} , Cu^{2+}).

I.2.2.3 Activités biochimiques et pharmacologiques

Les phosphonates ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique et le nombre d'études concernant leurs synthèses ou leurs activités biologiques ne cessent de croître. La raison d'un tel engouement provient principalement à leur faible toxicité pour les mammifères[32], la grande stabilité de la liaison P-C devrait bloquer tous processus naturels importants impliquant l'hydrolyse d'un groupe ester de phosphate [33].

Dans la suite, on cite quelques travaux concernant l'application de ces composés dans la biologie.

I.2.2.3.1 Les propriétés antivirales

Les composés de phosphore peuvent avoir une activité antivirale, par exemple le ($\{[(2S)\text{-}1\text{-}(6\text{-amino}\text{-}9H\text{-purin}\text{-}9\text{-yl})\text{propan}\text{-}2\text{-yl}]\text{oxy}\}$ methyl)phosphonic acid ou *Ténofovir* est utilisé comme traitement contre le VIH chez les humains, il est aussi efficace dans le traitement de l'hépatite B (VHB) [34]. Le *Cidofovir* ou ($\{[(2S)\text{-}1\text{-}(4\text{-amino}\text{-}2\text{-oxopyrimidin}\text{-}1(2H)\text{-yl})\text{-}3\text{-hydroxypropan}\text{-}2\text{-yl}]\text{oxy}\}$ methyl)phosphonic acid est un médicament antiviral, fait partie aussi de la famille des phosphonates nucléotidiques, analogue de la cytosine. Il inhibe la réplication virale en bloquant la synthèse de l'ADN par l'ADN polymérase virale. tandis que L'*Adéfovir* ($\{[2\text{-}(6\text{-amino}\text{-}9H\text{-purin}\text{-}9\text{-yl})\text{ethoxy}]\text{methyl}\}$ phosphonic acid), est un inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse qui a montré une activité antirétrovirale contre les virus, y compris le virus de l'herpès et l'hépatites C [35].

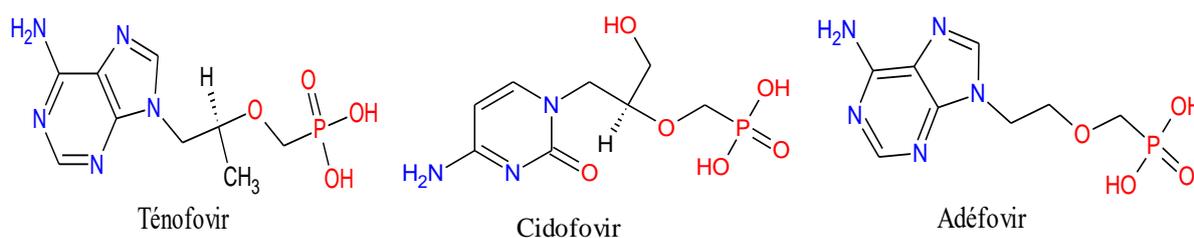


Schéma I 4 : Dérivés des phosphonates utilisés en clinique comme des agents antiviraux

I.2.2.3.2 Activités anticancéreuses

Une activité anticancéreuse de haut niveau a été trouvée dans un grand nombre de composés du phosphore de structure très différente [36–38], Parmi les nombreux exemples présents dans la littérature, *Xiao-Chao Huang et al* [39], ont développé la synthèse d'une

nouvelle série des dérivés *thiourée α -aminophosphonate* et les testés comme des agents antitumoraux. Leurs activités inhibitrices contre les lignées cellulaires cancéreuses humaines NCI-H460 (poumon), A549 (adénocarcinome pulmonaire), HepG2 (foie) et SKOV3 (ovaire) ont été évaluées en utilisant le test MTT in vitro. Les résultats du criblage ont révélé que de nombreux composés présentaient des niveaux modérés à élevés d'activités antitumorales contre les lignées cellulaires cancéreuses testées et que la plupart présentaient des activités inhibitrices plus puissantes que le médicament anticancéreux commercial 5-fluorouracil (schéma I 5).

Cela montre que les α -aminophosphonates avec un atome de fluor ou un groupe nitro lié à un cycle benzylique présentent des activités élevées par rapport aux autres dérivés.

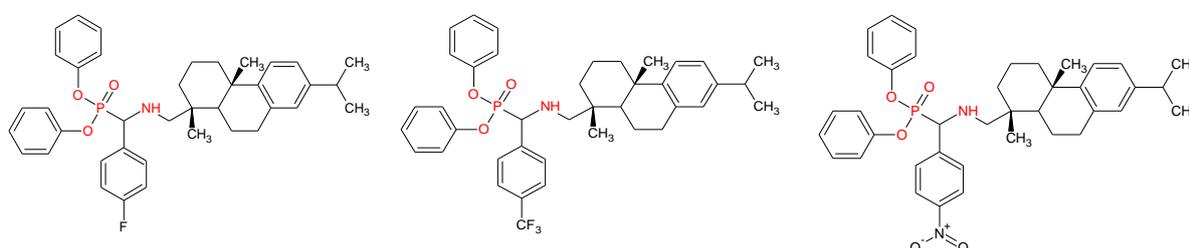


Schéma I 5 : Des dérivés thiourée α -aminophosphonate à activité anticancéreuse

I.2.2.3.3 Médicaments d'antiresorption osseuse

Les bisphosphonates inhibent la résorption osseuse spontanée ou induite par la parathormone ou d'autres peptides d'origine tumorale. Grâce à cette propriété, les bisphosphonates sont utilisés pour traiter les maladies dans lesquelles il existe une résorption osseuse excessive conduisant d'une part à des hypercalcémies et d'autre part à des atteintes osseuses à l'origine de douleurs et de fractures [40].

En outre, ils servent de transporteurs pour les radionucléides dans les traitements de cancer des os (samarium-153-éthylène diamine tétraméthylène phosphonate) [41]. Les bisphosphonates contenant de l'azote comme pamidronate commercialisés sous le nom de (*Aredia*), aledronate (*Fosamax*), risendronate (*Actonel*), et zolendronate (*Zometa*), présentés par le schéma I 16, représente une classe importante des drogues actuellement employées pour traiter l'*ostéoporose*, la maladie de *Paget* et l'*hypercalcémie* [42].

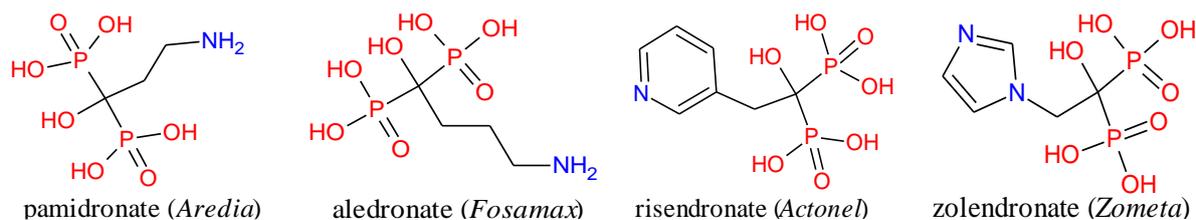


Schéma I 6 : Structures de certains exemples des médicaments à base des phosphonates utilisés dans le traitement du cancer des os

I.2.2.3.4 Activité anti-inflammatoires

De nombreux travaux semblent indiquer que les phosphonates possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire [43].

Les phosphonates sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T, *Mookerjee et al* [44] et *Namgoong et al* [45] ont montré que l'effet antiprolifératif pourrait s'expliquer par la capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase).

Les composés phosphorés contenant des hétérocycles tel que : les *oxaphospholes*, l'*oxaphosphinine* et le *vinylloxaphosphinine* phosphonate ont été décrits comme des anti-inflammatoires [46].

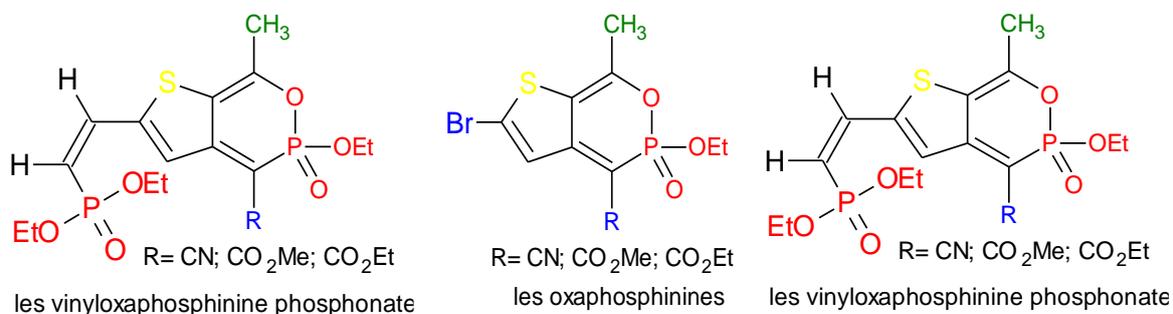


Schéma I 7 : Structures chimiques des anti-inflammatoires contenant le motif phosphonate

I.2.2.3.5 Substances antibiotiques

La fosfomycine ou l'acide [(2*R*,3*S*)-3-méthylloxiran-2-yl]phosphonique (schéma I 8) c'est un acide phosphorique qui a des propriétés d'un antibiotique a été isolé à partir d'un bouillon de fermentation de la bactérie *Streptomyces fradiae* en 1969. *La Fosfomycine* est active contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives, en détruisant la bactérie par inhibition de la première étape de la synthèse de la paroi cellulaire (inhibition de la pyruvile

transférase)[46]. De plus, l'*Alaphosphin* ou l'acid [(1R)-1-{[(2S)-2-aminopropanoyl] amino}ethyl] phosphonic, (schéma I 8) est un antibiotique qui bloque la formation de la paroi bactérienne par inhibition de l'alanine-racémate.

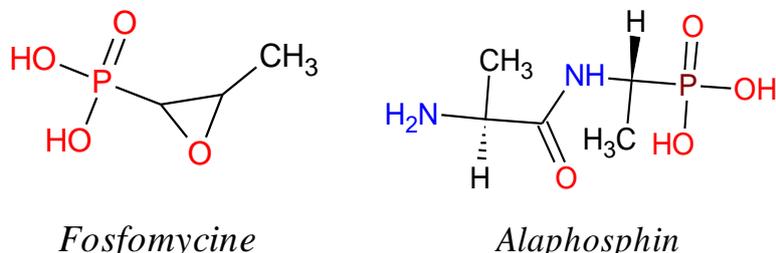


Schéma I 8 : Exemples de médicaments acides phosphoniques utilisés comme antibiotiques

I.2.3 Classification des phosphonates

Selon leurs intérêts et leurs importances dans l'industrie et dans la vie quotidienne les principales catégories des phosphonates sont :

- Les α -aminophosphonates
- Les biphosphonates
- Les nucléosides phosphonates
- Les α -hydroxyphosphonates
- Les alkyles-phosphonates et les aryles-phosphonates
- Les polyphosphonates

En raison des caractéristiques mentionnées précédemment, la synthèse des esters α -aminophosphonates et leur acides α -aminophosphoniques sont d'une importance considérable. Nos travaux de recherche qui seront présentés par la suite ont comme objectif ultime le développement de procédés de synthèse de nouvelles dérivées α -aminophosphonates et l'étude de leurs activités biologiques.

I.2.4 Méthodes d'accès aux composés contenant le motif phosphonate

I.2.4.1 Réactions pour l'obtention des esters α -aminophosphonates

Les acides α -aminophosphonates sont l'une des familles de composés organophosphorés les plus importantes dans la synthèse organique. On retrouve ces composés dans divers domaines tels que l'agriculture [47,48], et la médecine [49].

La chimie des α -aminophosphonates enrichie également la recherche pharmacologique et trouve de nombreuses applications dans la synthèse des molécules bioactives[50,51]. Ils sont considérés comme une classe importante de composés phosphorylés, car ils présentent plusieurs activités biologiques intéressantes, certains d'entre elles présentent des activités anti tumorales [52–54], antibactérienne [55], et antioxydants [7].

Généralement, la préparation des α -aminophosphonates repose sur deux méthodes principales [56,57] : la réaction de *Kabachnik-Fields* [58,59], dans laquelle une condensation à trois composants d'un composé carbonyle, d'une amine et d'un phosphite de di/tri-alkyle a lieu dans un seul pot ; la réaction de *Pudovik* [60], où un phosphite de dialkyle est ajouté à une imine.

D'autres nouvelles méthodes telles que l'amination C-H d'alkylphosphonates [61] ou l'insertion de carbène catalysée par Cu(I) [62] ont été développées plus récemment. Cependant, parmi les méthodes rapportées, la réaction de *Kabachnik-Fields* est évidemment la plus simple et la plus efficace pour préparer des α -aminophosphonates, grâce à la disponibilité aisée des matériaux de départ et également à son fonctionnement simple.

I.2.4.1.1 Réaction de Kabachnik-Fields (phospha-Mannich)

De nombreuses stratégies ont été développées pour synthétiser des α -aminophosphonates de différentes natures [33]. La réaction de *Kabachnik-Fields* (phospha-Mannich), découverte en 1952, est l'une des méthodes les plus intéressantes pour la synthèse des phosphonates, notamment les α -aminophosphonates. C'est une réaction à trois composants s'effectuant en 'one pot' Elle consiste à réagir en une seule fois une amine, un dérivé carbonylé et un dialkylphosphite, cette réaction peut être conduite en présence ou en absence de solvant et de catalyseur [63] (schéma I 9). Cependant, dans la plupart des cas, l'usage d'acides comme des bases permet d'améliorer les conditions de la réaction. De nombreux acides ont été utilisés, comme le triflate d'aluminium [64] ou de magnésium [65], le trichlorure d'indium [66], le sulfate de magnésium [67], la silice [68]. Outre les catalyseurs acides de *Lewis*, certains acides de *Brønsted* [69], en particulier les catalyseurs acides de *Bronsted* hétérogènes tels que les acides sulfoniques supportés, sont également utilisés pour favoriser cette réaction. Dans certains cas, la réaction *Kabachnik-Fields* est réalisée sans catalyseur [70], ou par la catalyse enzymatique [71]. La réaction peut être effectuée dans des liquides ioniques [72] et même dans de l'eau au lieu de solvants organiques conventionnels, ainsi que dans des conditions sans

solvant [70]. En outre, l'irradiation par micro-ondes et les ultrasons ont été appliquées à la réaction de *Kabachnik-Fields* [73,74].

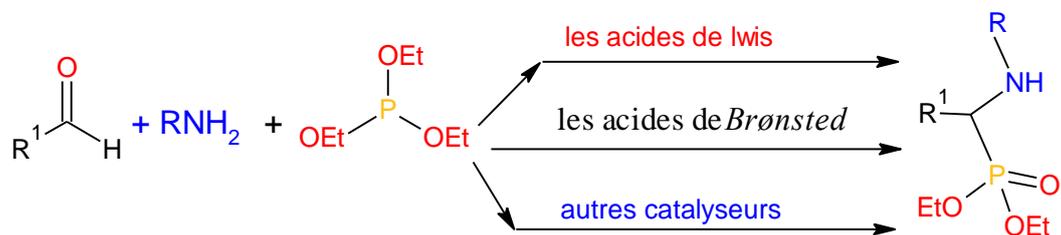


Schéma I 9 : Méthodes typiques développées pour la réaction de *Kabachnik-Fields*

Bien que plusieurs mécanismes aient été proposés, le mécanisme réactionnel de la réaction de *Kabachnik-Fields* n'est, à l'heure actuelle, pas complètement élucidé [57,58]. Il semble que le mécanisme dépend de la nature des réactifs [75].

Étant donné que les amines et les phosphites de dialcyle peuvent agir en tant que nucléophiles et subir des ajouts compétitifs aux composés carbonylés, la réaction de *Kabachnik-Fields* à 3 composants peut suivre deux voies (schéma I 10) :

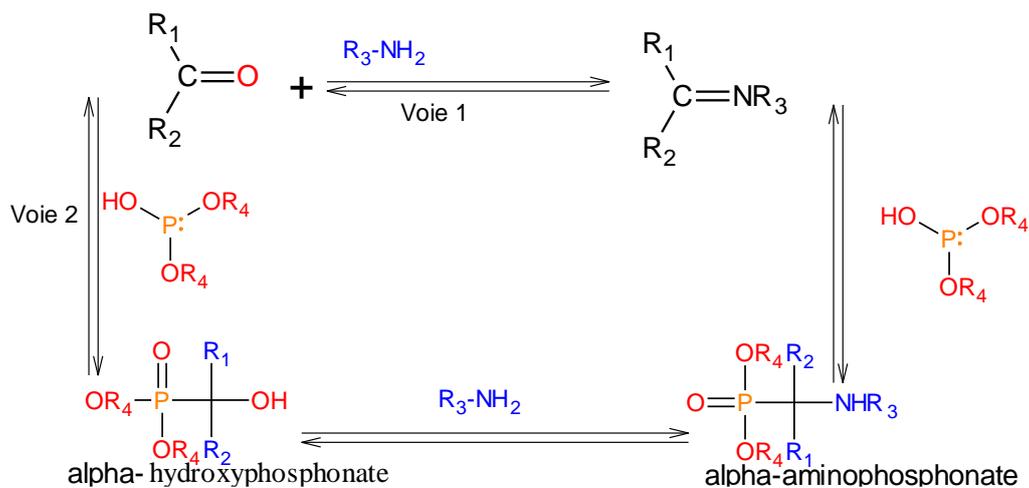


Schéma I 10 : Mécanisme proposé pour la réaction de *Kabachnik-Fields* [76]

La première voie possible est la voie de l'imine, où une imine est formée par la condensation d'un composé carbonyle et d'une amine, suivie de l'ajout du phosphite à la liaison C=N (comme dans la réaction de *Pudovik*) pour fournir le α -aminophosphonate (schéma I. 11).

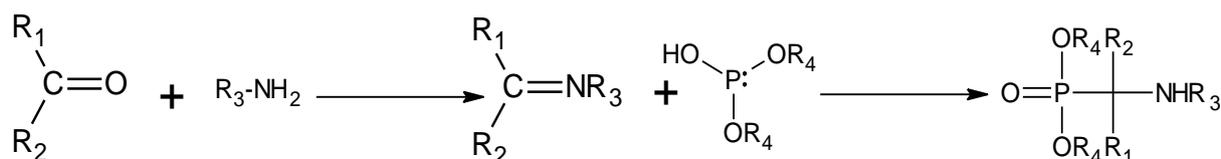


Schéma I 11 : La première voie (la voie de l'imine) pour la synthèse des α -aminophosphonates par la réaction de kabachnik-fielde

L'autre possibilité impliquerait un intermédiaire α -hydroxyphosphonate. Un phosphite de dialcyle réagirait avec le composé carbonyle pour donner un α -hydroxyphosphonate (la réaction d'*Abramov*), suivi d'une substitution du groupe hydroxyle du α -hydroxyphosphonate par une amine pour fournir le α -aminophosphonate (schéma I 12) [76].

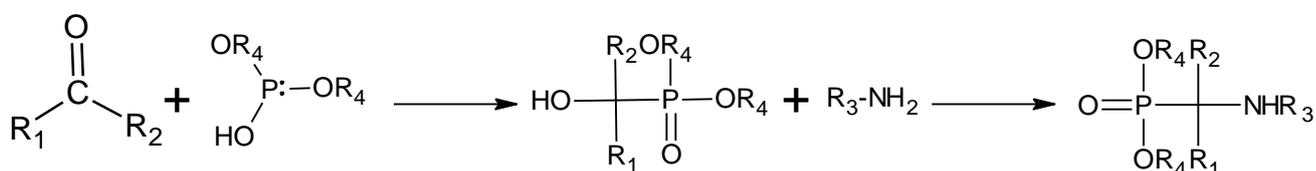


Schéma I 12 : La deuxième voie (la voie intermédiaire α -hydroxyphosphonate) pour la synthèse des α -aminophosphonates par la réaction de kabachnik-fielde

I.2.4.1.2 La réaction de Pudovik –Kabachnik

L'addition catalysée ou non-catalysée d'un composé α -hydrophosphorylé sur une imine est en fait une réaction de *Pudovik* [63]. Beaucoup d'acides α -aminophosphoniques ont été obtenus par l'addition du diéthyle phosphite sur une imine portant un groupement benzyle qui pourra être clivé par la suite par une réaction d'hydrogénation. Cette réaction est peut-être catalysée par diverses bases [77,78], ou divers acides de *Lewis* comme le chlorure de diméthylaluminium [79], le tri-fluorure de bore [80], le tétrachlorure d'étain [81], ou juste en chauffant. Beaucoup d'exemples de cette réaction sont décrits dans la littérature et plusieurs revues y sont en partie consacrées [82].

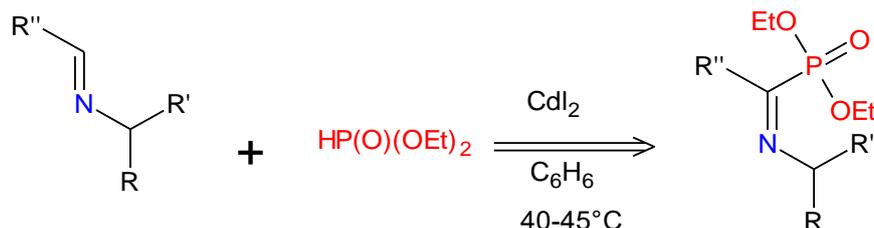


Schéma I 13 : la réaction de Pudovik [82]

I.2.4.2 Réactions pour l'obtention des acides α -aminophosphoniques

Il existe plusieurs méthodes pour synthétiser les acides α -aminophosphoniques rapportées dans la littérature [83–86]. Le moyen le plus courant consiste à fabriquer d'abord les α -aminophosphonates, qui sont des intermédiaires clés, puis à les hydrolyser pour donner les acides α -aminophosphoniques correspondants, tandis qu'il existe également d'autres moyens de fabriquer des acides α -aminophosphoniques tels que l'utilisation de l'acide phosphoreux.

I.2.4.2.1 Une voie directe

I.2.4.2.1.1 La réaction de Moedritzer et Irani

Moedritzer et *Irani* ont développés une nouvelle procédure pour la synthèse des acides α -aminophosphoniques en se basant sur la réaction de *Kabachnik-Fields*. en 1966, Ils ont préparés des acides α -aminométhylphosphoniques en impliquant un acide phosphoreux, formaldéhyde et une série d'amines (schéma I 14) [87].

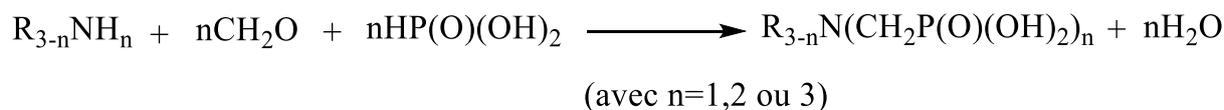


Schéma I 14 : Réaction de préparation des acides α -aminométhylphosphoniques d'après *Moedritzer-Irani*

Cette méthode est moins générale que les autres, mais elle présente l'avantage de permettre l'obtention des acides aminophosphoniques directement sans passer par l'étape d'hydrolyse des esters aminophosphonates.

I.2.4.2.1.2 Voie indirecte

Il existe plusieurs façons de préparer les acides α -aminophosphoniques, dont l'une consiste à hydrolyser les α -aminophosphonates. Il s'agit d'une voie de synthèse très courante et simple, en particulier lorsque les aminophosphonates ont été fabriqués. L'étape de purification (recristallisation) de cette réaction est relativement simple et efficace [88].

Cette méthode implique généralement de porter au reflux l'acide chlorhydrique concentré avec du α -aminophosphonate pendant plusieurs heures. Lors du refroidissement de la réaction, le solide d'acide α -aminophosphonique précipitera au fond du récipient de réaction. Cependant, étant donné que l'acide chlorhydrique concentré créera des conditions fortement acides pour la réaction, cette méthode ne peut pas être utilisée pour les composés qui contiennent des groupes fonctionnels sensibles aux acides.

I.2.4.3 Méthodes de synthèse d'autres phosphonates

I.2.4.3.1 Réaction de Michaelis-Arbuzov

Cette réaction est découverte pour la première fois par *Michaelis* en 1898 [89] et largement explorée en détail par *Aleksandr Arbuzov*, la réaction de *Michaelis-Arbuzov* est la plus utilisée, elle consiste à faire additionner un trialkylesphosphite sur un halogénure d'alkyle [90].

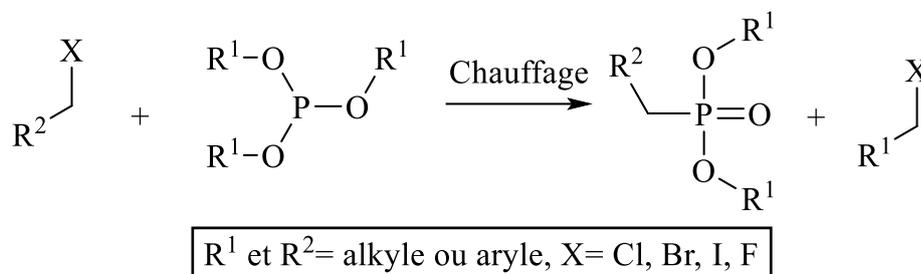


Schéma I 15 : Réaction de *Michaelis-Arbuzov*

Le mécanisme réactionnel de cette voie de synthèse comprend deux étapes principales : la première étape est une substitution nucléophile de l'halogénure par le phosphite de trialkyle et la deuxième, l'halogénure libéré à chaud doit attaquer l'un des groupes alkoxy pour former le phosphonate désiré et un halogénure d'alkyle [91].

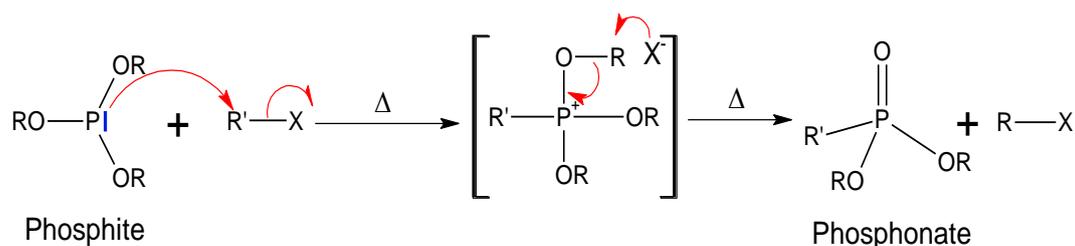


Schéma I 16 : Le mécanisme réactionnel de la réaction de Michaelis-Arbzov

I.2.4.3.2 Réaction de Michaelis-Becker

Les phosphonates peuvent également être synthétisés par la réaction de *Michaelis–Becker* (schéma I 17) décrite pour la première fois en Cette réaction est réalisée par l'alkylation du dialkylphosphite avec des halogénures d'alkyles, en présence d'une base forte dans un solvant apolaire et basse température [89].

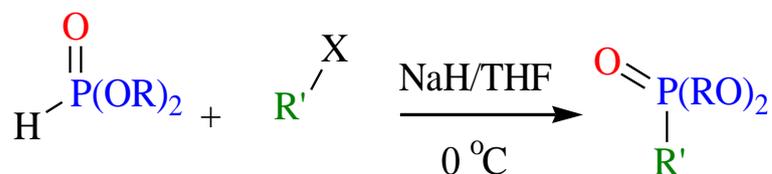


Schéma I 17 : Réaction de Michaelis-Becker

I.2.4.3.3 La réaction de Mitsunobu

Cette réaction est basée sur l'amination nucléophile d'un hydroxyphosphonate. Elle peut être réalisée par une réaction one-pot entre un alcool, un azodicarboxylate, de la triphénylphosphine et un nucléophile (ici NH_3). Elle conduit à l'azoture correspondant avec une inversion de configuration. L'azoture est ensuite réduit en amine par traitement avec de la triphénylphosphine et une hydrolyse aqueuse avec un rendement entre 70 et 90% selon les substituants [92].

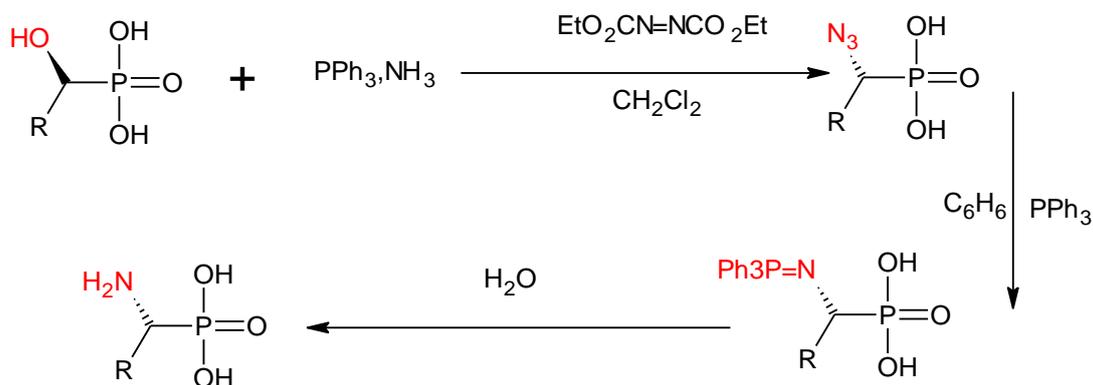


Schéma I 18 : Réaction de préparation des acides phosphoniques d'après Mitsunobu

I.2.4.3.4 Réaction d'Abramov et Pudovik

Les réactions de *Pudovik* et *Abramov* représentent les plus importants modes de phosphorylation des composés organiques par la création d'un dérivé tétra-coordonné avec une liaison P-C [93]. La réaction d'*Abramov* consiste en l'addition d'un di ou trialkylphosphite sur le groupement carbonyle pour l'obtention des α -hydroxyphosphonates. (Schéma I 19(a)). Dans la réaction de *Pudovik* les α -aminophosphonates sont obtenues par l'addition d'un di ou trialkylphosphite à la liaison C=N- d'imines (schéma I 19(b))[94].

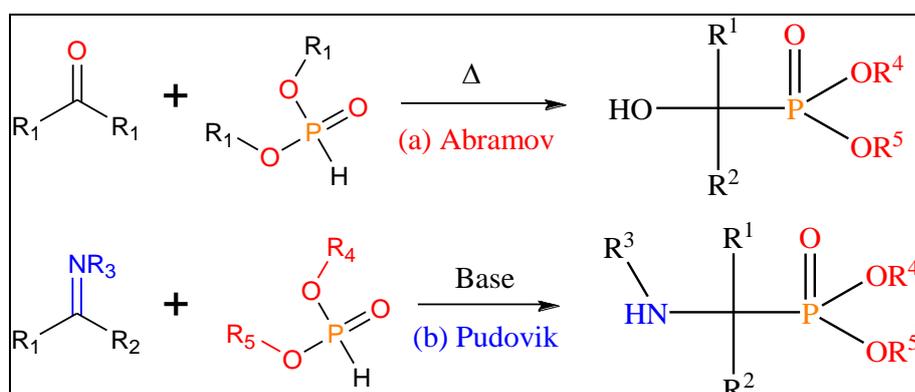


Schéma I 19 : Réaction d'Abramov et Pudovik

I.3 Généralités sur les activités biologiques

I.3.1 L'activité antioxydante

L'oxygène est indispensable à la vie des organismes aérobies où les mitochondries, "poumons" de la cellule, qui en utilisent d'une part comme substrat de la chaîne respiratoire pour la production de l'énergie sous forme d'ATP, et d'autre part impliquées dans la modulation de la fonction cellulaire (différenciation, prolifération) et jouent un rôle dans les réactions inflammatoires et dans la signalisation en tant que seconds messagers [95]. Ce métabolisme induit des effets néfastes dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées ROS et de l'azote RNS en équilibre avec les systèmes antioxydants [96].

L'évolution de cette oxydation semble être la cause de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer, les infections inflammatoires, les maladies cardiaques et accélèrent le processus de vieillissement [97].

I.3.1.1 Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Extrêmement instable, cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique.

Dans les phénomènes de stress oxydant prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (EOR ou ROS) ou de l'azote (EAR ou RNS) [98].

I.3.1.1.1 Principaux radicaux libres

Dans les cellules, il convient de distinguer les radicaux primaires qui jouent un rôle particulier en physiologie. Les autres, dits radicaux secondaires, se génèrent par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule [50]. On distingue alors deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant pouvant être de nature

radicalaire ou non. La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent [99].

- **Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)**

Les radicaux dérivés de l'oxygène représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants. Ce sont des molécules très réactives qui sont constamment produites par des réactions enzymatiques dans les cellules [100].

Tableau I 1: *Espèces réactives d'oxygène d'intérêt biologique*

<i>Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)</i>	<i>Réactivité</i>
<i>L'anion radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)</i>	Généré dans les mitochondries et dans le système cardiovasculaire.
<i>radical perhydroxyle HO_2^{\cdot}</i>	Celui-ci est obtenu après protonation du radical superoxyde en milieu pH < 4.8
<i>Radical hydroxyle HO^{\cdot}</i>	le peroxyde d'hydrogène peut réagir directement avec des ions métalliques (fer ou cuivre) par la réaction de Fenton $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\cdot} + Fe^{3+} OH^-$
<i>Radical peroxyde RO_2^{\cdot}</i>	Réactif et formé à partir de lipides, de protéines, d'ADN, de sucres etc. pendant les dommages oxydatifs
<i>Peroxyde d'hydrogène H_2O_2</i>	Formé dans notre corps par un grand nombre de réactions et produit des espèces puissantes comme HO^{\cdot}
<i>L'oxygène singulet 1O_2</i>	Très réactif, formé lors de la photosensibilisation et certaines réactions chimiques
<i>L'ozone O_3</i>	Peut réagir avec diverses molécules pour former l'oxygène singulet 1O_2

- **Les radicaux dérivés d'azote (ERN)**

Contrairement aux ERO, il y a peu de données sur l'altération induite par les espèces réactives d'azote [101], ils sont considérés comme une sous-classe des radicaux libres qui sont générés par la réaction de l'oxygène avec l'azote.

Tableau I 2 : *Espèces réactives d'azote d'intérêt biologique*

<i>Les espèces azotées (ERN)</i>	<i>Réactivité</i>
<i>Oxide nitrique NO•</i>	Neurotransmetteur et régulateur de pression sanguine, peuvent produire des oxydants puissants pendant les états pathologiques
<i>Peroxynitrite ONOO⁻</i>	Formé de NO• et superoxyde, hautement réactif
<i>Acide peroxynitrique ONOOH</i>	Forme protonée de ONOO ⁻
<i>Dioxyde d'azote NO²</i>	Formé lors de la pollution par le dioxyde atmosphérique

I.3.1.1.2 Les sources des radicaux libres

Les sources de production de radicaux libres sont classées en deux catégories

- *Les sources endogènes*

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, la plupart des radicaux libres se forment au cours du métabolisme dans les mitochondries, lors de la défense (antibactérienne et anti-inflammatoire), La régulation des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée (apoptose), fait appelle aussi à la production endogènes des radicaux libre [102].

- *Les ions métalliques*

Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre sous leurs formes réduites, sont des remarquables promoteurs de processus radicalaires in vitro : ils transforment l'H₂O₂ en OH• par la réaction de Fenton [103,104].

- *Les sources exogènes*

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents extérieurs capables de donner naissance à des espèces oxygénées réactives. Ces facteurs environnementaux incluant les agents exogènes (toxines, pesticides, herbicides, métaux lourds, fumée de cigarettes), et les

composés induits par la prise de certains médicaments, par les rayonnements UV ou lors d'un coup de chaleur [105,106].

I.3.1.2 Stress oxydant et pathologies

I.3.1.2.1 Stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre de la balance entre les espèces oxydantes et les systèmes de défense (antioxydants), que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants. Celui-ci peut favoriser la survenue de pathologies (cancers, maladies cardiovasculaires, maladies dégénératives) ainsi qu'un vieillissement prématuré [107]. Une des principales fonctions déclenchées par le stress oxydatif est la mort cellulaire programmée ou *apoptose*. Avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles, dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique [108,109].

I.3.1.2.2 Pathologies associées au stress oxydant

Déterminer le statut de stress oxydant d'un individu devient actuellement un sujet prioritaire en termes de prévention de maladies. En effet, de nombreuses études indiquent qu'il existe une association entre l'altération des systèmes de défense antioxydants et le développement de plus de 200 physiopathologies différentes comme l'athérosclérose ou le cancer mais également le SIDA, les maladies inflammatoires, le diabète et le vieillissement [97,100,105,110].

A Théorie radicalaire du vieillissement

Le vieillissement s'accompagne d'une altération globale de l'ensemble des fonctions physiologiques et d'une sensibilité plus importante vis-à-vis de certaines maladies. La théorie radicalaire du vieillissement explique que les phénomènes de dégénérescences liées au vieillissement sont dus à l'accumulation d'éléments oxydés et à leurs conséquences sur l'organisme comme la peroxydation lipidique ou la carbonylation des protéines. Ainsi, plus l'âge augmente, plus les attaques radicalaires sur les différentes cibles biologiques seront importantes [111–113].

B L'inflammation

Les ERO comme le peroxyde d'hydrogène sont capables d'activer des facteurs de transcription comme la protéine NF-KB (Nuclear Factor-Kappa B) qui est impliquée dans la réponse inflammatoire [114]. Egalement, les produits avancés de l'oxydation des protéines précurseurs de l'amyloïde agissent comme médiateurs du stress oxydatif. On retrouve aussi une corrélation entre l'inflammation et le stress oxydatif par une augmentation parallèle entre le taux de CRP (C-reactive protein) et de malonyl-dialdéhyde [115,116].

C Le processus de cancérisation

Le stress oxydant joue un rôle particulier dans les différents processus de cancérisation. La réaction d'un ROS avec une base nucléique induit une modification de l'ADN. L'ADN humain est constamment soumis à l'action des radicaux libres à raison de 20 altérations par jour. L'organisme a développé de nombreux systèmes, notamment enzymatiques, dédiés à la reconnaissance et la réparation de l'ADN (DNA polymerase). Cependant, ces systèmes sont parfois insuffisants, ce qui conduit à la création de protéines mutantes, L'apparition de tumeurs survient lorsque la balance protection/mutation tourne en faveur des cellules tumorales [117–119].

D Maladies neurodégénératives

Bien qu'il constitue seulement 2% de la masse corporelle, le cerveau humain consomme environ 20% de l'oxygène apporté par le système respiratoire. Cela le rend plus vulnérable, que d'autres organes, au stress oxydant [120,121].

Le stress oxydant intervient dans le processus de la mort cellulaire que l'on va retrouver dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'*Alzheimer*, la maladie de *Parkinson* ou la maladie de *Charcot* [121]. En d'autres mots, l'accumulation constante des espèces réactives oxygénées (*Reactive Oxygen Species, ROS*) et azotées (*Reactive Nitrogen Species, RNS*) entraîne inévitablement des dommages importants aux neurones. Ce stress est causé par différents facteurs sous-jacents tel que le dysfonctionnement mitochondrial, la perturbation de l'homéostasie de certains métaux (Cu, Fe, Zn) et leurs fonctions dans l'agrégation du peptide, ou encore la neuroinflammation [122,123].

E Le diabète

Le diabète du type 2 ou diabète non insulino-dépendant se caractérise notamment par une hyperglycémie chronique liée à une diminution de l'absorption du glucose au niveau des tissus adipeux et musculaires [124]. L'hyperglycémie, les dyslipidémies et les anomalies hémodynamiques sont à l'origine d'une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène. Cela mène à un stress oxydant et une diminution de la compliance vasculaire, ce qui peut conduire à des *microangiopathies* et *macroangiopathies* qui caractérisent le diabète du type 2, à savoir la rétinopathie et l'insuffisance coronaire [125].

Dans cette maladie, le stress oxydatif est superposable à l'hyperglycémie. Ainsi, plus la glycémie est élevée et prolongée, plus le stress oxydatif est intense et donc plus l'effet sera néfaste pour l'organisme. Cela va provoquer une augmentation de la dégradation du glucose qui, par accroissement du potentiel de membrane mitochondriale, va augmenter la synthèse de radicaux libres [126].

I.3.1.3 Les antioxydants

Un antioxydant est une molécule naturelle ou synthétique, qui est capable d'inhiber l'oxydation d'autres molécules en intervenant à différents stades du processus d'oxydation. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires [127]. Il peut agir de différentes façons : piéger les composés qui initient la réaction radicalaire, piéger les ions métalliques tels que Fe^{2+} , neutraliser l'anion superoxyde pour éviter la formation de peroxydes, terminer la réaction de propagation dans la réaction radicalaire mise en place ou réduire la concentration en O_2 [128]. Ils ont la capacité de contrecarrer les effets néfastes des radicaux libres dans les tissus, ils sont donc sensés pour protéger contre le cancer, les maladies cardiaques et plusieurs autres maladies métaboliques [129]. Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine [130].

I.3.1.3.1 Différents types des antioxydants

L'organisme possède des systèmes endogènes dédiés à l'action protectrice antioxydante. Cependant, cette ligne de défense est facilement saturée. De nombreux antioxydants exogènes sont également présents dans l'alimentation apportant un soutien significatif dans la lutte antioxydante. Nous les trouvons dans les fruits (pommes, poires, fruits rouges...), les légumes (brocoli, oignon...), les boissons (café, thé, ...) ainsi que dans les épices, le cacao ou encore les céréales. Ces antioxydants sont surtout connus pour leur capacité à réagir directement avec les radicaux libres en les « neutralisant » par réaction de réduction [131].

A Le système antioxydant enzymatique

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes élaborées par notre organisme à l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge [132]. Ces enzymes existant à l'état endogène permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire normal. Les principaux systèmes enzymatiques comprennent les VHB (SOD), la catalase (CAT) et plusieurs formes de glutathion peroxydases (GSHPX) [133].

B Systèmes antioxydant non enzymatiques

La défense antioxydante est composée d'antioxydants endogènes, qui sont synthétisés par le corps, et d'antioxydants exogènes, obtenus à partir de l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamine C, vitamine E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion et acide lipoïque.

- ***Systèmes antioxydant endogène non enzymatiques***

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir, *in vitro*, avec les radicaux HO[•], RO₂[•], RO[•], 1O₂, ONOO⁻, des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux HOCl [134].

- ***Systèmes antioxydants exogènes non enzymatiques***

Les antioxydants exogènes, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité.

Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution à partir de sources naturelles comme antioxydants de la nourriture. Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent :

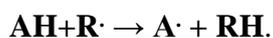
- **Les vitamines**, la vitamine E, la vitamine A, et la vitamine C [135] ;
- **Les oligo-éléments**, ce sont une classe de nutriments nécessaires, en quantité très faible, à la vie d'un organisme. L'apport par l'alimentation, en quantité raisonnable, est crucial. En effet, ils n'agissent pas directement contre les ROS, mais ils sont nécessaires aux enzymes décrites précédemment. Un apport excessif en oligo-éléments peut entraîner de sérieux dysfonctionnements, par exemple le sélénium (Se) et le zinc (Zn) [99] ;
- **Les antioxydants de synthèse**, Il existe de nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels pour une utilisation pratique, les antioxydants doivent remplir les conditions suivantes : Ils ne doivent pas être toxiques, ils doivent être hautement actifs à des faibles concentrations (0.01-0.02%) et doivent être présents à la surface ou dans la phase grasse de l'aliment. Parmi les polyphénols de synthèse, on peut citer à titre d'exemple : la *3,3', 5,5'-Tetra-*t*-butyl-biphenyl-4,4'-diol* qui a montré un effet protecteur des cellules neuronales[99].

I.3.1.3.2 Mécanisme antioxydant

Les principaux oxydants dans les milieux biologiques sont les radicaux libres et les métaux de transition. Les antioxydants désactivent les radicaux libres via trois mécanismes

- **Transfert d'atome d'hydrogène**

L'antioxydant agit avec le radical libre par transfert d'un atome d'hydrogène via la rupture homolytique de la liaison



Les produits de cette réaction sont la forme réduite (RH) du radical néfaste, et le radical A• (forme oxydée de l'antioxydant). Bien que cette réaction donne naissance à un autre radical libre, celui-ci est généralement stabilisé par plusieurs facteurs tels que les effets de résonance, la conjugaison, et des liaisons hydrogènes [138].

- **Transfert mono-électronique d'électron**

Dans ce mécanisme, un électron est transféré au radical libre $R\cdot$. L'anion R^- et le cation radical A^+ ainsi formé sont généralement des entités stables.



Le potentiel d'ionisation est le facteur déterminant du pouvoir piègeur d'électrons. Un potentiel bas implique un arrachement facile d'électron et en conséquence une réaction avec le radical libre [136].

- **Chélation des métaux de transition**

Le dommage oxydatif est un processus multiphasique impliquant des étapes d'initiation et de propagation de la chaîne radicalaire. Un mécanisme important de l'action antioxydante est la chélation des métaux de transition, empêchant ainsi la catalyse de la décomposition du peroxyde d'hydrogène via la réaction de type *Fenton* [136].

I.3.2 Activité anticholinestérase

I.3.2.1 Définition de La maladie d'Alzheimer

La maladie d'*Alzheimer* (MA) est une maladie neurodégénérative (perte progressive de neurones) dont le facteur de risque majeur est l'âge. Elle s'agit d'une atteinte neurodégénérative du système nerveux central, caractérisée par une atteinte cognitive et comportementale d'installation et d'aggravation progressive. Sur le plan histologique elle se traduit par des lésions neuropathologiques spécifiques : plaques séniles et dégénérescence neurofibrillaire, qui siègent dans les aires associatives et interrompent la neurotransmission normale. Elles sont alors associées à une dégénérescence neuronale qui aboutit à la mort cellulaire. En conséquence, des déficits en neurotransmetteurs sérotoninergiques, noradrénergiques, et surtout cholinergiques, apparaissent. Il en résulte initialement une réduction significative de l'acétylcholine dans l'hippocampe, puis dans les cortex frontaux, temporaux et pariétaux (régions fortement associées à la mémoire et aux fonctions cognitives) [137].

I.3.2.2 Traitement de La maladie d'Alzheimer

La MA, connue pour être associée à la perte progressive de la mémoire, est caractérisée par une faible concentration d'acétylcholine dans le cadre de l'hippocampe et le cortex du cerveau. L'inhibition de l'acétylcholinestérase a été utilisée avec succès comme une cible

thérapeutique pour traiter la MA, mais la résistance aux médicaments montre que la butyrylcholinestérase reste un sujet de préoccupation dans le traitement de la MA.

La MA représente un enjeu majeur de santé publique étant donné son caractère incurable, la perte d'autonomie pour les activités de la vie quotidienne et sa forte prévalence. C'est pour cela que depuis plusieurs années, plusieurs hypothèses ont été élaborées afin de mettre au point un traitement efficace. Pour l'instant sur le marché il existe seulement deux molécules permettant d'améliorer la prise en charge : les *anticholinestérasiques* et les *antiglutamates* (la *mémantine*). Ces traitements sont avant tout symptomatiques et n'influencent pas l'évolution de la maladie, c'est à dire qu'ils ne sont pas « *disease modifiers* ». La *mémantine* (Ebixa®) est le seul traitement indiqué chez les patients au stade sévère de la MA ; elle est également préconisée au stade modérément sévère [138].

I.3.2.3 Les cholinestérasés et la maladie d'Alzheimer

Dans la Maladie d'Alzheimer, les cellules nerveuses se détériorent progressivement, surtout celles produisant de l'acétylcholine, substance importante pour la mémoire. On a montré qu'il existe une baisse de la concentration d'acétylcholine dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer. Les anticholinestérasiques diminuent l'activité de l'acétylcholinestérase, enzyme détruisant l'acétylcholine.

L'hypothèse cholinergique de la maladie d'Alzheimer a conduit à une thérapeutique courante et majeure. Cette approche est basée sur la tentative de correction du déclin cognitif par une manipulation de la neurotransmission cholinergique. Dans les possibles stratégies pour augmenter l'activité cholinergique cérébrale, l'inhibition des cholinestérasés est celle qui est la plus utilisée [139].

Les *ChEs* ont été classés en deux types, *l'acétylcholinestérase (AChE)* et la *butyrylcholinestérase (BChE)*, sur la base des spécificités de substrat et de l'inhibiteur des sensibilités distinctes.

L'acétylcholinestérase (AChE), est une protéine exprimée dans le système nerveux et sanguin des eucaryotes supérieurs, si au sein du système circulatoire, sa fonction principale, au sein du système nerveux, est parfaitement caractérisée. L'AChE est particulièrement importante au niveau des jonctions neuromusculaires, puisque son principal rôle physiologique est

d'hydrolyser l'acétylcholine libérée dans la synapse cholinergique, permettant ainsi la restauration de l'excitabilité de la membrane post-synaptique [140].

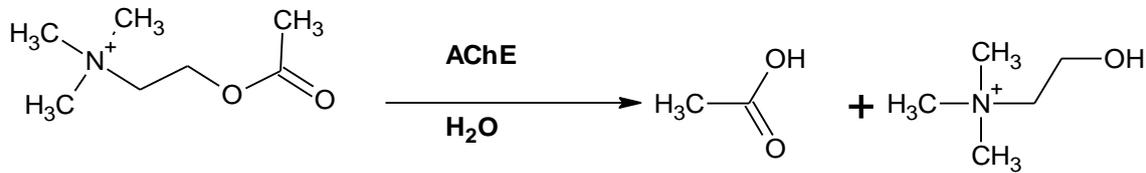


Schéma I 20 *Reaction d'hydrolyse de l'acétylcholine*

La BChE, qui est également connue sous le nom de cholinestérase plasmatique ou pseudo-cholinestérase, catalyse l'hydrolyse d'une grande variété d'esters de choline (butyrylcholine, succinylcholine, acétylcholine, acide acétylsalicylique, cocaïne et héroïne) [141]. Il est rapporté d'être impliqués dans la morphogénèse, la cétogénèse et la tumorigénèse, la régulation de la prolifération cellulaire et l'apparition de différenciation au cours du développement neuronal précoce, comme fixateur à la détoxification de certaines substances chimiques, et en le métabolisme des lipoprotéines [142]. La BChE pourrait, donc, avoir des fonctions dans le système nerveux normal et pourrait aussi participer aux processus pathologiques dans les maladies neurodégénératives [143].

L'inhibition de ces enzymes va engendrer une diminution du turnover de l'acétylcholine et donc augmenter les effets cholinergiques et diminuer les symptômes de la maladie d'Alzheimer.

I.3.3 Activité anti-amylase (antidiabétique)

I.3.3.1 Le diabète

Le diabète est défini par une hyperglycémie chronique liée soit à un trouble de la sécrétion de l'insuline, soit à un trouble de l'action de l'insuline, soit les deux [144]. L'insuline est une hormone produite par le pancréas, revêt un caractère essentiel dans la régulation de la glycémie, puisque c'est la seule hormone ayant une action hypoglycémisante. Une carence ou un défaut d'insuline entraîne une hyperglycémie chronique qui est la cause principale de la survenue des complications dégénératives de la maladie diabétique mais celles-ci sont néanmoins susceptibles d'être évitées ou tout au moins retardées par un traitement [145].

Le diabète sucré se définit aussi par une hyperglycémie chronique, soit une glycémie à jeun supérieure à 1,26g/l (7mmol/l) ou une glycémie supérieure à 2g/l (11,1mmol/l) à n'importe quel moment ou lors d'une hyperglycémie provoquée par voie orale à deux reprises. Cette définition

est fondée sur le seuil glycémique à risque de micro-angiopathie, en particulier à risque de rétinopathie [146].

I.3.3.2 Classification du diabète

La classification du diabète a évolué au cours des 50 dernières années. En effet, en 1980, l'*OMS* considérait, comme la plupart des cliniciens, qu'il y avait deux classes principales de diabète, le diabète insulino-dépendant ou diabète de *type I* et le diabète non insulino-dépendant ou de *type II* ; des « *diabètes d'autres types* » et le diabète *gestationnel* étant aussi reconnus. Les recommandations de l'*OMS* de 1999 proposent de supprimer les dénominations « insulino-dépendant » et « non insulino-dépendant », pour garder uniquement les termes « *type I* et *type II* » et détailler les différentes formes de « *diabète d'autre type* », tout en continuant d'individualiser le diabète gestationnel [147].

I.3.3.3 Traitements du diabète de type 2

Le but de la thérapie antidiabétique est la stabilisation du taux de glucose sanguin à un taux le plus proche de la normal et de prévenir l'apparition des complications de cette pathologie. Les traitements du diabète sont de deux types, les non médicamenteux (traitement hygiéno-diététiques) et les médicamenteux (antidiabétiques oraux (ADO) et insulinothérapie).

I.3.3.3.1 Traitements non médicamenteux

La réduction pondérale et la pratique régulière de l'activité physique (adaptée et contrôlée) ont un effet favorable sur le contrôle de la glycémie et l'insulinorésistance. Une alimentation équilibrée est conseillée pour le traitement du diabète, avec une diminution des apports en graisses saturées, des sucres et de l'alcool, l'activité physique adaptée aux possibilités de chaque patient est recommandée chez le diabétique de type 2 (DT2) car elle contribue à une amélioration de la situation métabolique (insulinosensibilité, niveau glycémique, pression artérielle, profil lipidique etc...) et pourrait être utile pour le contrôle du poids [148].

I.3.3.3.2 Traitements médicamenteux

En général, les ADO sont prescrits après un échec des règles hygiéno-diététiques durant 3 à 6 mois. Il existe 5 classes d'ADO, le traitement étant adapté à chaque patient diabétique. Ces classes de médicaments se distinguent par leurs modes d'action :

- L'amélioration de la sensibilité des cellules des muscles et du foie à l'insuline (favorisant leur utilisation du sucre) ; la metformine (famille des biguanides et les glitazones (ou thiazolidinediones).
- La stimulation de la production d'insuline ou l'apport de celle-ci ; Ces médicaments, dits insulinosécréteurs, stimulent la libération d'une plus grande quantité d'insuline par le pancréas ; les sulfamides hypoglycémiants et les glinides.
- La diminution de l'absorption des sucres par l'intestin ; les inhibiteurs d'alpha-glucosidase et d'alpha-amylase.
- L'élimination des sucres par l'urine ; les inhibiteurs du SGLT2 (les gliflozines) [149,150].

I.3.3.3 Insulinothérapie

En cas d'échec du traitement antidiabétique oral chez le DT2, il apparaît nécessaire d'instaurer l'insulinothérapie précocement pour préserver le capital insulinosécrétoire résiduel [151]. Il est recommandé actuellement d'utiliser des associations d'insuline et d'ADO dont les mécanismes d'action diffèrent afin d'obtenir un équilibre glycémique dans des conditions de sécurité maximale [152]. L'insulinothérapie définitive devient bien évidemment nécessaire en cas de contre-indication à la poursuite des ADO (insuffisance rénale, hépatique...) [151]. La régulation de la glycémie chez le patient diabétique doit être fine et permettre le retour à une homéostasie glycémique.

I.3.4 Activité inhibitrice d'uréase

Les uréases sont présentés dans de nombreuses bactéries, champignons, algues, plantes, ainsi que dans les sols, en tant qu'enzyme du sol. L'enzyme bactérienne revêt une importance particulière car il a été démontré qu'elle constitue un puissant facteur de virulence pour certaines espèces. *Helicobacter pylori* est la seule bactérie capable de coloniser de façon persistante l'estomac humain. L'infection au long cours au contact de la muqueuse gastrique provoque diverses pathologies gastriques comme les ulcères gastroduodénaux et les cancers gastriques. Pour résister au stress acide rencontré dans sa niche, *H. pylori* possède une réponse d'urgence qui dépend de l'uréase [153].

L'uréase est une enzyme clé dont bénéficie la bactérie *Helicobacter pylori* en rendant possible sa persistance dans l'environnement acide de l'estomac, lors de l'infestation, elle est

très active et capable d'hydrolyser l'urée normalement dans l'estomac en libérant de l'ammoniac. Cet ammoniac neutralise le micro-environnement de la bactérie, ce qui rendra le milieu plus accueillant à cette bactérie [154].

I.3.5 Activité anti-inflammatoire

I.3.5.1 Rappel sur l'inflammation

L'inflammation est la première ligne de défense de l'organisme qui se met en place suite à une menace, à une agression d'origine physique (froid, chaleur..) ou chimique (acide, base..), à une infection due à des bactéries ou à des virus, à une réaction immunitaire primaire ou secondaire (qui est la conséquence de la réintroduction dans l'organisme d'un antigène) et enfin à une nécrose.[155,156]. Elle va avoir pour but de permettre l'élimination de l'agent agresseur et des débris cellulaires, ainsi que de la réparation des tissus [157]. De plus, elle est souvent suivie par une dilatation des vaisseaux sanguins permettant la migration de cellules et de certaines molécules du sang vers les tissus où l'agression a été localisée, provoquant ainsi rougeur, chaleur, œdème et douleur [158].

I.3.5.2 Types d'inflammation

Il existe deux types d'inflammations : de courte durée (*inflammation aiguë*), ou se pérennise (*inflammation chronique*) qui nécessite un contrôle médicamenteux.

I.3.5.2.1 L'inflammation aiguë

C'est une réponse inflammatoire immédiate suite à une agression par un agent pathogène, de courte durée et d'installation brutale. Dans les conditions normales, l'inflammation aiguë guérit spontanément ou avec un traitement. Par contre, des séquelles de la réaction peuvent exister si la destruction a été significative. Elle est caractérisée par quatre phénomènes typiques qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur, elle peut également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression et peut être ainsi divisée en 3 phases : phase vasculaire, phase cellulaire et phase de résolution et de cicatrisation [159].

I.3.5.2.2 L'inflammation chronique

L'inflammation chronique se développe si l'agression persiste ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, ou l'antigène ne peut être éliminé, elle dure quelque mois ou des années voire même se prolonger le long de la vie de l'individu à la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent toute au long de l'évolution de l'inflammation. Des phénomènes de tentatives de réparation et de destruction tissulaire sont également présents. Le macrophage constitue l'essentiel de l'infiltrat cellulaire vers le site d'inflammation. La présence de lymphocytes dans l'infiltrat est habituelle. Tandis que le polynucléaire éosinophile est caractéristique des inflammations chroniques allergiques et parasitaires [160].

I.3.5.3 Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des substances qui agissent sur la douleur et le gonflement qui apparaissent suite à une agression d'un agent pathogène. Elles sont utilisées lorsque la réaction inflammatoire se prolonge de façon anormale (inflammation chronique) et entraîne des dommages aux tissus. Elles bloquent la sécrétion ou l'action de certains médiateurs chimiques de l'inflammation (comme les prostaglandines) et donc diminuent la sensation de douleur mais aussi l'inflammation.

Il existe deux grands types d'anti-inflammatoires. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens et les anti-inflammatoires stéroïdiens

I.3.5.3.1 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

C'est une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antalgique, antipyrétique et antiagrégant plaquettaire [161].

Cette classe est très vaste, elle contient par exemple : du *diclofénac*, l'*ibuprofène*, l'*aspirine* et l'*indométacine* [162].

Ils présentent une grande hétérogénéité chimique, mais ils sont tous capables d'inhiber de manière non sélective la cyclo-oxygénase (cyclo-oxygène est formé de plusieurs isocyclo-oxyane) par contre il y a des anti-inflammatoires qui agissent sur cyclo-oxygène précis.

Malheureusement, ils sont également associés à de nombreux effets délétères car leur utilisation prolongée provoque des troubles gastro-intestinaux (comme les saignements intestinaux), le dysfonctionnement plaquettaire et l'hypertension associée au dysfonctionnement rénal [163].

I.3.5.3.2 Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou les glucocorticoïdes constituent une classe de médicaments qui sont des dérivés synthétiques de la cortisone. Parmi eux, on peut citer : *le méthylprednisolone, le bêtaméthasone, la prednisone et la prednisolone*

Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immune [164].

Comme les glucocorticoïdes endogènes, les AIS se lient à leurs récepteurs au niveau du cytoplasme formant un dimère (récepteur + corticoïde) qui se lie sur les gènes appropriés, ce processus conduit à une transcription accrue des gènes codants pour les protéines anti-inflammatoires telles que la lipocortine 1 et l'interleukine 10, et une inhibition de l'expression de plusieurs gènes codants pour les protéines pro-inflammatoire dont les cytokines, les enzymes, les récepteurs et des molécules d'adhésions [165].

Il est à noter que l'utilisation de ces corticostéroïdes a des inconvénients. Ils sont bien connus pour provoquer l'hyperglycémie, une sensibilité accrue aux infections, des troubles psychiatriques, des troubles aigus tels que l'hypertension artérielle, dérégulations de la biosynthèse des glucocorticoïdes à la fin du traitement, insomnie, ulcère gastroduodéal, alors que les troubles chroniques sont : ostéoporose, cataracte, prise de poids [166].

I.3.6 Facteur de protection solaire (SPF)

I.3.6.1 Le rayonnement solaire

La fusion nucléaire du soleil libère une énergie colossale qui nous parvient 8 minutes plus tard sous forme d'ondes électromagnétiques que l'on appelle également rayonnement solaire. Le rayonnement solaire est indispensable à la vie mais il peut être extrêmement dangereux pour la santé humaine. Une trop longue exposition au soleil peut être à l'origine de nombreuses et diverses réactions cutanées.

Le rayonnement solaire UV est un rayonnement électromagnétique non ionisant, formé de photons, et défini par des longueurs d'ondes situées entre 100 et 400 nm. Ces trois types de rayonnements UV sont classés en fonction de leur longueur d'onde.

- UVC: 100-280 nm

- UVB: 290-320 nm

- UVA: 320-400 nm

Ils n'ont pas la même activité biologique ni le même pouvoir de pénétration de la peau, la pénétration des rayons UV augmente avec la longueur d'onde ($UVA > UVB > UVC$) tandis que l'énergie diminue avec la longueur d'onde ($UVA < UVB < UVC$) [167].

I.3.6.2 La peau

La peau est l'organe le plus vaste et le plus lourd de notre corps (environ 3,5 kg en poids et 1,5 m² de surface pour un individu de 75 kg), elle protège également les cellules du rayonnement [168,169]. Elle est structurée en trois couches superposées de la plus externe à la plus profonde : l'épiderme, le derme et l'hypoderme [170].

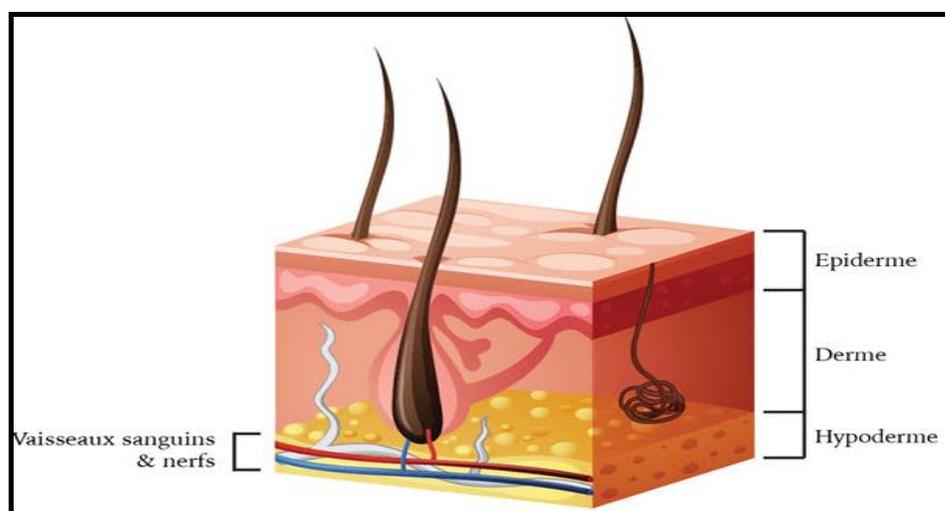


Figure I 1 : Composition des différentes couches de la peau [171]

I.3.6.3 Effets néfastes du soleil sur la peau

Le soleil est indispensable à la vie sur terre, il est bon pour notre santé et notre moral. Mais, il est aussi responsable de nombreux effets néfastes pour la peau et la santé. A court

terme, ces effets peuvent être un signe d'alarme d'une surexposition au soleil, mais à long terme, ils sont la conséquence d'une accumulation chronique, au cours de toute la vie, des dommages provoqués par le soleil. On cite par exemple : La photosensibilisation, le carcinomes, les coups de soleil, le coup de chaleur, le vieillissement cutané prématuré, le mélanomes, la iminution des défenses immunitaires [172].

I.3.6.4 La photoprotection

La photoprotection correspond à l'ensemble des moyens naturels et/ou artificiels capables de s'opposer aux effets délétères du soleil. On distingue :

I.3.6.4.1 La photoprotection naturelle

Les multiples mécanismes de barrière contre les effets directs des radiations UV sont génétiquement déterminés. Chaque personne conditionne une résistance naturelle à l'exposition solaire, variable d'un individu à l'autre.

- L'épaississement de la couche cornée ;
- Le bronzage ;
- Le système pigmentaire ;
- La pilosité ;
- Les systèmes de réparation de l'ADN [173,174].

I.3.6.4.2 La photoprotection cosmétique

La photoprotection active ou topique, destinée à éviter l'érythème actinique, est assurée par deux classes de substances : les écrans (filtres minéraux ou inorganiques) et les filtres organiques. Ces substances sont incorporées dans des excipients permettant d'obtenir des formes liquides (eau, huile), des formes pâteuses (lait, crème, gel) et des formes solides (sticks).

- ***Les filtres UV chimiques (ou organiques)***

Les filtres chimiques sont des molécules organiques (*benzophènes, aminobenzoates*) comportant des liaisons π formant un système conjugué. Ils peuvent se présenter sous forme solide ou liquide et peuvent être lipophiles, hydrophiles ou encore totalement insolubles sans les milieux de formulation dans lesquels ils sont introduits [175].

- ***Les écrans minéraux***

Ils sont aussi parfois appelés filtres chimiques, du fait de leur mécanisme d'action. Ces filtres se présentent sous la forme de poudre dont les particules renvoient la lumière par des phénomènes de réflexion ou de diffraction (scattering). Ce sont des oxydes métalliques, de granulométrie variable. Plus leur taille est petite, moins ils absorbent dans l'UVB. Les écrans minéraux sont très efficaces. Ils sont capables de réfléchir l'ensemble des radiations allant des UV aux IR. Ils agissent donc comme véritable barrière qui empêche l'énergie photonique d'atteindre les téguments [176].

- ***Les filtres d'origine naturelle***

Quelques extraits végétaux ont été recommandés en complément de filtres solaires plus efficaces : extrait d'aloès, extraits de reine des prés, de camomille, de millepertuis.

Les huiles de germe de blé, d'avocat, d'amande douce et de ricin ainsi que les huiles minérales sont dépourvues d'activités filtrantes. Elles ont surtout des propriétés surgraissantes et n'ont pas d'activité préventive. En revanche, elles peuvent avoir une certaine activité curative, sur le développement de l'érythème [177].

I.3.7 L'activité antimicrobienne

Les infections humaines en particulier celles impliquant des micro-organismes : bactéries, champignons ou virus, sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. Ces maladies infectieuses affectent des millions de personnes dans le monde entier.

Un grand nombre de médicaments ont été découverts jusqu'ici pour lutter contre cette situation mais la résistance aux antibiotiques est un problème qui continue à défier le secteur de la santé. La découverte de nouveaux antibiotiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques est nécessaires pour relever ce défi.

I.3.7.1 Généralités sur les bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue d'autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont

divisées en bactéries proprement dites (*Bacteria*) et bactéries primitives (*Archaea*). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux *Bacteria*.

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1µm. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (*bacilles*), incurvée (*vibrions*) ou spiralée (*spirochètes*). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique [178].

I.3.7.2 Familles en fonction de Leur paroi : comparatif Gram + et Gram –

Les bactéries sont divisées en deux grandes familles en fonction de leur paroi cellulaire. C'est à l'aide d'une coloration dite coloration de *Gram* que l'on parvient à différencier ces bactéries, elles seront alors soit *Gram positives* ou *Gram négatives*. Structurellement c'est l'épaisseur du peptidoglycane qui permet ce classement : si le peptidoglycane est épais et riche, il s'agit d'une bactérie *Gram +*, s'il est fin et composé en majorité de lipides, nous sommes chez une bactérie *Gram –* [178].

I.3.7.3 Les antibiotiques

I.3.7.3.1 Généralités

Les antibiotiques sont des agents dont la toxicité sélective résulte d'un mode d'action spécifique. Ils agissent à faible dose pour inhiber la croissance des micro-organismes ou pour les détruire. Ils peuvent être produits de manière naturelle par des champignons et des bactéries ou obtenus par synthèse et hémisynthèse [179].

I.3.7.3.2 Critères de classification

La classification des antibiotiques est multiple, elle peut se faire selon :

- ***L'origine***

Selon la nature chimique car il existe des organismes (naturel) ou produits par synthèse (synthétique) et souvent une structure de base sur laquelle il y a une hémisynthèse définissant ainsi une famille d'antibiotiques (Ex : β -lactamines).

- ***Le site d'action spécifique à chacun :***

- Inhibition de la synthèse protéique comme par exemple (aminosides, cyclines, phénicolés, acide fusidique, macrolides, oxazolidinones, mupirocine, synergistines).

- Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne comme par exemple (β -lactamines, glycopeptides, fosfomycine).
- Action sur la synthèse des acides nucléiques comme par exemple (quinolones, nitroimidazolés, rifamycines, sulfamides triméthoprim).
- Action sur les membranes comme par exemple (polymyxines, daptomycine).

- ***Spectres d'activité antibactérienne :***

Le spectre d'activité d'un antibiotique représente l'ensemble des espèces bactériennes sur lesquelles un antibiotique agit et permet de prévoir son potentiel ainsi que ses limites. Le spectre est propre à chaque antibiotique, et peut varier dans le temps suite à l'apparition de résistance bactérienne. Ils peuvent être à spectre large ou à spectre étroit.

- Les antibiotiques à spectre large sont efficaces sur un grand nombre de types d'agents pathogènes. Ainsi, l'antibiotique sera actif sur une grande partie de tous les *cocci* et tous les bacilles. Ils sont utilisés lorsque la bactérie n'est pas identifiée et que la pathologie peut être due à différents types d'agents pathogènes.
- Les antibiotiques à spectre étroit sont efficaces sur un nombre limité d'agents infectieux leur permettant de cibler une pathologie en particulier.

- ***Les modalités d'action :***

Les antibiotiques présentent deux grands modes de fonctionnement. Certains attaquent le peptidoglycane de la paroi bactérienne ce qui cause une déstabilisation de la bactérie et entraîne sa mort. Il s'agit de *l'action bactéricide*, autrement dit qui tue les bactéries.

D'autres agissent sur le système protéique de la bactérie : en se fixant sur la sous unité 50s du ribosome bactérien entraînant une inhibition de la synthèse protéique. La bactérie ne meurt pas mais ne peut plus se développer ni se multiplier, on parle de *bactériostatique*. L'antibiotique est donc capable d'inhiber la multiplication des bactéries sans les tuer [180].

I.3.7.4 Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne est retenue lorsqu'un antibiotique perd sa capacité à inhiber efficacement la croissance bactérienne. Autrement dit, les bactéries continuent de se multiplier en présence de concentrations thérapeutiques d'antibiotiques. Selon l'*Organisation Mondiale de la Santé (OMS)*, "la résistance aux antibiotiques est en train de devenir une urgence de santé

publique en des proportions encore inconnues". Généralement, Deux types de résistances existent : la résistance naturelle et la résistance acquise.

I.3.7.4.1 La résistance naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. Cette résistance peut être une caractéristique intrinsèque de l'organisme (par exemple les particularités structurales des parois cellulaires de certaines bactéries) qui les rendent naturellement résistantes. La résistance naturelle peut également être obtenue au moyen d'une mutation dans son propre ADN chromosomique. Il existe différentes formes de résistances naturelles, comme le manque d'un système de transport intrinsèque à un antibiotique, l'absence de récepteur pour un antibiotique donné, ou, comme dans le cas des bactéries Gram -, la paroi cellulaire est recouverte d'une membrane externe qui établit une barrière imperméable contre certains antibiotiques de poids moléculaire élevé comme les glycopeptides [181]

I.3.7.4.2 La résistance acquise

Elle est définie comme une résistance d'un micro-organisme à un médicament antimicrobien auquel il était précédemment sensible. Cette résistance provient de l'utilisation intensive d'antibiotiques à des fins humaines, vétérinaire et agricole, causant leur libération continue dans l'environnement et l'évolution des gènes résistants [182], Elle peut provenir d'une mutation chromosomique de gènes impliqués dans les processus physiologiques normaux ou les structures cellulaires de la bactérie, d'une acquisition de gènes de résistance étrangers à partir d'une autre source au moyen de plasmides, de bactériophages ou de transposons ; ou d'une combinaison de ces deux mécanismes. Contrairement à la résistance naturelle, la résistance acquise ne concerne que certaines souches ou sous-populations d'une espèce bactérienne particulière. Elle est imprévisible sur le plan individuel [183].

Référence bibliographique

- [1] R.M. Richardson, New synthesis and reactions of phosphonates, PhD Thesis, The University of Iowa, 2012.
- [2] K. Issleib, D. E. C. Corbridge. Phosphorus, an Outline of its Chemistry, Biochemistry and Technology. Verlag Elsevier Scientific Publishing Company Amsterdam, Oxford, New York, 2nd ed. 1980 560 Seiten, Krist. Techn. 16 (1981) 456–456.
<https://doi.org/10.1002/crat.19810160411>.
- [3] J.W. Crabb, Techniques in protein chemistry V, Academic Press, San Diego, 1994.
- [4] I.W.G. on the E. of C.R. to Humans, Some organophosphate insecticides and herbicides, (2017).
- [5] J.B. Quintana, R. Rodil, T. Reemtsma, M. García-López, I. Rodríguez, Organophosphorus flame retardants and plasticizers in water and air II. Analytical methodology, TrAC Trends in Analytical Chemistry. 27 (2008) 904–915.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.08.004>.
- [6] O.P. Korobeinichev, V.M. Shvartsberg, A.G. Shmakov, The chemistry of combustion of organophosphorus compounds, Russ. Chem. Rev. 76 (2007) 1023.
<https://doi.org/10.1070/RC2007v076n11ABEH003713>.
- [7] M. Mehri, N. Chafai, L. Ouksel, K. Benbouguerra, A. Hellal, S. Chafaa, Synthesis, electrochemical and classical evaluation of the antioxidant activity of three α -aminophosphonic acids: Experimental and theoretical investigation, Journal of Molecular Structure. 1171 (2018) 179–189.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.05.074>.
- [8] B. Youssef, B. Mortaigne, M. Soulard, J.M. Saiter, Fireproofing of polyurethane by organophosphonates, J Therm Anal Calorim. 90 (2007) 489–494.
<https://doi.org/10.1007/s10973-006-7971-x>.
- [9] M.A. Migahed, A.M. Alsabagh, M.I. Abdou, A.A.-H. Abdel-Rahman, A.A. Aboulrous, Synthesis a novel family of phosphonate surfactants and their evaluation as corrosion inhibitors in formation water, Journal of Molecular Liquids. 281 (2019) 528–541.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.02.093>.

- [10] K.Y. Hostetler, Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: Current state of the art, *Antiviral Research*. 82 (2009) A84–A98. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.01.005>.
- [11] A. Holý, Antiviral acyclic nucleoside phosphonates structure activity studies, *Antiviral Research*. 71 (2006) 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.06.002>.
- [12] R. Zarrougui, R. Mdimagh, N. Raouafi, Highly efficient extraction and selective separation of uranium (VI) from transition metals using new class of undiluted ionic liquids based on H-phosphonate anions, *Journal of Hazardous Materials*. 342 (2018) 464–476. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.057>.
- [13] C.Y. Ortiz-Avila, C. Bhardwaj, A. Clearfield, Zirconium Polyimine Phosphonates, a New Class of Remarkable Complexing Agents, ACS Publications. (2002). <https://doi.org/10.1021/ic00090a002>.
- [14] B. Nowack, Environmental chemistry of phosphonates, *Water Research*. 37 (2003) 2533–2546. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00079-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00079-4).
- [15] R. Engel, *Synthesis of Carbon – Phosphorus Bonds*, 2004.
- [16] C. Timperley, *Best Synthetic Methods: Organophosphorus (V) Chemistry*, Newnes, 2014.
- [17] B. Mosayebi, M. Kazemeini, A. Badakhshan, A. Safekordi, Effect of phosphonate based corrosion inhibitors in a cooling water system, *British Corrosion Journal*. 37 (2002) 217–224. <https://doi.org/10.1179/000705902225004446>.
- [18] B. Zhang, L. Zhang, F. Li, W. Hu, P.M. Hannam, Testing the formation of Ca–phosphonate precipitates and evaluating the anionic polymers as Ca–phosphonate precipitates and CaCO₃ scale inhibitor in simulated cooling water, *Corrosion Science*. 52 (2010) 3883–3890. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2010.07.037>.
- [19] X.H. To, N. Pebere, N. Pelaprat, B. Boutevin, Y. Hervaud, A corrosion-protective film formed on a carbon steel by an organic phosphonate, *Corrosion Science*. 39 (1997) 1925–1934. [https://doi.org/10.1016/S0010-938X\(97\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S0010-938X(97)00086-3).
- [20] M. Prabakaran, S. Ramesh, V. Periasamy, Inhibitive properties of a phosphonate-based formulation for corrosion control of carbon steel, *Res Chem Intermed*. 39 (2013) 3507–3524. <https://doi.org/10.1007/s11164-012-0858-5>.

- [21] D. Sarada Kalyani, S. Srinivasa Rao, M. Sarath Babu, B.V. Appa Rao, B. Sreedhar, Electrochemical and surface analytical studies of carbon steel protected from corrosion in a low-chloride environment containing a phosphonate-based inhibitor, *Res Chem Intermed.* 41 (2015) 5007–5032. <https://doi.org/10.1007/s11164-014-1584-y>.
- [22] B. Maranescu, N. Plesu, A. Visa, Phosphonic acid vs phosphonate metal organic framework influence on mild steel corrosion protection, *Applied Surface Science.* 497 (2019) 143734. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.143734>.
- [23] A. Moschona, N. Plesu, G. Mezei, A.G. Thomas, K.D. Demadis, Corrosion protection of carbon steel by tetraphosphonates of systematically different molecular size, *Corrosion Science.* 145 (2018) 135–150. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2018.09.021>.
- [24] N. Chafai, S. Chafaa, K. Benbouguerra, D. Daoud, A. Hellal, M. Mehri, Synthesis, characterization and the inhibition activity of a new α -aminophosphonic derivative on the corrosion of XC48 carbon steel in 0.5M H₂SO₄: Experimental and theoretical studies, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* 70 (2017) 331–344. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.10.026>.
- [25] K. Benbouguerra, S. Chafaa, N. Chafai, M. Mehri, O. Moumeni, A. Hellal, Synthesis, spectroscopic characterization and a comparative study of the corrosion inhibitive efficiency of an α -aminophosphonate and Schiff base derivatives: Experimental and theoretical investigations, *Journal of Molecular Structure.* 1157 (2018) 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.12.049>.
- [26] L. Ouksel, S. Chafaa, R. Bourzami, N. Hamdouni, M. Sebais, N. Chafai, Crystal structure, vibrational, spectral investigation, quantum chemical DFT calculations and thermal behavior of Diethyl [hydroxy (phenyl) methyl] phosphonate, *Journal of Molecular Structure.* 1144 (2017) 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.05.029>.
- [27] F. Jones, A. Oliveira, A.L. Rohl, G.M. Parkinson, M.I. Ogden, M.M. Reyhani, Investigation into the effect of phosphonate inhibitors on barium sulfate precipitation, *Journal of Crystal Growth.* 237–239 (2002) 424–429. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(01\)01961-3](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(01)01961-3).
- [28] T. Zhou, D. Wang, S. Chun-Kiat Goh, J. Hong, J. Han, J. Mao, R. Xu, Bio-inspired organic cobalt(II) phosphonates toward water oxidation, *Energy Environ. Sci.* 8 (2015) 526–534. <https://doi.org/10.1039/C4EE03234A>.

- [29] M. Djenane, S. Chafaa, N. Chafai, R. Kerkour, A. Hellal, Synthesis, spectral properties and corrosion inhibition efficiency of new ethyl hydrogen [(methoxyphenyl) (methylamino) methyl] phosphonate derivatives: Experimental and theoretical investigation, *Journal of Molecular Structure*. 1175 (2019) 398–413. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.07.087>.
- [30] S. Chafaa, J. Meullemeestre, M.-J. Schwing, F. Vierling, V. Böhmer, W. Vogt, (*o*-Hydroxyphenyl)methylphosphonic Acids: Spectrophotometric determination of their K_a values and of the deprotonation sequence, *HCA*. 76 (1993) 1425–1434. <https://doi.org/10.1002/hlca.19930760403>.
- [31] N. Aliouane, J.J. Hélesbeux, T. Douadi, M.A. Khan, G. Bouet, S. Chafaa, O. Duval, Synthesis of new benzylic di-, tri-, and tetraphosphonic acids as potential chelating agents, *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*. 186 (2011) 354–364. <https://doi.org/10.1080/10426507.2010.502161>.
- [32] P. Kafarski, B. Lejczak, Aminophosphonic Acids of Potential Medical Importance, *CMCACA*. 1 (2001) 301–312. <https://doi.org/10.2174/1568011013354543>.
- [33] S. Bhagat, A.K. Chakraborti, An Extremely Efficient Three-Component Reaction of Aldehydes/Ketones, Amines, and Phosphites (Kabachnik–Fields Reaction) for the Synthesis of α -Aminophosphonates Catalyzed by Magnesium Perchlorate, *J. Org. Chem*. 72 (2007) 1263–1270. <https://doi.org/10.1021/jo062140i>.
- [34] E. De Clercq, Clinical Potential of the Acyclic Nucleoside Phosphonates Cidofovir, Adefovir, and Tenofovir in Treatment of DNA Virus and Retrovirus Infections, *Clin Microbiol Rev*. 16 (2003) 569–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.569-596.2003>.
- [35] R.L. Baldwin, Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding, by A. Fersht. 1999. New York: Freeman. 631 pp., *Protein Science*. 9 (2008) 207–207. <https://doi.org/10.1110/ps.9.1.207>.
- [36] T. Klenner, F. Wingen, B.K. Keppler, B. Krempien, D. SchmÄhl, Anticancer-agent-linked phosphonates with antiosteolytic and antineoplastic properties: a promising perspective in the treatment of bone-related malignancies?, *J Cancer Res Clin Oncol*. 116 (1990) 341–350. <https://doi.org/10.1007/BF01612916>.
- [37] M. Psurski, Ł. Janczewski, M. Świtalska, A. Gajda, T.M. Goszczyński, J. Oleksyszyn, J. Wietrzyk, T. Gajda, Novel phosphonate analogs of sulforaphane: Synthesis, *in vitro*

- and in vivo anticancer activity, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 132 (2017) 63–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.028>.
- [38] A. Kraszewski, M. Sobkowski, J. Stawinski, H-Phosphonate Chemistry in the Synthesis of Electrically Neutral and Charged Antiviral and Anticancer Pronucleotides, *Frontiers in Chemistry*. 8 (2020) 948. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.595738>.
- [39] X.-C. Huang, M. Wang, Y.-M. Pan, G.-Y. Yao, H.-S. Wang, X.-Y. Tian, J.-K. Qin, Y. Zhang, Synthesis and antitumor activities of novel thiourea α -aminophosphonates from dehydroabietic acid, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 69 (2013) 508–520. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.055>.
- [40] A. Reichenberg, J. Wiesner, C. Weidemeyer, E. Dreiseidler, S. Sanderbrand, B. Altincicek, E. Beck, M. Schlitzer, H. Jomaa, Diaryl ester prodrugs of fR900098 with improved in vivo antimalarial activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 11 (2001) 833–835. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00075-0).
- [41] S. Lutz, Longo, Johnstone, Samarium-153-ethylene diamine tetramethylene phosphonate, a beta-emitting bone-targeted radiopharmaceutical, useful for patients with osteoblastic bone metastases, *CMAR*. (2013) 235. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S35789>.
- [42] S.P. Luckman, D.E. Hughes, F.P. Coxon, R.G.G. Russell, M.J. Rogers, Nitrogen-Containing Bisphosphonates Inhibit the Mevalonate Pathway and Prevent Post-Translational Prenylation of GTP-Binding Proteins, Including Ras, *J Bone Miner Res*. 13 (1998) 581–589. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.4.581>.
- [43] J.A.D.S. Emim, A.B. Oliveira, A.J. Lapa, Pharmacological Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of a Citrus Bioflavonoid, Hesperidin, and the Isoflavonoids, Duartin and Claussequinone, in Rats and Mice, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 46 (2011) 118–122. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03753.x>.
- [44] R.K. Mookerjee, T.-P. Lee, H.A. Lippes, E. Middleton, Some Effects of Flavonoids on Lymphocyte Proliferative Responses, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 8 (1986) 371–392. <https://doi.org/10.3109/08923978609026495>.
- [45] S.Y. Namgoong, C.H. Lee, H.P. Kim, Effects of isoflavonoids on mouse lymphocyte proliferation in vitro, *Arch. Pharm. Res*. 17 (1994) 236–239. <https://doi.org/10.1007/BF02980453>.

- [46] K. Serge, Guide de chimie médicinale et médicaments, Lavoisier, 2010.
- [47] S. Yang, X.-W. Gao, C.-L. Diao, B.-A. Song, L.-H. Jin, G.-F. Xu, G.-P. Zhang, W. Wang, D.-Y. Hu, W. Xue, X. Zhou, P. Lu, Synthesis and Antifungal Activity of Novel Chiral α -Aminophosphonates Containing Fluorine Moiety, *Chin. J. Chem.* 24 (2006) 1581–1588. <https://doi.org/10.1002/cjoc.200690296>.
- [48] P. Kafarski, B. Lejczak, E. Slesak, J. Przetocki, Plant growth regulating activity of aromatic aminophosphonates and their short peptides, *Pestic. Sci.* 25 (1989) 137–143. <https://doi.org/10.1002/ps.2780250205>.
- [49] E.D. Naydenova, P.T. Todorov, K.D. Troev, Recent synthesis of aminophosphonic acids as potential biological importance, *Amino Acids.* 38 (2010) 23–30. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0254-7>.
- [50] B. Lejczak, P. Kafarski, Biological Activity of Aminophosphonic Acids and Their Short Peptides, in: R.K. Bansal (Ed.), *Phosphorous Heterocycles I*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009: pp. 31–63. https://doi.org/10.1007/7081_2008_14.
- [51] A. Mucha, P. Kafarski, Ł. Berlicki, Remarkable Potential of the α -Aminophosphonate/Phosphinate Structural Motif in Medicinal Chemistry, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 5955–5980. <https://doi.org/10.1021/jm200587f>.
- [52] Y.-Y. Chen, Y.-P. Bai, B. Li, X.-B. Zhao, C.-J. Yang, Y.-Q. Liu, J.-M. Gao, J. Guo, C. Li, J.-W. Peng, Z.-M. Zhao, Z.-J. Zhang, C.-R. Xu, Design and synthesis of novel 20(S)- α -aminophosphonate derivatives of camptothecin as potent antitumor agents, *Bioorganic Chemistry.* 114 (2021) 105065. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105065>.
- [53] J. Ma, J. Li, P. Guo, X. Liao, H. Cheng, Synthesis and antitumor activity of novel indole derivatives containing α -aminophosphonate moieties, *Arabian Journal of Chemistry.* 14 (2021) 103256. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103256>.
- [54] S.K. Balam, J. Soora Harinath, S.K. Krishnammagari, R.R. Gajjala, K. Polireddy, V.B. Baki, W. Gu, K.R. Valasani, V.K.R. Avula, S. Vallela, G.V. Zyryanov, V.R. Pasupuleti, S.R. Cirandur, Synthesis and Anti-Pancreatic Cancer Activity Studies of Novel 3-Amino-2-hydroxybenzofused 2-Phospha- γ -lactones, *ACS Omega.* 6 (2021) 11375–11388. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00360>.

- [55] S. Poola, S. Nagaripati, S. Tellamekala, V. Chintha, P. Kotha, J.R. Yagani, N. Golla, S.R. Cirandur, Green synthesis, antibacterial, antiviral and molecular docking studies of α -aminophosphonates, *Synthetic Communications*. 50 (2020) 2655–2672.
<https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1753079>.
- [56] Z. H. Kudzin, M. H. Kudzin, J. Drabowicz, C. V. Stevens, Aminophosphonic Acids - Phosphorus Analogues of Natural Amino Acids. Part 1: Syntheses of α -Aminophosphonic Acids, *COC*. 15 (2011) 2015–2071.
<https://doi.org/10.2174/138527211795703612>.
- [57] R.A. Cherkasov, V.I. Galkin, The Kabachnik–Fields reaction: synthetic potential and the problem of the mechanism, *Russ. Chem. Rev.* 67 (1998) 857–882.
<https://doi.org/10.1070/RC1998v067n10ABEH000421>.
- [58] G. Keglevich, E. Bálint, The Kabachnik–Fields Reaction: Mechanism and Synthetic Use, *Molecules*. 17 (2012) 12821–12835. <https://doi.org/10.3390/molecules171112821>.
- [59] M.I. Kabachnik, T.Y. Medved', N.M. Dyatlova, O.G. Arkhipova, M.V. Rudomino, Organophosphorus Complexones, *Russ. Chem. Rev.* 37 (1968) 503–518.
<https://doi.org/10.1070/RC1968v037n07ABEH001662>.
- [60] I.V. Galkina, K.R. Khayarov, R.R. Davletshin, A.Z. Gaynullin, A.V. Gerasimov, M.P. Shulaeva, O.K. Pozdeev, S.N. Egorova, L.M. Usupova, V.I. Galkin, The Pudovik reaction: the synthesis of bioactive α -aminophosphonates with long alkyl chains, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 194 (2019) 463–466.
<https://doi.org/10.1080/10426507.2018.1539848>.
- [61] S.L. McDonald, Q. Wang, Copper-Catalyzed α -Amination of Phosphonates and Phosphine Oxides: A Direct Approach to α -Amino Phosphonic Acids and Derivatives, *Angew. Chem.* 126 (2014) 1898–1902. <https://doi.org/10.1002/ange.201308890>.
- [62] K. Ramakrishna, J.M. Thomas, C. Sivasankar, A Green Approach to the Synthesis of α -Amino Phosphonate in Water Medium: Carbene Insertion into the N–H Bond by Cu(I) Catalyst, *J. Org. Chem.* 81 (2016) 9826–9835. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b01940>.
- [63] N.S. Zefirov, E.D. Matveeva, Catalytic Kabachnik-Fields reaction: new horizons for old reaction, *Arkivoc*. 2008 (2008) 1–17.
<https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0009.101>.

- [64] S. Sobhani, Z. Tashrifi, Al(OTf)₃ as an Efficient Catalyst for One-Pot Synthesis of Primary Diethyl 1-Aminophosphonates Under Solvent-Free Conditions, *Synthetic Communications*. 39 (2008) 120–131. <https://doi.org/10.1080/00397910802369695>.
- [65] H. Firouzabadi, N. Iranpoor, S. Sobhani, Metal Triflate-Catalyzed One-Pot Synthesis of α -Aminophosphonates from Carbonyl Compounds in the Absence of Solvent, *Synthesis*. 2004 (2004) 2692–2696. <https://doi.org/10.1055/s-2004-831251>.
- [66] B.C. Ranu, A. Hajra, U. Jana, General Procedure for the Synthesis of α -Amino Phosphonates from Aldehydes and Ketones Using Indium(III) Chloride as a Catalyst, *Org. Lett.* 1 (1999) 1141–1143. <https://doi.org/10.1021/ol990079g>.
- [67] E.D. Matveeva, T.A. Podrugina, E.V. Tishkovskaya, L.G. Tomilova, N.S. Zefirov, A Novel Catalytic Three-Component Synthesis (Kabachnik-Fields Reaction) of α -Aminophosphonates from Ketones, *Synlett.* (2003) 2321–2324. <https://doi.org/10.1055/s-2003-42118>.
- [68] B. Kaboudin, A. Rahmani, Silica-Supported Ammonium Hydrogen Carbonate as an Efficient Reagent for One-Pot Synthesis of 1-Aminophosphonates from Aldehydes, *Synthesis*. (2003) 2705–2708. <https://doi.org/10.1055/s-2003-42427>.
- [69] P.S. Bhadury, Y. Zhang, S. Zhang, B. Song, S. Yang, D. Hu, Z. Chen, W. Xue, L. Jin, An effective route to fluorine containing asymmetric α -aminophosphonates using chiral Bronsted acid catalyst, *Chirality*. 21 (2009) 547–557. <https://doi.org/10.1002/chir.20645>.
- [70] B.C. Ranu, A. Hajra, A simple and green procedure for the synthesis of α -aminophosphonate by a one-pot three-component condensation of carbonyl compound, amine and diethyl phosphite without solvent and catalyst, *Green Chem.* 4 (2002) 551–554. <https://doi.org/10.1039/B205747F>.
- [71] S. Guezane-Lakoud, M. Toffano, L. Aribi-Zouioueche, Promiscuous lipase catalyzed a new P-C bond formation: Green and efficient protocol for one-pot synthesis of α -aminophosphonates, *Heteroatom Chem.* 28 (2017) e21408. <https://doi.org/10.1002/hc.21408>.
- [72] J.S. Yadav, B.V.S. Reddy, P. Sreedhar, An eco-friendly approach for the synthesis of α -aminophosphonates using ionic liquids, *Green Chem.* 4 (2002) 436–438. <https://doi.org/10.1039/B203934F>.

- [73] E. Bálint, E. Fazekas, A. Tripolszky, R. Kangyal, M. Milen, G. Keglevich, Synthesis of α -Aminophosphonate Derivatives by Microwave-Assisted Kabachnik–Fields Reaction, Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. 190 (2015) 655–659. <https://doi.org/10.1080/10426507.2014.984022>.
- [74] B. Dar, A. Singh, A. Sahu, P. Patidar, A. Chakraborty, M. Sharma, B. Singh, Catalyst and solvent-free, ultrasound promoted rapid protocol for the one-pot synthesis of α -aminophosphonates at room temperature, Tetrahedron Letters. 53 (2012) 5497–5502. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.07.123>.
- [75] M. Juribasic, L. Stella, Z. Marinic, M. Vinkovic, P. Traldi, L. Tusek-Bozic, Unexpected Course of Kabachnik-Fields Reaction in the Microwave Synthesis of Quinoline-Based α -Aminophosphonates, LOC. 6 (2009) 11–16. <https://doi.org/10.2174/157017809787003142>.
- [76] R. Gancarz, Nucleophilic addition to carbonyl compounds. competition between hard (amine) and soft (phosphite) nucleophile, Tetrahedron. 51 (1995) 10627–10632. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00634-K](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00634-K).
- [77] K.M. Yager, C.M. Taylor, A.B. Smith, Asymmetric Synthesis of α -Aminophosphonates via Diastereoselective Addition of Lithium Diethyl Phosphite to Chelating Imines, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 9377–9378. <https://doi.org/10.1021/ja00099a084>.
- [78] A. Klepacz, A. Zwierzak, An expeditious one-pot synthesis of diethyl N-Boc-1-aminoalkylphosphonates, Tetrahedron Letters. 43 (2002) 1079–1080. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)02289-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)02289-4).
- [79] S. Doye, Development of the Ti-Catalyzed Intermolecular Hydroamination of Alkynes, Synlett. (2004) 1653–1672. <https://doi.org/10.1055/s-2004-829579>.
- [80] I. Schlemminger, A. Willecke, W. Maison, R. Koch, A. Lützen, J. Martens, Diastereoselective Lewis acid mediated hydrophosphonylation of heterocyclic imines: a stereoselective approach towards $\hat{\pm}$ -amino phosphonates, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. (2001) 2804–2816. <https://doi.org/10.1039/b101501j>.
- [81] S. Laschat, H. Kunz, Carbohydrates as Chiral Templates: Stereoselective Synthesis of (R)- and (S)- α -Aminophosphonic Acid Derivatives, Synthesis. 1992 (1992) 90–95. <https://doi.org/10.1055/s-1992-34155>.

- [82] G. Keglevich, ed., 6. Synthesis of α -aminophosphonates by the Kabachnik–Fields reaction and by the Pudovik reaction, in: *Organophosphorus Chemistry*, De Gruyter, 2018: pp. 108–147. <https://doi.org/10.1515/9783110535839-006>.
- [83] M. Ordóñez, H. Rojas-Cabrera, C. Cativiela, An overview of stereoselective synthesis of α -aminophosphonic acids and derivatives, *Tetrahedron*. 65 (2009) 17–49. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.09.083>.
- [84] F. Orsini, G. Sello, M. Sisti, *Aminophosphonic Acids and Derivatives. Synthesis and Biological Applications*, CMC. 17 (2010) 264–289. <https://doi.org/10.2174/092986710790149729>.
- [85] M. Ordóñez, F.J. Sayago, C. Cativiela, Synthesis of quaternary α -aminophosphonic acids, *Tetrahedron*. 68 (2012) 6369–6412. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.05.008>.
- [86] R. Huber, A. Knierzinger, J.-P. Obrecht, A. Vasella, Nucleophilic Additions to N-Glycosylnitrones. Asymmetric Synthesis of β -Aminophosphonic Acids, *Helv. Chim. Acta*. 68 (1985) 1730–1747. <https://doi.org/10.1002/hlca.19850680629>.
- [87] K. Moedritzer, R.R. Irani, The Direct Synthesis of α -Aminomethylphosphonic Acids. Mannich-Type Reactions with Orthophosphorous Acid, *J. Org. Chem.* 31 (1966) 1603–1607. <https://doi.org/10.1021/jo01343a067>.
- [88] L. Ouksel Lahmidi, *Synthèse, propriétés spectrales, efficacité inhibitrice de corrosion et activité biologique d'une série d'hydroxyphosphonates: étude expérimentale et théorique*, PhD Thesis, 2018.
- [89] A. Michaelis, R. Kaehne, Ueber das Verhalten der Jodalkyle gegen die sogen. Phosphorigsäureester oder O-Phosphine, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 31 (1898) 1048–1055. <https://doi.org/10.1002/cber.189803101190>.
- [90] G.G. Rajeshwaran, M. Nandakumar, R. Sureshbabu, A.K. Mohanakrishnan, Lewis Acid-Mediated Michaelis–Arbuzov Reaction at Room Temperature: A Facile Preparation of Arylmethyl/Heteroarylmethyl Phosphonates, *Org. Lett.* 13 (2011) 1270–1273. <https://doi.org/10.1021/ol1029436>.
- [91] P. Savignac, B. Iorga, *Modern phosphonate chemistry*, CRC press, 2003.
- [92] B. Kaboudin, H. Haghighat, T. Yokomatsu, Synthesis of a New Class of Phosphinic Acids: Synthesis of Novel Four-Membered Cyclic Oxaphosphetanes by Intramolecular Mitsunobu Reaction of Bis(α -hydroxyalkyl)phosphinic Acids, *Synthesis*. 2011 (2011) 3185–3189. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1260170>.

- [93] A.N. Pudovik, I.V. Konovalova, Addition Reactions of Esters of Phosphorus(III) Acids with Unsaturated Systems, *Synthesis*. 1979 (1979) 81–96. <https://doi.org/10.1055/s-1979-28566>.
- [94] J.-L. Montchamp, Phosphinate chemistry in the 21st century: a viable alternative to the use of phosphorus trichloride in organophosphorus synthesis., *Accounts of Chemical Research*. 47 (2014) 77–87.
- [95] G.A.C. Murrell, M.J.O. Francis, L. Bromley, Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals, *Biochemical Journal*. 265 (1990) 659–665. <https://doi.org/10.1042/bj2650659>.
- [96] J.R. Roede, D.P. Jones, Reactive species and mitochondrial dysfunction: Mechanistic significance of 4-hydroxynonenal, *Environ. Mol. Mutagen.* (2010) NA-NA. <https://doi.org/10.1002/em.20553>.
- [97] O.I. Aruoma, Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *J Amer Oil Chem Soc.* 75 (1998) 199–212. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0032-9>.
- [98] J.-L. Beaudoux, J. Peynet, D. Bonnefont-Rousselot, P. Therond, J. Delattre, A. Legrand, Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 64 (2006) 373–381. [https://doi.org/10.1016/S0003-4509\(06\)75332-9](https://doi.org/10.1016/S0003-4509(06)75332-9).
- [99] D. Thomas, *Les antioxydants de nos jours : définition et applications*, (2016) 88.
- [100] B. Halliwell, C.E. Cross, Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress., *Environmental Health Perspectives*. 102 (1994) 5–12. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s105>.
- [101] G. Kocsy, I. Tari, R. Vanková, B. Zechmann, Z. Gulyás, P. Poór, G. Galiba, Redox control of plant growth and development, *Plant Science*. 211 (2013) 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.07.004>.
- [102] B. Oyinloye, A. Adenowo, A. Kappo, Reactive Oxygen Species, Apoptosis, Antimicrobial Peptides and Human Inflammatory Diseases, *Pharmaceuticals*. 8 (2015) 151–175. <https://doi.org/10.3390/ph8020151>.
- [103] B. Halliwell, Free radicals and metal ions in health and disease, *Proceedings of the Nutrition Society*. 46 (1987) 13–26. <https://doi.org/10.1079/PNS19870004>.

- [104] K.W. Jeon, *International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology*, Elsevier, 2004.
- [105] M. Martínez-Cayuela, Oxygen free radicals and human disease, *Biochimie*. 77 (1995) 147–161. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)88119-3](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)88119-3).
- [106] L. Chen, J.Y. Hu, S.Q. Wang, The role of antioxidants in photoprotection: A critical review, *Journal of the American Academy of Dermatology*. 67 (2012) 1013–1024. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2012.02.009>.
- [107] R. Belaïch, S. Boujraf, Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés : effets et stratégies thérapeutiques, *Médecine des Maladies Métaboliques*. 10 (2016) 38–42. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(16\)30009-8](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(16)30009-8).
- [108] G. Farrugia, R. Balzan, Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast, *Frontiers in Oncology*. 2 (2012) 64. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00064>.
- [109] C. Ross, L. Santiago-Vázquez, V. Paul, Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Aquatic Toxicology*. 78 (2006) 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.007>.
- [110] K. Jomova, Z. Jenisova, M. Feszterova, S. Baros, J. Liska, D. Hudecova, C.J. Rhodes, M. Valko, Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease: Toxicity of arsenic, *J. Appl. Toxicol.* (2011) n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jat.1649>.
- [111] R. Barouki, Stress oxydant et vieillissement, *Med Sci (Paris)*. 22 (2006) 266–272. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006223266>.
- [112] A. Favier, Stress oxydant et pathologies humaines, *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 64 (2006) 390–396. [https://doi.org/10.1016/S0003-4509\(06\)75334-2](https://doi.org/10.1016/S0003-4509(06)75334-2).
- [113] V. M. Costa, F. Carvalho, M. L. Bastos, R. A. Carvalho, M. Carvalho, F. Remiao, Contribution of Catecholamine Reactive Intermediates and Oxidative Stress to the Pathologic Features of Heart Diseases, *CMC*. 18 (2011) 2272–2314. <https://doi.org/10.2174/092986711795656081>.
- [114] B.O. Ajayi, I.A. Adedara, E.O. Farombi, Benzo(a)pyrene induces oxidative stress, pro-inflammatory cytokines, expression of nuclear factor-kappa B and deregulation of wnt/beta-catenin signaling in colons of BALB/c mice, *Food and Chemical Toxicology*. 95 (2016) 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.019>.

- [115] A. Rezaie, R.D. Parker, M. Abdollahi, Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause?, *Dig Dis Sci.* 52 (2007) 2015–2021. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9622-2>.
- [116] S. Reuter, S.C. Gupta, M.M. Chaturvedi, B.B. Aggarwal, Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?, *Free Radical Biology and Medicine.* 49 (2010) 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
- [117] C. Repka, R. Hayward, Oxidative Stress and Fitness Changes in Cancer Patients following Exercise Training, *Medicine & Science in Sports & Exercise.* 48 (2015) 1. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000821>.
- [118] J.D. Hayes, A.T. Dinkova-Kostova, K.D. Tew, Oxidative Stress in Cancer, *Cancer Cell.* 38 (2020) 167–197. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>.
- [119] B. Halliwell, Oxidative stress and cancer: have we moved forward?, *Biochemical Journal.* 401 (2007) 1–11. <https://doi.org/10.1042/BJ20061131>.
- [120] J.N. Cobley, M.L. Fiorello, D.M. Bailey, 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress, *Redox Biology.* 15 (2018) 490–503. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>.
- [121] A. Singh, R. Kukreti, L. Saso, S. Kukreti, Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases, *Molecules.* 24 (2019) 1583. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>.
- [122] S. Losada-Barreiro, C. Bravo-Díaz, Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases, *European Journal of Medicinal Chemistry.* 133 (2017) 379–402. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.061>.
- [123] N.A. Simonian, J.T. Coyle, Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36 (1996) 83–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.36.040196.000503>.
- [124] R.A. DeFronzo, E. Ferrannini, L. Groop, R.R. Henry, W.H. Herman, J.J. Holst, F.B. Hu, C.R. Kahn, I. Raz, G.I. Shulman, D.C. Simonson, M.A. Testa, R. Weiss, Type 2 diabetes mellitus, *Nat Rev Dis Primers.* 1 (2015) 15019. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>.
- [125] O. Aouacheri, S. Saka, M. Krim, A. Messaadia, I. Maldi, The Investigation of the Oxidative Stress-Related Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus, *Canadian Journal of Diabetes.* 39 (2015) 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2014.03.002>.

- [126] A. Ceriello, Oxidative Stress and Diabetes-Associated Complications, *Endocrine Practice*. 12 (2006) 60–62. <https://doi.org/10.4158/EP.12.S1.60>.
- [127] S. Vertuani, A. Angusti, S. Manfredini, The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview, *CPD*. 10 (2004) 1677–1694. <https://doi.org/10.2174/1381612043384655>.
- [128] B. Halliwell, Antioxidants: The Basics-what they are and how to Evaluate them, in: *Advances in Pharmacology*, Elsevier, 1996: pp. 3–20. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60976-X](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60976-X).
- [129] M. Bandyopadhyay, R. Chakraborty, U. Raychaudhuri, A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh), *LWT - Food Science and Technology*. 40 (2007) 842–851. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.05.007>.
- [130] J. Flieger, W. Flieger, J. Baj, R. Maciejewski, Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles, *Materials*. 14 (2021) 4135. <https://doi.org/10.3390/ma14154135>.
- [131] E. Atta, N. Mohamed, A. Abdelgawad, Antioxidants: An Overview on the Natural and Synthetic Types, *European Chemical Bulletin*. 6 (2017) 365. <https://doi.org/10.17628/ecb.2017.6.374-384>.
- [132] J. Pincemail, C. Heusele, F. Bonté, R. Limet, J.O. Defraigne, Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement, *Actualité Médicale Internationale. Métabolismes-Hormones–Nutrition*. 5 (2001) 158–164.
- [133] O.M. Ighodaro, O.A. Akinloye, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine*. 54 (2018) 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
- [134] I. Mirończuk-Chodakowska, A.M. Witkowska, M.E. Zujko, Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body, *Advances in Medical Sciences*. 63 (2018) 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>.
- [135] H. Sies, W. Stahl, Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 62 (1995) 1315S-1321S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1315S>.

- [136] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, *Food Chemistry*. 125 (2011) 288–306.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012>.
- [137] M. Sarazin, J. Lagarde, P. Olivieri, Maladie d'Alzheimer, *Revue Neurologique*. 176 (2020) S142. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2020.01.035>.
- [138] S. Maire, P.-O. Lang, G. Kaltenbach, T. Vogel, Les traitements symptomatiques de la maladie d'Alzheimer : analyse descriptive des modalités de prescription en EHPAD, *NPG Neurologie - Psychiatrie - Gériatrie*. 13 (2013) 355–364.
<https://doi.org/10.1016/j.npg.2013.08.003>.
- [139] D. Fotiou, A. Kaltsatou, D. Tsiptsios, M. Nakou, Evaluation of the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease with neuropsychological methods, *Aging Clin Exp Res*. 27 (2015) 727–733. <https://doi.org/10.1007/s40520-015-0321-8>.
- [140] V.N. Talesa, Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease, *Mechanisms of Ageing and Development*. 122 (2001) 1961–1969. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00309-8](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00309-8).
- [141] S. Darvesh, D.A. Hopkins, C. Geula, Neurobiology of butyrylcholinesterase, *Nat Rev Neurosci*. 4 (2003) 131–138. <https://doi.org/10.1038/nrn1035>.
- [142] J. Massoulié, J. Sussman, S. Bon, I. Silman, Chapter 15: Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, in: *Progress in Brain Research*, Elsevier, 1993: pp. 139–146. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)62391-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62391-2).
- [143] M. Mesulam, A. Guillozet, P. Shaw, B. Quinn, Widely Spread Butyrylcholinesterase Can Hydrolyze Acetylcholine in the Normal and Alzheimer Brain, *Neurobiology of Disease*. 9 (2002) 88–93. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0462>.
- [144] D. Raccah, Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré, *EMC - Endocrinologie*. 1 (2004) 29–42.
<https://doi.org/10.1016/j.emcend.2003.10.003>.
- [145] P. BALAGANI, Dr.S. Karimulla, ANTIDIABETIC AND ANTIHYPERLIPIDEMIC ACTIVITY OF BARK OF BRUGUIERA GYMNORRHIZA ON STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC RATS, 2021.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.10470.04163>.
- [146] D. Bonnefont-Rousselot, The Role of Antioxidant Micronutrients in the Prevention of Diabetic Complications:, *Treatments in Endocrinology*. 3 (2004) 41–52.
<https://doi.org/10.2165/00024677-200403010-00005>.

- [147] The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*. 20 (1997) 1183–1197. <https://doi.org/10.2337/diacare.20.7.1183>.
- [148] N. Chevalier, P. Fénichel, Obésité, diabète de type 2 et perturbateurs endocriniens, *La Presse Médicale*. 45 (2016) 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2015.08.008>.
- [149] A. Tielmans, M. Laloi-Michelin, M. Coupaye, M. Virally, T. Meas, P.-J. Guillausseau, Traitement médicamenteux du diabète de type 2 (première partie), *La Presse Médicale*. 36 (2007) 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2006.10.017>.
- [150] A. Tielmans, M. Virally, M. Coupaye, M. Laloi-Michelin, T. Méas, P.-J. Guillausseau, Traitement médicamenteux du diabète de type 2 (deuxième partie), *La Presse Médicale*. 36 (2007) 467–474. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2006.11.015>.
- [151] F. Bosquet, A. Hartemann-Heurtier, Insulinothérapie dans le diabète de type 2, *EMC - Endocrinologie*. 1 (2004) 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.emcend.2003.10.006>.
- [152] S. Halimi, P. Raskin, A. Liebl, R. Kawamori, G. Fulcher, G. Yan, Efficacy of biphasic insulin aspart in patients with type 2 diabetes, *Clinical Therapeutics*. 27 (2005) S57–S74. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.11.021>.
- [153] N.R. Salama, M.L. Hartung, A. Müller, Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*, *Nat Rev Microbiol*. 11 (2013) 385–399. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3016>.
- [154] S.S. Devesa, W.J. Blot, J.F. Fraumeni, Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States, *Cancer*. 83 (1998) 2049–2053. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19981115\)83:10<2049::AID-CNCR1>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19981115)83:10<2049::AID-CNCR1>3.0.CO;2-2).
- [155] Y. Geng, S. Zhu, Z. Lu, H. Xu, J.-S. Shi, Z.-H. Xu, Anti-inflammatory Activity of Mycelial Extracts from Medicinal Mushrooms, *Int J Med Mushrooms*. 16 (2014) 319–325. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v16.i4.20>.
- [156] B. Du, F. Zhu, B. Xu, An insight into the anti-inflammatory properties of edible and medicinal mushrooms, *Journal of Functional Foods*. 47 (2018) 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.003>.
- [157] C. Pasquier, Stress oxydatif et inflammation, *Revue Française des Laboratoires*. 1995 (1995) 87–92. [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(95\)80364-5](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(95)80364-5).

- [158] D. Muster, Médicaments de l'inflammation, EMC - Stomatologie. 1 (2005) 21–29.
<https://doi.org/10.1016/j.emcsto.2005.01.005>.
- [159] C.N. Serhan, P.A. Ward, D.W. Gilroy, Fundamentals of Inflammation, Cambridge University Press, 2010.
- [160] J.M. Cavaillon, Cytokines et inflammation, Veterinary Research. 24 (1993) 368–369.
- [161] F. Pillon, Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, Actualités Pharmaceutiques. 53 (2014) 43–46. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2014.01.009>.
- [162] P.C. Gotzsche, Extracts from “Clinical Evidence”: Non-steroidal anti-inflammatory drugs, BMJ. 320 (2000) 1058–1061. <https://doi.org/10.1136/bmj.320.7241.1058>.
- [163] C. Sostres, C.J. Gargallo, M.T. Arroyo, A. Lanas, Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract, Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 24 (2010) 121–132.
<https://doi.org/10.1016/j.bpg.2009.11.005>.
- [164] D.N.R. Payne, I.M. Adcock, Molecular mechanisms of corticosteroid actions, Paediatric Respiratory Reviews. 2 (2001) 145–150.
<https://doi.org/10.1053/prrv.2000.0122>.
- [165] R.U. Shaikh, M.M. Pund, R.N. Gacche, Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo, Journal of Traditional and Complementary Medicine. 6 (2016) 355–361.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.07.001>.
- [166] S. Chastant-Maillard, Déclenchement de la mise bas chez les ruminants et effets secondaires des corticoïdes utilisés pour interrompre les gestations, 76 (2014).
- [167] M. Démarchez, Le rayonnement solaire et la peau: définitions, (2012).
- [168] B. Dréno, Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes, Annales de Dermatologie et de Vénérologie. 136 (2009) S247–S251.
[https://doi.org/10.1016/S0151-9638\(09\)72527-X](https://doi.org/10.1016/S0151-9638(09)72527-X).
- [169] J. Bejar, Peau, soleil et photosensibilisation médicamenteuse exogène: exemple du kétoprofène, PhD Thesis, Thèse de doctorat en pharmacie. Université Joseph Fourier. Faculté de ..., 2012.
- [170] A. Méliopoulos, C. Levacher, La peau: structure et physiologie, 2e éd., Éd. Tec & doc-Lavoisier, Paris, 2012.

- [171] Pharm'Aging, La peau et le vieillissement cutané, Pharm'Aging. (2019).
<https://www.pharmaging.com/peau-et-vieillissement-cutane/> (accessed November 7, 2021).
- [172] L. Christensen, A. Suggs, E. Baron, Ultraviolet Photobiology in Dermatology, in: S.I. Ahmad (Ed.), Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment, Springer International Publishing, Cham, 2017: pp. 89–104. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_8.
- [173] P. Amblard, Photoprotection, Journal de Pédiatrie et de Puériculture. 13 (2000) 390–395. [https://doi.org/10.1016/S0987-7983\(00\)80032-8](https://doi.org/10.1016/S0987-7983(00)80032-8).
- [174] S. Bourges, La peau: action du soleil et photoprotection, (1995).
- [175] J. Dias-Ferreira, A.R. Fernandes, J.L. Soriano, B.C. Naveros, P. Severino, C.F. da Silva, E.B. Souto, Skin rejuvenation: Biopolymers applied to UV sunscreens and sheet masks, in: Biopolymer Membranes and Films, Elsevier, 2020: pp. 309–330.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818134-8.00013-4>.
- [176] J.-C. Beani, Produits de protection solaire : efficacité et risques, Annales de Dermatologie et de Vénérologie. 139 (2012) 261–272.
<https://doi.org/10.1016/j.annder.2012.01.022>.
- [177] M.D. Mota, R.Y.S. Costa, A. aa S. Guedes, L.C.R.C. e Silva, F.A. Chinalia, Guava-fruit extract can improve the UV-protection efficiency of synthetic filters in sun cream formulations, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 201 (2019) 111639. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111639>.
- [178] V. Cattoir, F. Denis, C. Martin, M.-C. Ploy, C. Poyart, Bactériologie médicale: Techniques usuelles, Elsevier Health Sciences, 2016.
- [179] S.E. Anbassi, V. Bianchi, C. Duployez, Bactériologie virologie, De Boeck Supérieur, 2019.
- [180] D. Yala, A.S. Merad, D. Mohamedi, M.N.O. Korich, Classification et mode d'action des antibiotiques, (2001) 8.
- [181] B.H. Normark, S. Normark, Evolution and spread of antibiotic resistance, J Intern Med. 252 (2002) 91–106. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.01026.x>.
- [182] L. Rizzo, C. Maniaia, C. Merlin, T. Schwartz, C. Dagot, M.C. Ploy, I. Michael, D. Fatta-Kassinos, Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant

- bacteria and genes spread into the environment: A review, *Science of The Total Environment*. 447 (2013) 345–360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>.
- [183] M. Ferech, S. Coenen, S. Malhotra-Kumar, K. Dvorakova, E. Hendrickx, C. Suetens, H. Goossens, European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58 (2006) 401–407. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1188>.

CHAPITRE II
ANALYSES ET
METHODES
EXPERIMENTALES.

II.1 Introduction

Ce chapitre est consacré aux différentes techniques d'analyse physico-chimiques utilisées pour identifier les dérivés α -aminophosphonates synthétisés à partir d'une série de trois aminophénols ainsi que les réactifs et les méthodes expérimentales utilisées au cours des tests d'applications pour évaluer in vitro les activités biologiques.

II.2 Méthodes analytiques et appareils

II.2.1 Point de fusion

La détermination du point de fusion est une donnée physique importante d'une substance. Les points de fusion des produits préparés ainsi que les produits de départ sont déterminés en capillaire à l'aide d'un fusiomètre *BÜCHI Melting point B-540*.

II.2.2 Chromatographie

Les chromatographies analytiques (CCM) ont été effectuées sur des plaques Merck en aluminium recouvertes de gel de silice 60 F 254 (épaisseur 0,2 mm) et révélées par une lampe UV réglée sur 254 nm.

II.2.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

L'analyse par la Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) a été effectuée au sein de notre laboratoire (le Laboratoire d'Electrochimie des Matériaux Moléculaires et Complexes « LEMMC »). Un spectromètre du type Perkin Elmer FT-IR IR JASCO-4200 à double faisceau en mode réflexion totale atténuée (ATR) est utilisée pour l'obtention des spectres IR, avec une résolution de 4 cm^{-1} . Les transmissions reportées sont exprimées en nombre d'ondes (cm^{-1}) Entre 4000 et 600 cm^{-1} .

II.2.4 Spectrophotométrie ultraviolet visible UV-Vis

Les propriétés optiques des produits synthétisés ont été déterminé par la Spectrophotométrie UV-vis a, les spectres d'absorption UV-Vis, sont enregistré à l'aide d'un spectrophotomètre JASCO V-650 au sein de notre laboratoire (le Laboratoire d'Electrochimie des Matériaux Moléculaires et Complexes « LEMMC »), dans la région 200-800 nm à température ambiante, les mesures ont été effectuées dans des cuves en quartz de 1cm de trajet optique contenant des solutions des molécules synthétisées (5-MAPH, 5-HNAP, 4-HNAP) dans l'éthanol.

II.2.5 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'analyse par la résonance magnétique nucléaire RMN a été effectuée au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC). Les spectres (RMN) monodimensionnelles du proton ^1H , du carbone ^{13}C et du phosphore ^{31}P , et bidimensionnelles hétéronucléaires ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC ont été enregistrés sur un appareil Bruker Avance 400 MHz à la température ambiante, sur une solution (solvant : DMSO- d_6), en utilisant le tétraméthylsilane (TMS) et l'acide phosphorique comme références internes pour les RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P . Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en partie par million (ppm). La multiplicité des signaux est rapportée à l'aide des abréviations : singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), multiplet (m).

II.2.6 La diffraction des rayons X sur monocristal

L'analyse par diffraction des rayons X sur monocristal a été effectuée à L'Unité de Recherche Chimie de l'Environnement moléculaire et Structurale « URCHEMS » de l'Université frères Mentouri, Constantine-1. Les données de diffraction des rayons X ont été acquises sur un diffractomètre CCD Bruker APEX II à 296K en utilisant une source de rayonnement Mo $K\alpha$ monochromatisée à cristaux de graphite (0,71073 Å). La collecte des données, l'indexation avec réduction et les corrections d'absorption ont été effectuées à l'aide des programmes APEX2, SAINT et SADABS, respectivement [1]. Les structures ont été résolues par des méthodes directes (SIR92) [2] et réfiées par des techniques de moindres carrés à matrice complète sur F2 avec SHELXL-2014 [3].

II.3 Méthodes d'évaluation des activités biologiques

II.3.1 L'activité antioxydante

Beaucoup de tests sont utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des molécules. La plupart de ces tests sont basés sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Ces méthodes sont très difficiles à standardiser et il n'existe pas de test idéal. Afin d'avoir une indication précise du potentiel antioxydant d'un échantillon, une possibilité est de combiner plusieurs méthodes. Le plus souvent la combinaison entre les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une idée plus ou moins précise sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester. Par contre, l'ensemble des méthodes permettant d'évaluer le pouvoir antioxydant in vitro peuvent être divisées en 2 groupes :

- 1) Les méthodes basées sur le transfert d'un atome d'hydrogène ou (Hydrogen Atom Transfert) HAT [4,5].
- 2) Les méthodes basées sur le transfert d'un électron « Single Electron Transfert (SET) » [6].

Les résultats présentés dans ce travail sont établis à l'aide des sept techniques suivantes : DPPH, ABTS, GOR, CUPRAC, FRAP, phenanthroline et Inhibition du blanchiment du β -carotène. Le choix de ces méthodes se justifie par leurs simplicités et leurs rapidités. Elles sont également moins coûteuses. Des modifications ont été, cependant, apportées afin de les optimiser et de les adapter à notre étude.

II.3.1.1 Matériels et réactifs

II.3.1.1.1 Instrument utilisé :

Un lecteur de microplaque à 96 puits de volume 250 μ l pour chaque puits (EnSpire Multimode Plate Reader perkin, USA).

II.3.1.1.2 Réactifs

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, nous avons utilisé les réactifs, regroupés dans le tableau suivant :

Tableau II 1 : Structures chimiques et propriétés physiques des réactifs utilisés pour déterminer l'activité antioxydante

<i>Test</i>	<i>Réactifs</i>	<i>Formule</i>	<i>M(g/mol)</i>
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	394.32
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₆ S ₄	514,62
	Persulfate de potassium	K ₂ S ₂ O ₈	270,32
GOR	4-[(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dien-1-ylidene)methyl]-2,6-di-tert-butylphenoxy(Galvinoxyl)	C ₂₉ H ₄₁ O ₂	421.64
CUPRAC	Acetate d'ammonium	C ₂ H ₇ NO ₂	77.08
	chlorure de cuivre(II)	Cu Cl ₂ , 2H ₂ O	170.48
	Neocupronin	C ₁₄ H ₁₂ N ₂	208.26
FRAP	Acide trichloroacétique(TCA)	C ₂ HCl ₃ O ₂	163.39
	Ferricyanure de potassium	K ₃ Fe(CN) ₆	329.24
	Chlorure de fer	FeCl ₃	162.2
	Hydrogénophosphate de sodium	Na ₂ HPO ₄	141,96
	Hydrogénophosphate disodique	Na ₂ HPO ₄	141.96

<i>Phenanthroline</i>	Benzo[b][1,10]phenanthroline -7-ol (Phenanthroline)	$C_{16}H_{10}N_2O$	246.26
	Chlorure de fer	$FeCl_3$	162.2
<i>β-carotene</i>	β -carotène	$C_{40}H_{56}$	536.87
	linoleic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	820.44
	Monopalmitate de polyoxyéthylène sorbitane (Tween 40)	$C_{62}H_{122}O_{26}$	1283.63
<i>Standards</i>	Hydroxytoluène butylé (BHT)	$C_{15}H_{24}O$	220.35
	Butylatedhydroxyanisole (BHA)	$C_{15}H_{24}O_2$	254.46

II.3.1.2 Pouvoir de piégeage du radical DPPH

La méthode DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) est largement utilisée pour mesurer l'activité antioxydante d'un composé synthétique ou un extrait de plante. Le principe de cette méthode est de mesurer la capacité d'inhibition du radical stable DPPH[•] (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (Figure II 1) selon la méthode de *Blois* [7].

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle) est un radical stable possédant une couleur violette en solution (maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm) et virant au jaune lorsqu'il est capturé par un antioxydant. En effet, son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne de la disparition de la coloration violette [8,9].

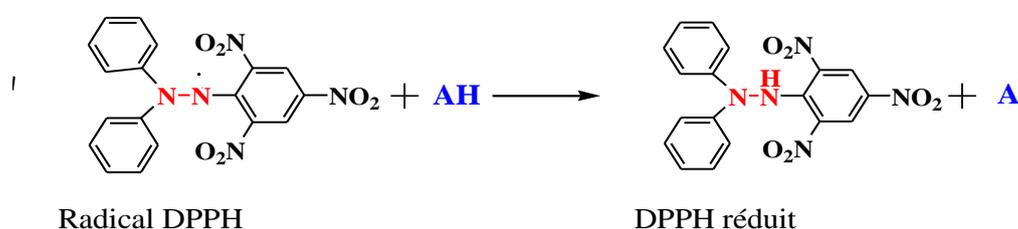


Figure II 1 : Réduction du radical DPPH[•] par R-H, où (RH) est un composé capable de céder un H au radical DPPH

La réaction de transfert d'hydrogène de l'antioxydant vers le DPPH[•] est suivie par la spectrophotométrie visible en enregistrant la décroissance de la bande d'absorption du DPPH[•] à $\lambda=517\text{nm}$ (diminution de la coloration violette) [8,9].

Le dosage spectrophotométrique a été effectué dans des microplaques de 96 puits. On utilise le radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) comme réactif, 40 μl de différentes concentrations des produits synthétisés ont été ajoutés à 160 μl de solution de 0.4 mM de DPPH dans MeOH. Après une période d'incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été lue contre un blanc (MeOH) à 517 nm. Les résultats ont été enregistrés en termes de pourcentage d'inhibition (I %) calculé selon la formule suivante :

$$I \% = \frac{A_{\text{Blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{Blanc}}} \times 100 \quad \text{[II.1]}$$

Où : A_{Blanc} est l'absorbance de la solution témoin contenant tous les réactifs à l'exception de l'échantillon.

$A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance de l'échantillon.

Les résultats sont la moyenne des analyses en *triplicata*, ils ont été enregistrés en moyenne \pm écart type. La concentration de produit fournissant 50% d'activité de piégeage des radicaux (IC_{50}) a été calculée à partir du graphique de DPPH. La valeur de l' IC_{50} exprimée en ($\mu\text{g/mL}$) est calculée et comparée à celle du BHT et BHA.

II.3.1.3 Pouvoir de piégeage du radical ABTS'

L'ABTS' est un radical libre stable, il est très utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant des fluides biologiques, des huiles essentielles, des extraits ou bien des composés synthétiques [10,11]

Le radical ABTS préformé est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) [12]. Cette formation se traduit par l'apparition d'une coloration verte bleu intense (Figure II 2).

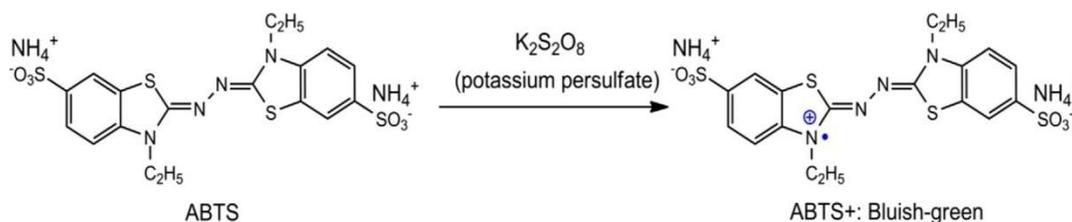


Figure II 2 : Génération d'ABTS⁺ par l'oxydation d'ABTS avec $K_2S_2O_8$

En présence d'un donneur d'hydrogène (agent antioxydant), le passage du radical ABTS à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée à une longueur d'onde de 734 nm [13].

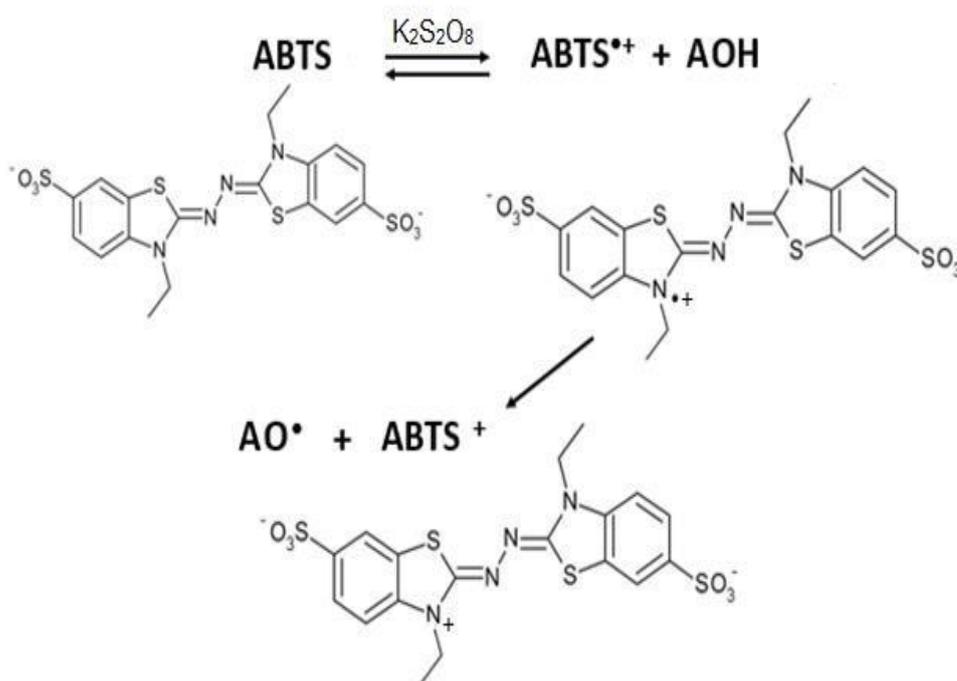


Figure II 3 : Formation de l'ABTS^{•+} par échange d'électron en présence du persulfate de potassium et réduction du radical formé par la molécule antioxydante en donnant un H•

Généralement, l'ABTS^{•+} réagit avec les antioxydants dans 30 minutes. Il est soluble dans les solvants aqueux et organiques et n'est pas affecté par la force ionique. L'analyse spectrophotométrique de l'ABTS a été effectuée selon la méthode de *Re et al* [12]. Le radical ABTS a été produit par la réaction entre 7 mM d'ABTS dans l'H₂O et 2.45 mM de persulfate de potassium, le mélange a été stocké dans l'obscurité à température ambiante pendant 12h. L'oxydation d'ABTS a commencé immédiatement mais l'absorbance n'était pas stable avant 6h de temps.

Avant l'utilisation du radical ABTS, la solution a été diluée par l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0.708 à 734 nm. Ensuite, 180 µl de la solution d'ABTS^{•+} ont été ajoutés à 20 µl de la solution de produits synthétisés dans l'éthanol à différentes concentrations.

Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm, en utilisant un lecteur de microplaques de 96 puits. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à l'absorbance du blanc (EtOH). La capacité de piégeage de l'ABTS^{•+} a été calculée, le calcul est similaire à celui effectuée pour le DPPH. Le BHT et le BHA sont utilisés comme contrôle positifs.

II.3.1.4 Pouvoir de piégeage du radical Galvinoxyl (GOR) :

L'évaluation du pouvoir antioxydant d' α -aminophosphonates synthétisés est réalisée par le test GOR, qui est considérée comme un radical phénoxy stable peut être réduit par des capteurs de radicaux libres donneurs d'hydrogène. La décoloration de GOR est directement proportionnelle à la capacité des molécules bioactives à réduire ce radical phénoxy. La concentration de produit et d'étalon nécessaire pour atteindre le principe de méthode de piégeage des radicaux phénoxy ont été déterminées selon la méthode de *Shi, Noguchi et Niki* [14].

Ce test est une technique de décoloration, dans lequel le radical de Galvinoxyl qui a une coloration jaune, sous sa forme oxydée et absorbe à 428 nm, mais lorsqu'il est réduit par un antioxydant ou une espèce radicalaire, sa coloration diminue et devient transparente (Figure II 4).

Le dosage spectrophotométrique a été effectué dans des microplaques de 96 puits. Cette méthode consiste à mélanger 40 μ l de produits synthétisés à différentes concentrations avec 160 μ l (0,1 mM Galvinoxyl) (4 mg dans 100 ml MeOH). Le mélange obtenu est incubé pendant 120 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance se fait à 428 nm contre un blanc (MeOH). La capacité de piégeage du GOR a été calculée, le calcul est similaire à celui effectuée pour le DPPH. Le BHT et le BHA sont utilisés comme contrôle positifs.

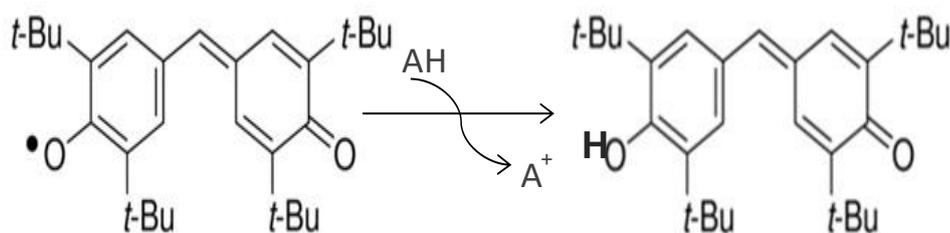


Figure II 4 : Réaction de la réduction de radical galvinoxyl en présence d'un antioxydant (AH)

II.3.1.5 Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Le dosage de CUPRAC est économique, rapide, stable, sélectif et approprié pour une variété d'antioxydants. Ce test est basé sur les modifications des caractéristiques d'absorption du complexe néocuproïne (Nc) cuivre (II), le neocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phenanthroline), est un composé organique hétérocyclique et est un agent chélatant. Lorsque ce complexe est réduit par un antioxydant, le potentiel de réduction de l'échantillon ou de l'étalon convertit

efficacement Cu^{+2} en Cu^{+1} , changeant ainsi l'absorbance maximum, comme le montre la figure II 5. Ce complexe de cuivre réduit donne une absorption maximum à 450 nm.

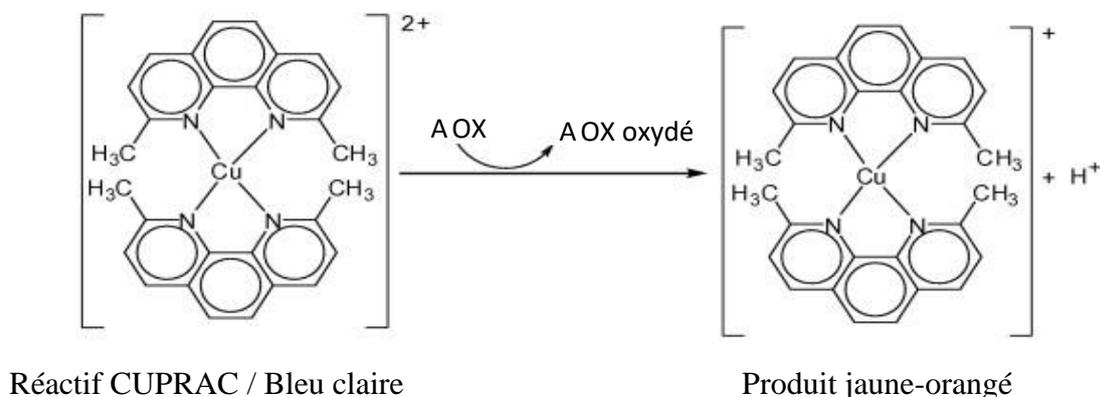


Figure II 5 : Réaction de CUPRAC par une molécule antioxydante

L'activité antioxydante par réduction cuprique de nos produits a été déterminée par la méthode CUPRAC selon la méthode de Apak *et al* [15]. Sur une microplaque de 96 unités des solutions ont été ajoutées : 60 μl de la solution S1 (S1 : 1,927 g Acétate d'ammonium (ACNH_4) + 25 ml (H_2O)) et 50 μl de la solution S2 (S2 : 0,039 g (Neocuproïne) dissoudre dans 25 ml (EtOH)) et 50 μl de la solution S3 (S3 : 0,042625 g ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dans 25 ml H_2O)) et 40 μl de produits synthétisés à différentes concentrations. Après une heure du temps et à l'aide d'un lecteur de microplaques, l'absorbance a été enregistrée contre un blanc (MeOH) à 450 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme des références antioxydantes.

II.3.1.6 Capacité de réduire l'ion ferrique (Pouvoir réducteur ou FRAP)

La méthode FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés [16]. La présence des réducteurs (AH) provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanure à la forme ferreuse. Par conséquent, le Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm (figure II 6). En effet, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode de la sensibilité pour la détermination « semiquantitative » des concentrations des antioxydants, qui participent à la réaction redox [17].

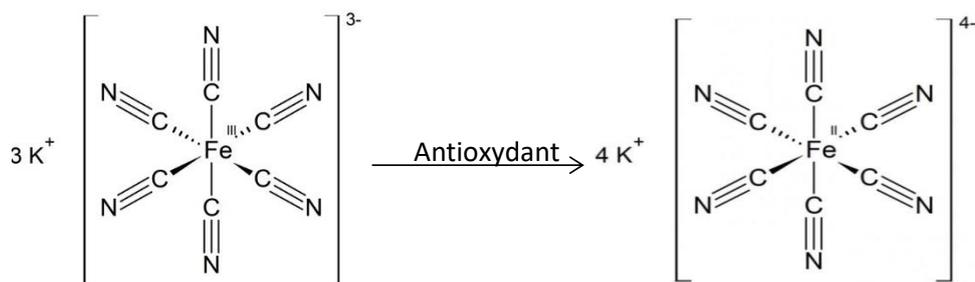


Figure II 6 : Réaction de test FRAP (*Ferric Reducing-Antioxydant Power*)

Cette méthode consiste à mélanger 10 μl des produits synthétisés à différentes concentrations avec 40 μl de tampon phosphate 0.2 M à pH 6.6 et 50 μl d'une solution de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% (m/v). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 minutes à 50°C, puis 50 μl d'acide trichloroacétique (CCl_3COOH) à 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction. On additionne 40 μl d'eau distillée et 10 μl de chlorure de fer (FeCl_3) à 0.1%. La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm contre un blanc MeOH et DMSO. Les résultats permettent de calculer la concentration efficace ($A_{0.5}$), la concentration du produit correspondant à une absorbance égale à 0.5 est obtenue par la courbe de régression linéaire ou logarithmique. L'activité du produit est enfin comparée à celle des antioxydants de synthèse (témoin positif), butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA).

II.3.1.7 L'activité de la Phénanthroline

L'activité de la phénanthroline et l'activité du pouvoir réducteur (FRAP) s'appuient sur le même principe car la méthode de phénanthroline est un cas particulier de la méthode de FRAP. L'activité de la phénanthroline c'est une méthode colorimétrique. Ce test est basé sur la réduction de Fe^{+3} (FeCl_3) en Fe^{+2} en présence d'un composé antioxydant donneur d'électrons, le fer ferreux Fe^{+2} résulte forme avec la 1,10-phénanthroline un complexe très stable intensément coloré en rouge-orangé appelé ferroïne, l'augmentation de l'absorbance de ferroïne est mesurée à $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$ [18].

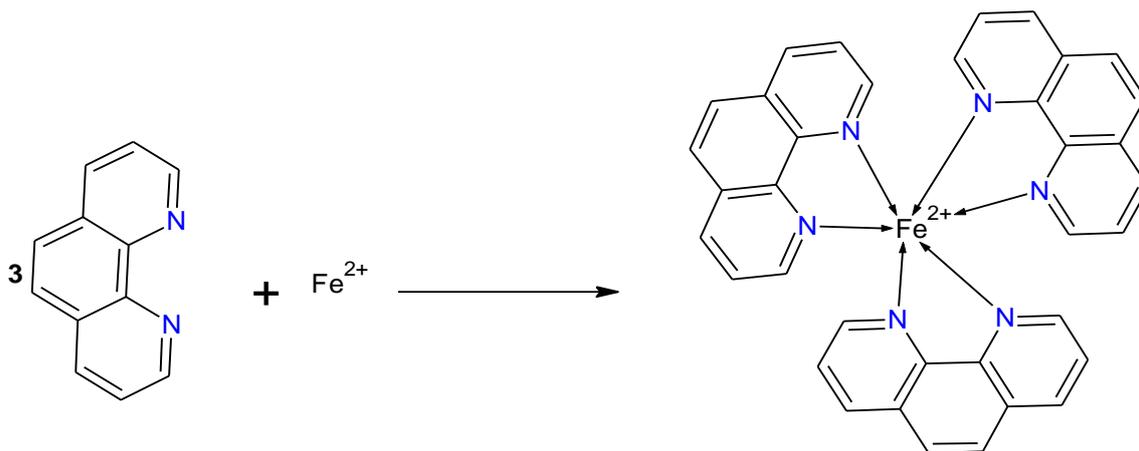


Figure II 7 : Réaction de la 1,10 phénanthroline avec le Fe^{3+} après son oxydation en Fe^{2+} par un antioxydant

Le pouvoir réducteur est déterminé par une simple mesure de l'absorbance à 510 nm, Cette méthode consiste à mélanger 10 μ l de produits synthétisés à différentes concentrations avec une solution $FeCl_3$ 0.2%, (0.02g de $FeCl_3$ dans 10ml de H_2O), 30 μ l phénanthroline 0.5%, (0.05g de 1,10-phénanthroline dans 10ml de MeOH) et enfin 110 μ l MeOH. Le mélange obtenu est incubé à l'obscurité pendant 20 min à 30°C. La lecture de l'absorbance se fait à 510 nm contre un blanc MeOH. Les résultats permettent de calculer la concentration efficace ($A_{0.5}$), concentration du produit correspondant à une absorbance égale à 0.5, obtenu par la courbe de régression linéaire ou logarithmique. L'activité de produits est enfin comparée à celle des antioxydants de synthèse (témoin positif), butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA).

II.3.1.8 Test de blanchiment au β -carotène-acide linoléique

Ce test est l'une des méthodes rapides de screening de l'activité antioxydantes, reposant principalement sur le principe selon lequel l'acide linoléique, qui est un acide gras insaturé, est oxydé par les espèces réactives de l'oxygène produites par l'eau oxygénée. L'oxydation de celui-ci, dans un système d'émulsion aqueuse génère des radicaux peroxydes, et hydroperoxydes conjugués, ces derniers vont oxyder la molécule du β -carotène hautement insaturé (Figure II 8). Entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge [19].

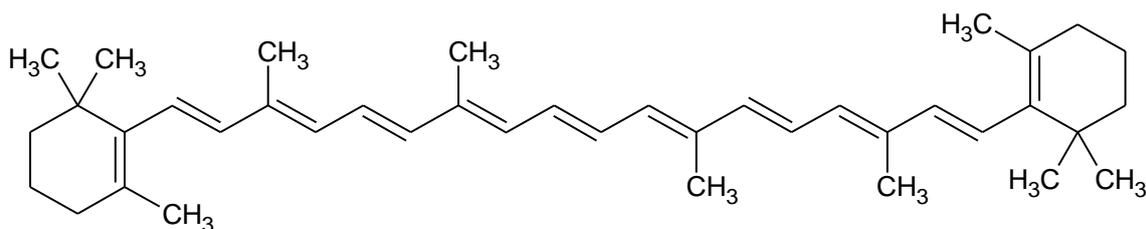


Figure II 8 : Structure de la molécule du β -carotène

Le blanchissement du β -carotène, ralenti en présence d'antioxydants, est mesuré par un suivi spectrophotométrique à 470 nm. L'absorbance est ainsi lue au temps 0 puis au bout de deux heures. Cette méthode est sensible, ceci étant dû à la forte absorption du β -carotène mais est plus lente que celle du DPPH.

La méthode décrite par *Miller* en 1971 [20], a été employée avec une légère modification, la méthode a été améliorée grâce à l'utilisation de microplaques à 96 puits.

Une émulsion de β -carotène/ acide linoléique été préparée par solubilisation de 0,5 mg de β -carotène dissoute dans 1 ml de chloroforme puis ajouté à un volume de 25 μ l d'acide linoléique et de 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme, 100 ml d'eau oxiginé sont ajoutés. L'émulsion résultante est rigoureusement agitée. 40 μ l de différents échantillons (produits synthétisés ou standard) à différentes concentrations sont placés dans une plaque à 96 puits en présence de 160 μ l d'émulsion.

Les microplaques sont alors mises en incubation à l'obscurité pendant 120 min à 50°C et l'absorbance a été mesuré à (t = 0 min et t = 120 min à 470 nm) grâce à un lecteur microplaques. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards.

$$I \% = 1 - \left(\frac{A_{(t=0)} - A_{(t=120)}}{A0_{(t=0)} - A0_{(t=120)}} \right) \times 100 \quad [\text{II.2}]$$

II.3.2 Activité anti-enzymatiques

II.3.2.1 Instrument utilisé :

Un lecteur de microplaque à 96 puits de volume 250 μ l pour chaque puits (EnSpire Multimode Plate Reader perkin, USA).

II.3.2.2 Réactifs utilisés

Tableau II 2 : Structures chimiques et propriétés physique des réactifs utilisés dans l'activité anti-enzymatique.

<i>L'activité</i>	<i>Réactifs</i>	<i>Formule</i>	<i>M(g/mol)</i>
Anti-Alzheimer	ACI (Acetylthiocholine iodide)	C ₇ H ₁₆ INOS	289.18
	BuCI(S-Butyryl thiocholine iodide)	C ₉ H ₂₀ INOS	302.23
	5,5'-Disulfanediylbis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)	C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₈ S ₂	396.34
	Sodium bicarbonate	NaHCO ₃	84.01
	Galantamine	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	287.36
Antidiabétique	Amidon	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	
	Iodure de potassium	KI	166,00
	Iodine	I ₂	253.81
	acide chlorhydrique	HCl	36.46
	Acarbose	C ₂₅ H ₄₃ NO ₁₈	645,60
Anti-ulcère	Urée	NH ₂ CONH ₂	60.06
	Hydroxyde de sodium	NaOH	40.00
	Hypochlorite de sodium	NaOCl	74,44
	Phenol	C ₆ H ₅ OH	94.11
	sodium nitroprusside dehydrate	Na ₂ [Fe(CN) ₅ NO],2H ₂ O	297.95
	Thiourea(Thiocarbamide)	H ₂ NCSNH ₂	76.12

Tampon de phosphate	Sodium phosphate dibasic dihydrate	$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	177.99
	Sodium phosphate monobasic dihydrate	$\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	156.01

II.3.2.3 Activité anticholinestérase

Les anticholinestérasiques diminuent l'activité de cholinestérase, enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse d'un ester de la choline (acétylcholine, butyrylcholine) en choline et en acide acétique. Leur action favorise donc l'élévation de la concentration d'acétylcholine dans le cerveau.

Une grande variété de méthodes ont été développées au cours des dernières années pour la quantification de l'activité inhibitrice d'acétyl-butylcholinestérase [21].

Les activités inhibitrices de l'Acétyl-cholinestérase et de la Butyryl-cholinestérase ont été mesurées en modifiant légèrement la méthode spectrophotométrique développée par *Ellman et al* [22]. Les enzymes AChE de l'anguille électrique et BChE de sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure butyrylthiocholine ont été utilisés comme substrats de la réaction (AChE et BChE respectivement). Les hydrolyses de ces substrats ont été contrôlées par analyse spectrophotométrique de la formation d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate jaune résultant de la réaction du DTNB (l'acide 5,5'-dithio-bis 2- nitrobenzoïque) avec la thiocholine libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou du chlorure de butyrylthiocholine à une longueur d'onde de 412 nm, en utilisant un lecteur de microplaque de 96 puits.

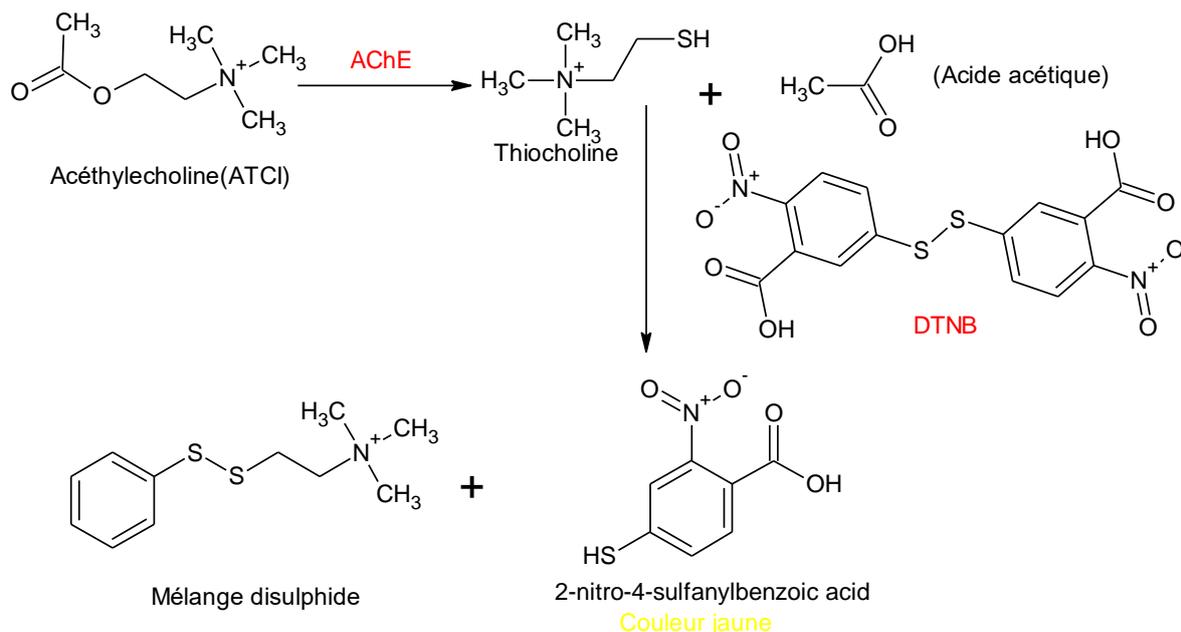


Figure II 9: Mécanisme d'action de la méthode d'Ellman

L'éthanol a été utilisé comme solvant pour dissoudre les composés d'essai 0 et les contrôles, un volume de : 130 μL du tampon de phosphate de sodium (100 mM, pH = 8), 10 μL de dérivés synthétisés à différentes concentrations, et 20 μL de l'enzyme AChE (5.32×10^{-3} U), ont été incubés pendant 15 min à 25°C, puis 20 μL de DTNB (0.5 mM) ont été ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'addition de 20 μL d'iodure d'acétylthiocholine (0.71 mM).

L'analyse de l'activité inhibitrice BChE a été déterminée suivant les mêmes étapes de celles de l'AChE, en utilisant l'enzyme BChE (6.85×10^{-3} U) et le substrat chlorure butyrylthiocholine (0.2 mM). L'hydrolyse de ces substrats a été surveillée par spectrophotométrie de la coloration jaune de 5-thio-2-nitrobenzoate formé par la réaction de DTNB avec la thiocholine, libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou de chlorure de butyrylthiocholine. La Galantamine a été utilisé comme témoin positif.

L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à une longueur d'onde de 412 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction d'échantillons par rapport à l'échantillon témoin (éthanol dans du tampon phosphate, pH 8) en utilisant la formule :

$$I \% = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100 \quad [\text{II.3}]$$

où : $A_{\text{contrôle}}$ est l'activité de l'enzyme sans échantillon d'essai et $A_{\text{échantillon}}$, est l'activité de l'enzyme avec l'échantillon de test.

II.3.2.4 Activité inhibitrice de l' α - amylase

Une augmentation inattendue des niveaux de glucose dans le sang provoque une hyperglycémie chez les patients atteints le diabète de type 2 en raison de l'hydrolyse de l'amidon par l' α -amylase et de l'absorption consécutive de glucose par l' α -glucosidase intestinale [23].

L'amylase de mammifère, sécrétée par la glande pancréatique et de la salive comme étant une enzyme glycolytique à travers le suc pancréatique dans l'intestin, est l'enzyme clé qui catalyse la première étape du processus digestif des hydrates de carbone (glucides). Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des oligo- et polysaccharides « glucides alimentaires » non absorbables en monosaccharides absorbables au niveau de l'intestin. Des chercheurs ont développé des inhibiteurs de ces enzymes dans le but de ralentir l'absorption des glucides dans l'intestin donc le glucose passe plus lentement dans le sang, réduisant ainsi l'hyperglycémie et l'hyper-insulinémie postprandiale [24,25].

Les potentiels inhibiteurs de l' α -amylase ont été étudiés en faisant réagir différentes concentrations des produits avec une enzyme α -amylase et une solution d'amidon, selon la méthode décrite par (Zengin G *et al.* 2014) [26], avec quelques modifications. Un mélange de 25 μl de produits synthétisés et 50 μl de tampon de phosphate de sodium 0,02 M (pH = 6,9) contenant l'enzyme α -amylase (solution α -amylase 1U/ml) a été incubé pendant 10 min à 37°C. Ensuite, 50 μl d'amidon 0.1% ont été ajoutés au mélange réactionnel. Le mélange a été incubé pendant 10 min à 37°C. Après incubation, on a ajouté 25 μl d'HCl (1M) et 100 μl d'IKI. L'absorbance a été mesurée à 630 nm. L'acarbose a été utilisé comme témoin positif. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition et calculés en utilisant l'équation [II.4] :

$$\%INH = 1 - \left[\frac{(A_c - A_e) - (A_s - A_b)}{(A_c - A_e)} \right] \times 100 \quad \text{[II.4]}$$

où : A_c =Absorbance [Amidon+IKI+HCl+Vol de solvant de produit+Vol tampon Enzyme] ;

A_e =Absorbance [Enzyme+Amidon+IKI+HCL+ Vol de solvant de produit] ;

A_s =Absorbance [Enzyme+produit+Amidon+IKI+HCl] ;

A_b =Absorbance [produit+IKI+125 μl de tampon].

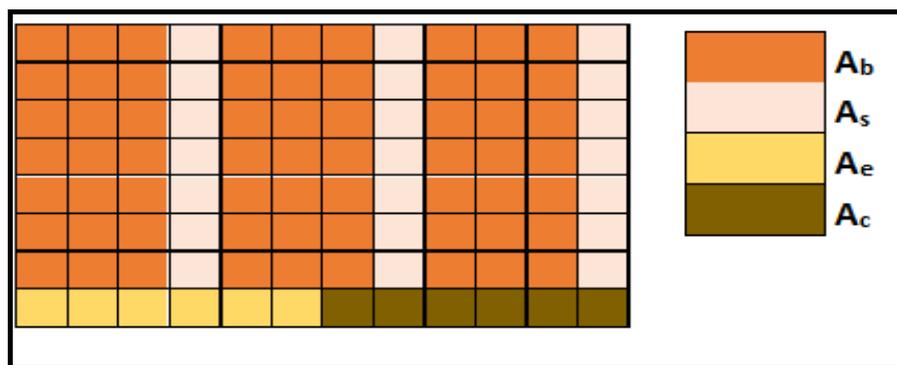


Figure II 10: Schéma de la microplaque 96 puits pour l'activité α -amylase

II.3.2.5 Evaluation de l'activité anti-uréase

L'*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) est un bacille responsable d'une infection chronique très répandue dans le monde. Elle va se retrouver dans le lac gastrique extrêmement acide. Pour se protéger de cette acidité gastrique, *H. pylori* produit une uréase qui est une enzyme responsable de la rapide hydrolyse de l'urée en ammoniac. Cet ammoniac neutralise le microenvironnement de la bactérie, ce qui rendra le milieu plus accueillant à cette bactérie, et par conséquent, provoque des troubles gastro-intestinaux, en particulier l'ulcère et le cancer gastrique. La recherche d'inhibiteurs à ces enzymes est donc très importante pour traiter ces infections [27–29].

L'activité inhibitrice de l'uréase a été déterminée en mesurant la production d'ammoniac par la méthode de l'indophénol, comme décrit par *Weatherburn* [30].

Le tableau II 3 résume les méthodes de préparation des différentes solutions :

Tableau II 3 : méthode de Préparation des solutions pour le test d'inhibition d'uréase

<i>Solution</i>	<i>Méthode de préparation</i>
Tampon de phosphate PH=8,2	0,078g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 50 ml H_2O + 0,1780 g ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dans 100 ml H_2O
Solution enzymatique	1 mg d'enzyme d'uréase du haricot vert dans 1ml de tampon (PH=8.2).
le substrat Uree	0,2553 g Urée dans 25 ml tampon (PH=8,2)
Le réactif basique	0,2553 g Urée dans 25 ml tampon (PH=8,2)
Le réactif phénolique	2 g Phenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) dans 25 ml H_2O + 25 mg $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 25 ml H_2O

Un mélange de 25 μl de solution enzymatique de 1U/ml (uréase de haricot Jack), 10 μl de produits synthétisés et 50 μl du substrat d'urée a été incubé à 30°C pendant 15 min dans une plaque à 96 puits. Ensuite, 45 μl de réactif phénolique et 70 μl de réactif basique ont été ajoutés dans chaque puits. Après 50 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits. La thiourée a été utilisée comme inhibiteur standard. Les résultats ont été donnés en pourcentage d'inhibition (%) de l'enzyme à chaque concentration du composé testé. L'activité d'inhibition de l'uréase a été calculée à l'aide de l'équation 2 suivante :

$$I \% = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100 \quad \text{[II.5]}$$

II.3.3 Inhibition de la dénaturation des protéines

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des α -aminophosphonates synthétisés a été étudiée en utilisant la technique d'inhibition de la dénaturation de l'albumine selon la méthode de Kandikattu K, (2013) avec de légères modifications [31]. Le principe consiste à l'inhibition de dénaturation du BSA provoquée par la chaleur (72°C) par les produits synthétisés.

II.3.3.1 Instrument utilisé

Spectrophotomètre à cuve HELIOS EPSILON (Thermo scientifique)

II.3.3.2 Réactifs utilisés

- 1- Tampon Tris-HCl 0.05M pH 6,6
- 2- BSA (bovine sérum albumine)
- 3- Ibuprofène de sodium (Standard)

II.3.3.3 Préparation de la solution protéine

0,2 g de BSA est dissoute dans 100 ml de tampon de Tris-HCl (1,2144g est dissous dans 200 ml de l'eau bi distillée, le pH de solution TRIS a été ajusté avec une petite quantité de l'HCl 37% à pH 6.6) sous agitation douce.

II.3.3.4 Préparation des échantillons

Dans des tubes à essai contenant 1mL de solution aqueuse de concentrations variables des produits testés on ajoute 1 mL de solution d'albumine préparé. Le témoin en absence des produits est préparé avec 1 mL de la solution de BSA et 1 mL du solvant utilisé pour les dérivés aminophosphonates synthétisés (le résultat obtenu correspond à la dénaturation totale du BSA en absence de substance inhibitrice) ainsi pour chaque concentration de produits synthétisés un blanc produit est préparé dans le quel 1mL de produit est ajouté à 1 mL de Tris-HCl (ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance des produits des résultats obtenus).

L'ibuprofène connu pour ses propriétés anti-inflammatoires est utilisé comme standard, différentes concentrations de l'ibuprofène (forme injectable) sont préparées dans l'eau distillée.

Les tubes contenus d'échantillons à tester, le standard et le témoin ont été incubés dans une utive à 37°C pendant 15 minutes, puis dans un bain marie à 72°C pendant 5 min. Après refroidissement la turbidité est mesurée à 660 nm dans un spectrophotomètre à cuve.

La dénaturation des protéines inhibées par les esters α -aminophosphonates synthétisés a été exprimée en pourcentage en utilisant la formule [II.6] :

$$I \% = \frac{T_{\text{test}} - T_{\text{contrôle}}}{T_{\text{test}}} \times 100 \quad [\text{II.6}]$$

$T_{\text{contrôle}}$ = la transmittance de contrôle.

T_{test} = la transmittance de l'échantillon testé.

II.3.4 Essai de l'activité hémolytique *in vitro* des esters α -aminophosphonates synthétisés

L'étude de la toxicité et l'évaluation de la DL50 (appelée aussi dose létale 50%), reste la première étape avant de rechercher les activités pharmacologiques des nouvelles substances. Dans notre étude, nous avons utilisé le test d'hémolyse des globules rouges pour évaluer *in vitro* la toxicité des dérivés étudiés selon le protocole expérimental utilisé dans les travaux de *Malagoli (2007)* [32].

II.3.4.1 Matériels

Spectrophotomètre à cuve HELIOS EPSILON (Thermo scientifique).

II.3.4.2 Réactifs

- 1- Sérum salé
- 2- Globule rouge d'un donneur sain
- 3- 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP

II.3.4.3 Préparation de la suspension de globules rouges

Un prélèvement sanguin est réalisé sur des tubes héparines. Le sang est centrifugé pendant 10 min à 3000 trs/mn. Après trois lavages, le culot érythrocytaire est préparé avec une solution de sérum salé (10%, v/v). (1 mL de culot obtenu est solubilisé dans 99 mL du sérum salé).

II.3.4.4 Préparation des échantillons des molécules synthétisées

Des différentes concentrations des composés synthétisés sont préparées dans le sérum salé. Le mélange réactionnel (1200 μL) consistait de 600 μL de solution d'échantillons à différentes concentrations et 600 μL de suspension de globules rouges, au lieu de l'échantillon à tester 600 μL d'eau distillée a été ajoutée à un tube qui contient 600 μL de la suspension (tube totalement hémolysé). Tous les tubes ont été incubés 37 ° C pendant 30 min.

A la fin de l'incubation, les tubes ont été centrifugés à 2500 tr / min pendant 5 min et l'absorbance des surnageants a été utilisé pour mesurer l'absorbance de l'hémoglobine libérée

à 540 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible double faisceau contre un blanc contenant le sérum.

D'autres tubes des tests blancs sont préparés dans les mêmes conditions expérimentales qui contiennent 600 µL des produits de différentes concentrations et 600 µL de sérum salé. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule [II.7] :

$$\% \text{ hémolysé} = \frac{A_t}{A_{cp}} \times 100 \quad \text{[II.7]}$$

Où A_t et A_{cp} sont les absorbances de l'échantillon et du contrôle positif, respectivement.

II.3.5 L'activité de protection solaire (SPF)

L'activité photo protectrice c'est la capacité d'un produit à protéger la peau contre les rayonnements UVB et UVA. Cette activité est déterminée par le facteur de protection solaire également dénommé l'indice de protection (IP) ou SPF (Sun Protection Factor). L'SPF est une mesure de l'efficacité photoprotectrice vis-à-vis des effets à court termes des rayonnements UV qui indique le niveau de protection des produits contre les dommages induits par les UV [33]. Le facteur de protection solaire est un indice qui permet de classer les produits de protection solaire en quatre catégories (tableau II 3). Ainsi, plus l'indice SPF est élevé plus la protection solaire contre le coup de soleil est importante [34].

Tableau II 4 : Catégories de protection affichées sur les produits solaires en fonction des facteurs de protection mesurés, selon la Recommandation de la Commission Européenne 2006

Catégorie Indiquée	Facteur de protection indiqué	Facteur de protection solaire mesuré	Facteur de protection UVA minimal Recommandé	Longueur d'onde critique minimale recommandée
« Faible protection »	6	6 - 9,9	1/3 du facteur de Protection Solaire indiqué sur l'étiquette	370 nm
	10	10 - 14,9		
« Protection moyenne »	15	15 - 19,9		
	20	20 - 24,9		
	25	25 - 29,9		
Haute « protection »	30	30 - 49,9		
	50	50 - 59,9		
« Très haute protection »	50+	$60 \leq$		

Le facteur de protection solaire SPF in vitro a été déterminé selon les méthodes décrites par *Mansur (1986)* [35]. Les esters α -aminophosphonates synthétisés ont été dilués dans l'éthanol pour obtenir une concentration de 2 mg/ml. L'absorbance a été effectuée à des longueurs d'onde comprises entre 290 et 320 nm avec des intervalles de 5 nm et la valeur du SPF est calculée par l'application de l'équation mathématique [II.8].

$$\text{SPF spectrophotometric} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda) \quad [\text{II.8}]$$

où : **EE** : spectre de l'effet érythémal ;

I : spectre d'intensité solaire ;

Abs : l'absorbance du produit ;

CF : facteur de correction (= 10).

Les valeurs de $(\text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda))$ sont des constantes déterminées dans le (tableau II 5).

Tableau II 5 : Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF [36]

Longueur d'onde λ (nm)	EE(λ) x I(λ) (Normes)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,0180
Total	1

II.3.6 Activités Antimicrobiennes

La résistance aux antibiotiques est un problème qui continue à défier le secteur de la santé. La découverte de nouveaux antibiotiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques est nécessaires pour relever ce défi. Pour cela, nous avons testé l'effet antibactérien des produits finaux obtenus sur quatre souches bactériennes. Cette étude a été réalisée au *CRBT Constantine* et au *EPSP de Medjana-BBA*. Le test de sensibilité des bactéries est réalisé par deux méthodes différentes : la méthode de diffusion en milieu gélosé, appelée encore la méthode de diffusion en puits, (analyse qualitative) et la méthode standardisée de micro-dilution (la méthode des concentrations minimales inhibitrices (CMI), (analyse quantitative).

Les CMI des esters α -aminophosphonates synthétisés contre les microorganismes testés ont été déterminées par la méthode de microdilution en bouillon selon le protocole de *NCCLS (2002)*. Seules les molécules qui ont montré une activité par la méthode diffusion en puits ont fait l'objet d'une évaluation de leur activité par la méthode de dilution pour une détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB).

II.3.6.1 Matériels et réactifs

- Le bouillon nutritif est utilisé pour la vérification de la vitalité des bactéries.
- La gélose nutritive est utilisée pour la conservation des souches, c'est un milieu adéquat pour la majorité des bactéries.
- La gélose Mueller Hinton est utilisée dans les tests de sensibilité des bactéries à différentes molécules synthétisées.
- Le bouillon Mueller Hinton est utilisé dans les tests de micro-dilution pour déterminer la CMI de molécules testées.
- Les produits synthétisés (5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP) et le standard la gentamycine (gent10).

II.3.6.2 Les germes à tester

L'activité antibactérienne, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (MBC) ont été déterminé contre 4 souches bactériennes de références issues de la collection ATCC (*American Type Culture Collection*) dont deux bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus* (N°ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (N°ATCC 6633)) et deux Gram- négative (*Escherichia coli* (N°ATCC 8739), *Pseudomonas aëruginosa* (N° ATCC 27853)).

II.3.6.3 Technique de diffusion en milieu gélosé « la technique de diffusion en puits »

Le test de sensibilité antibiogramme est avant tout un outil de décision thérapeutique en classant les bactéries : sensibles, intermédiaires ou résistantes. C'est une méthode de mesure qualitative permettant de tester l'existence du pouvoir antimicrobien. Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé à effet antibactérien en milieu solide dans une boîte de pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'activité antibactérienne sur la cible est appréciée par la mesure de la zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La lecture des résultats se fait après incubation à 37°C pendant 18h, par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition (DZI) en millimètre de la croissance bactérienne. Selon *Ponce et al* [37], le diamètre de la zone d'inhibition renseigne sur la sensibilité d'une bactérie donnée :

Résistante : DZI < 8mm ;

Sensible : DZI = 9-14 mm ;

Très sensible : DZI = 15-19 mm ;

Extrêmement sensible : DZI > 20 mm.

L'évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des produits synthétisés a été réalisée par la technique de diffusion en puits, en procédant comme suit :

II.3.6.3.1 Solubilisation des produits à tester

Les composés synthétisés ont été criblés in vitro pour leur activité antibactérienne contre quatre souches bactériennes (Gram-négatifs et Gram-positives) en utilisant la méthode de la technique de diffusion en puits [38–40]. En bref, des quantités des composés à tester (5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP) ont été dissous dans du DMSO dans trois flacons différents pour obtenir des solutions ayant des concentrations de 100 mg/mL.

Le DMSO est un solvant organique incolore de formule brute C₂H₆OS, utilisé en chimie pharmaceutique pour sa capacité à solubiliser de nombreuses molécules organiques [41]. Le DMSO est utilisé tout seul comme contrôle négatif.

II.3.6.3.2 Préparation des pré-cultures

Les souches à tester ont été suspendues dans du bouillon nutritif puis incubées à 37°C afin de vérifier leur viabilité. Après 24h, des gouttelettes de la suspension ont étéensemencées sur gélose nutritive puis incubées pendant 18 à 24h à 37°C.

II.3.6.3.3 Préparation de l'inoculum

Après incubation, des colonies bien isolées sont mises en suspension dans l'eau physiologique jusqu'à une densité optique de 0,08 à 0,1 à 625nm soit environ 108 CFU/ml [42].

II.3.6.3.4 Mode opératoire

On prépare la gélose de Mueller-Hinton (MH) qui doit être séchée (absence complète de l'eau à sa surface), puis on procède à un ensemencement par la technique d'écouvillonnage qui consiste à tremper d'abord un écouvillon stérile dans la suspension et à ensemencer par la suite la gélose par cette dernière. On laisse sécher de 3 à 5 min, puis on pratique des puits à l'aide d'une pipette pasteur stérile (il faut éloigner les puits de 1 cm minimum du bord de la

boîte de Pétri). Le fond des puits est obturé par une goutte de gélose Mueller Hinton pour limiter la diffusion des solutions des produits sous la gélose. Ensuite, on injecte 50 µl de produit à tester et le DMSO (témoins négatifs) dans les puits. En suit, un disque de l'antibiotique gentamicine est utilisé comme control positif. Après diffusion (20 mn), les cultures sont incubées dans des étuves à la température de 37°C pendant 24 h, et les auréoles d'inhibition sont mesurées à l'échelle millimétrique à l'aide d'une règle. Le diamètre du puits (6 mm) est inclus dans les tableaux des résultats.

II.3.6.4 Définition de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la concentration minimale d'un échantillon permettant d'inhiber la croissance bactérienne après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. Cette concentration est déterminée par la méthode standardisée de micro-dilution utilisée par le Comité national des normes de laboratoire clinique, NCCLS (*National Commitee for Clinical Laboratory Standards*) décrit par *celiktas et al* [43], elle consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié[44,45].

Tous les tests ont été réalisés dans un billon Mueller Hinton, les souches bactériennes ont été cultivées pendant 18-24h dans ce billon.

Nous avons utilisé dans ce test des microplaques stériles à 96 puits [46], pour déterminer la CMI des esters synthétisés par la méthode de microdilution en milieu liquide selon les recommandations de CLSI [47] et NCCLS [43]. Une gamme de concentrations décroissantes par des dilutions géométriques allant de 100 à 0,19 mg/mL a été préparée, en utilisant cette méthode de dilution en série, la concentration a été réduite de moitié à chaque fois.

Un volume de 100 µL de chaque dilution a été déposé dans les puits des microplaques. Les premiers puits de la microplaque ont servi comme contrôles négatifs, ils ont été remplis uniquement par le milieu de culture (contrôle de la stérilité). Tandis que le dernier puits représente le contrôle positif, rempli uniquement par la suspension bactérienne (contrôle de la croissance). 100 µL de chaque concentration de molécules testées ont été déposés dans chaque puits contenant 100 µL de l'inoculum contenant 10⁶ cellules/mL préparées dans le bouillon Mueller Hinton pH = 7,2 ± 0,2. La lecture a été effectuée après 24h d'incubation à 37°C à l'œil nu, et la CMI correspond à la plus faible concentration du produit testé pour laquelle aucun trouble visuel n'est observé.

II.3.6.5 Détermination de La Concentration Minimale Bactéricide CMB

La CMB est déterminée à partir de la CMI. Les puits ne présentant aucune croissance visible à l'œil nu après incubation sont vidés et les contenus sont repiqués sur de la gélose coulée dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre.

II.3.6.6 Evaluation du pouvoir bactéricide et bactériostatique

L'action d'un antibactérien sur les souches bactériennes peut être caractérisée par deux paramètres tels que la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (MBC). Selon le rapport CMB/CMI, nous avons apprécié l'activité antibactérienne.

- Lorsque le rapport $CMB / CMI = 1$, l'antibiotique est dit « bactéricide absolu ».
- Si le rapport $MBC/MIC \leq 4$, l'effet était considéré comme bactéricide.
- Si le rapport $MBC/MIC > 4$, l'effet a été définie comme bactériostatique [48].

II.3.7 Etudes statistiques

Toutes les données expérimentales de l'évaluation des activités biologiques obtenues représentent la moyenne de trois essais \pm écart type (SD), réalisés à l'aide du logiciel Excel 2013 de régression linéaire.

Les coefficients de corrélation des courbes ont été déterminés avec le logiciel Microsoft Office Excel 2013, ainsi que les histogrammes et les courbes.

Références bibliographiques :

- [1] S. Bruker, S. SAINT, Bruker AXS Inc, Madison, Wisconsin, USA. (2002).
- [2] G.M. Sheldrick, SHELXS-97, University of Göttingen, Germany, 1997; b) GM Sheldrick, SHELXL-97, University of Göttingen, Germany, 1997; c) A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, J. Appl. Crystallogr. 26 (1993) 343–350.
- [3] G.M. Sheldrick, A short history of *SHELX*, Acta Crystallogr A Found Crystallogr. 64 (2008) 112–122. <https://doi.org/10.1107/S0108767307043930>.
- [4] D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.
- [5] R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.
- [6] F. Shahidi, Y. Zhong, Measurement of antioxidant activity, Journal of Functional Foods. 18 (2015) 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.
- [7] M.S. Blois, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, Nature. 181 (1958) 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
- [8] I.I. Koleva, T.A. van Beek, J.P.H. Linssen, A. de Groot, L.N. Evstatieva, Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods, Phytochem. Anal. 13 (2002) 8–17. <https://doi.org/10.1002/pca.611>.
- [9] U.M. Acuña, D.E. Atha, J. Ma, M.H. Nee, E.J. Kennelly, Antioxidant capacities of ten edible North American plants: ANTIOXIDANT CAPACITIES OF EDIBLE PLANTS, Phytother. Res. 16 (2002) 63–65. <https://doi.org/10.1002/ptr.1031>.
- [10] A. Shalaby, Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action, Afr. J. Pharm. Pharmacol. 7 (2013) 528–539. <https://doi.org/10.5897/AJPP2013.3474>.
- [11] V. Katalinic, M. Milos, T. Kulisic, M. Jukic, Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols, Food Chemistry. 94 (2006) 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>.
- [12] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radical Biology and Medicine. 26 (1999) 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

- [13] M.B. Arnao, Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case, *Trends in Food Science & Technology*. 11 (2000) 419–421. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00027-9).
- [14] H. Shi, N. Noguchi, E. Niki, Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity, in: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 2001: pp. 157–166. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)35240-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)35240-0).
- [15] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S.E. Karademir, Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>.
- [16] B. Ou, D. Huang, M. Hampsch-Woodill, J.A. Flanagan, E.K. Deemer, Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3122–3128. <https://doi.org/10.1021/jf0116606>.
- [17] R. Amarowicz, R.B. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl, J.A. Weil, Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies, *Food Chemistry*. 84 (2004) 551–562. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00278-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00278-4).
- [18] A. Szydłowska-Czerniak, C. Dianoczki, K. Recseg, G. Karlovits, E. Szlyk, Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods, *Talanta*. 76 (2008) 899–905.
- [19] G.J. Marco, A rapid method for evaluation of antioxidants, *J Am Oil Chem Soc.* 45 (1968) 594–598. <https://doi.org/10.1007/BF02668958>.
- [20] H.E. Miller, A simplified method for the evaluation of antioxidants, *J Am Oil Chem Soc.* 48 (1971) 91–91. <https://doi.org/10.1007/BF02635693>.
- [21] M. Pohanka, Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders: implication and counteracting of melatonin, *J Appl Biomed.* 9 (2011) 185–196. <https://doi.org/10.2478/v10136-011-0003-6>.
- [22] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*. 7 (1961) 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

- [23] H. Gray, Toward Improved Glycemic Control in Diabetes: What's on the Horizon?, *Arch Intern Med.* 155 (1995) 1137.
<https://doi.org/10.1001/archinte.1995.00430110034005>.
- [24] S. Jayaraj, S. Suresh, R.-K. Kadeppagari, Amylase inhibitors and their biomedical applications, *Starch/Stärke.* 65 (2013) 535–542. <https://doi.org/10.1002/star.201200194>.
- [25] U. Hossain, A.K. Das, S. Ghosh, P.C. Sil, An overview on the role of bioactive α -glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications, *Food and Chemical Toxicology.* 145 (2020) 111738. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111738>.
- [26] G. Zengin, C. Sarikurcu, A. Aktumsek, R. Ceylan, O. Ceylan, A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes, *Industrial Crops and Products.* 53 (2014) 244–251.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.043>.
- [27] J. Fauchère, A. Rosenau, *Campylobacter* et *Helicobacter* en pathologie digestive humaine, *Med Sci (Paris).* 7 (1991) 138. <https://doi.org/10.4267/10608/4322>.
- [28] D.Y. Graham, M. Miftahussurur, *Helicobacter pylori* urease for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A mini review, *Journal of Advanced Research.* 13 (2018) 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.01.006>.
- [29] P. Bauerfeind, R. Garner, B.E. Dunn, H.L. Mobley, Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH., *Gut.* 40 (1997) 25–30.
<https://doi.org/10.1136/gut.40.1.25>.
- [30] M.W. Weatherburn, Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Anal. Chem.* 39 (1967) 971–974. <https://doi.org/10.1021/ac60252a045>.
- [31] I. Karthik, Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by in-vitro method, (2013).
- [32] D. Malagoli, A full-length protocol to test hemolytic activity of palytoxin on human erythrocytes, *Invertebrate Survival Journal.* 4 (2007) 92–94.
- [33] E.A. Dutra, D.A.G. da C. Oliveira, E.R.M. Kedor-Hackmann, M.I.R.M. Santoro, Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 40 (2004) 381–385.
<https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000300014>.
- [34] L. Mbanga, P.T. Mpiana, M. Mbala, L. Ilinga, B. Ngoy, K. Mvingu, M. Mulenga, Comparative in vitro Sun Protection Factor (SPF) values of some herbal extracts found

- in Kinhasa by Ultraviolet Spectrophotometry, *J. of Physical and Chemical Sciences*. 2 (2015) 1–6.
- [35] J. de S. Mansur, M.N.R. Breder, M.C. d'Ascensão Mansur, R.D. Azulay, Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria, *An. Bras. Dermatol.* (1986) 121–4.
- [36] B.H. More, S.N. Sakharwade, S.V. Tembhurne, D.M. Sakarkar, Evaluation of Sunscreen activity of Cream containing Leaves Extract of *Butea monosperma* for Topical application, *International Journal of Research in Cosmetic Science*. 3 (2013) 1–6.
- [37] A.G. Ponce, R. Fritz, C. del Valle, S.I. Roura, Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, *LWT - Food Science and Technology*. 36 (2003) 679–684. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4).
- [38] N. Sanla-Ead, A. Jangchud, V. Chonhenchob, P. Suppakul, Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films: AMACTIVITYCINNAMALDEHYDE&EUGENOL, *Packag. Technol. Sci.* 25 (2012) 7–17. <https://doi.org/10.1002/pts.952>.
- [39] G.P. da S.R. de Rezende, L.R. de R.S. da Costa, F.C. Pimenta, D.A. Baroni, In vitro antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study, *Braz. Dent. J.* 19 (2008) 301–305. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402008000400003>.
- [40] N. Raman, V. Muthuraj, S. Ravichandran, A. Kulandaisamy, Synthesis, characterisation and electrochemical behaviour of Cu(II), Co(II), Ni(II) and Zn(II) complexes derived from acetylacetone and *p*-anisidine and their antimicrobial activity, *J Chem Sci.* 115 (2003) 161–167. <https://doi.org/10.1007/BF02704255>.
- [41] K.-M. Roy, Sulfones and Sulfoxides, in: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Ed.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2000: p. a25_487. https://doi.org/10.1002/14356007.a25_487.
- [42] M. Gulluce, A. Aslan, M. Sokmen, F. Sahin, A. Adiguzel, G. Agar, A. Sokmen, Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*, *Phytomedicine*. 13 (2006) 515–521. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.09.008>.
- [43] O.Y. Celiktas, E.E.H. Kocabas, E. Bedir, F.V. Sukan, T. Ozek, K.H.C. Baser, Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*,

- depending on location and seasonal variations, *Food Chemistry*. 100 (2007) 553–559.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.011>.
- [44] S. Kolarević, D. Milovanović, M. Avdović, M. Oal\dje, J. Kostić, K. Sunjog, B. Nikolić, J. Knežević-Vukčević, B. Vuković-Gačić, Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria, *Botanica Serbica*. 40 (2016) 29–36.
- [45] J.T. Jacob, C.A. DiazGranados, High vancomycin minimum inhibitory concentration and clinical outcomes in adults with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a meta-analysis, *International Journal of Infectious Diseases*. 17 (2013) e93–e100.
- [46] M. Elshikh, S. Ahmed, S. Funston, P. Dunlop, M. McGaw, R. Marchant, I.M. Banat, Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants, *Biotechnology Letters*. 38 (2016) 1015–1019.
- [47] J.E. Ross, R.N. Jones, Initial quality control ranges for CEM-102 (Fusidic Acid) using the CLSI multi-laboratory M23-A3 study design, Abstr. D-1435. 49th ICAAC. (2009).
- [48] D. Gatsing, V. Tchakoute, D. Ngamga, J.-R. Kuate, J.D.D. Tamokou, N.B. NJI, F.M. Tchouanguép, S.P. Fodouop, In Vitro Antibacterial activity of *Crinum Purpurascens* herb leaf extract against the *Salmonella* species causing typhoid fever and its toxicological evaluation, (2009).

CHAPITRE III

SYNTHESE ET CHARACTERISATION.

III.1 Introduction

Les composés α -aminophosphonates constitués une catégorie intéressante de composés organophosphorés, ils ont une importance significative grâce à leur large spectre d'applications biologiques [1]. La combinaison de la partie aminophosphonate avec les phénols différemment substitués donne l'accès à une grande variété de structures susceptibles d'avoir des propriétés biologiques et pharmacologiques intéressantes [2], en tant qu'agents antioxydants [3,4], antibactériens [5], antifongiques [6], anticancéreux [7]... etc. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés en particulier par la synthèse et la caractérisation d'une série de trois nouvelles molécules appartenant à la famille des esters α -aminophosphonates à partir d'aminophénols analogues, comme réactifs de base.

Les trois composés sont obtenus par une simple réaction de phosphorylation des aminophénols convenables en présence du benzaldéhyde et du triéthylphosphite. Il s'agit de la réaction directe à trois composants de *Kabachnik-Fields* (phospha-Mannich) [8]. La synthèse des esters aminophosphonates nécessite des températures relativement élevées et des catalyseurs acides. Dans notre travail, on a choisi, l'acide chlorhydrique HCl comme catalyseur, vu son efficacité dans ce type de réactions même à des faibles quantités, et le rendement élevé des produits obtenus.

Ce chapitre, est consacré à la présentation de la synthèse des molécules visées, effectuée selon la réaction de *Kabachnik-Fields* et à la discussion des résultats de la caractérisation de ces molécules obtenues par les différentes méthodes physicochimiques d'analyse et par les méthodes spectroscopiques, telles que l'UV-vis, FT-IR, RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P , et l'RMN bidimensionnelle hétéronucléaires ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ainsi que la résolution structurale par diffraction des rayons X sur monocristal.

III.2 Synthèse des molécules ciblées

III.2.1 Réactifs et solvants utilisés

Tous les produits chimiques utilisés dans ce travail sont des produits commercialisés de type, *Sigma-Aldrich* ou *Fluka*, ils sont utilisés sans traitement préalable. Les caractères physicochimiques principaux des réactifs utilisés sont regroupés dans le tableau III 1.

Tableau III 1: Caractères physicochimiques principaux des réactifs utilisés

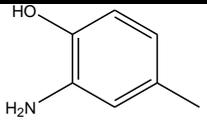
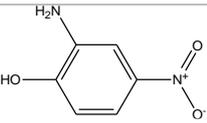
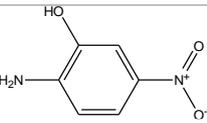
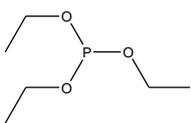
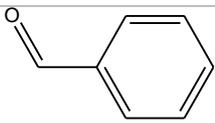
Réactifs	Pureté	Formule brute	M (g/mol)	Densité	Structure chimique
2-amino-4-methylphenol (2-A4MP)	98%	C ₇ H ₉ NO	123.15	-	
2-amino-4-nitrophenol (2-A4NP)	98%	C ₆ H ₆ N ₂ O ₃	154.12	-	
2-amino-5-nitrophenol (2-A5NP)	96%	C ₆ H ₆ N ₂ O ₃	154.12	-	
Triethylphosphite (TEP)	98 %	C ₆ H ₁₅ O ₃ P	166.16	5.74	
benzaldéhyde	99 %	C ₇ H ₆ O	106.12		

Tableau III 2: Caractères physicochimiques principaux des solvants utilisés

Solvants	Formule brute	M (g/mol)	Pureté	T d'ébullition
L'eau distillée	H ₂ O	18.00		100°C
Acide chlorhydrique	HCl	36.46	36%	61°C
éthanol	C ₂ H ₆ O	46.07	99.9%	79 °C

III.2.2 Synthèse des molécules ciblées :

De nombreuses stratégies ont été développées pour synthétiser des α -aminophosphonates de différentes natures. Chacune de ces stratégies possède une certaine limite d'utilisation [2,9]. La réaction de *Kabachnik-Fields* constitue sans aucun doute le meilleur choix pour la synthèse de ce type de composés organophosphorés à partir de trois réactifs simples : un aldéhyde, une amine et un di- ou tri-alkylphosphites.

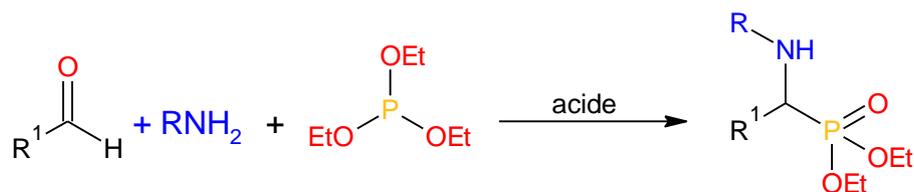


Schéma III 1: Schéma de la réaction à trois composants de Kabachnik-Fields utilisé pour la synthèse des α -aminophosphonates

La réaction de *Kabachnik-Fields* a été rapportée en 1952 par le chimiste soviétique *Martin Izrailevich Kabachnik* [10] et le chimiste américain *Ellis K. Fields* [11]. Elle peut être considérée comme une variante de la réaction de *Pudovik*, découverte en 1950 [12]. La réaction de *Kabachnik-Fields* peut également être considérée comme un cas spécifique de la réaction de *Mannich*, dans laquelle l'atome de phosphore nucléophile remplace l'énolate pour mettre en œuvre l'addition nucléophile sur la liaison double C=N. Par conséquent, il peut parfois être appelé la réaction *phospha-Mannich* [13]. Actuellement, la réaction de *Kabachnik-Fields* semble être la méthode la plus efficace pour préparer les α -aminophosphonates.

III.2.2.1 Synthèse du composé diethyl [(2-hydroxy-5-methylphenyl)amino] (phenyl)methyl}phosphonate, 5-HMAP

Dans un ballon bicol à fond rond de 250 mL on solubilise 0,1 mole de 2-amino-4-méthylphenol (1.256 g) et 0.1 mole de diéthylphosphite (1.775 mL), dans 20 mL d'éthanol, ensuite après 10 min d'agitation à froid 0.1 mol de benzaldéhyde (1.031 mL) et trois gouttes de l'acide chlorhydrique 36% ont été ajoutés, enfin le mélange a été chauffé à reflux pendant 4 heures sous agitation. L'évolution de la réaction a été contrôlé par CCM en utilisant un système d'élution constituée d'acétate d'éthyle/n-hexane (3/2) à la fin de la réaction on obtient un mélange de couleur marron clair, puis ce mélange a été laissé refroidir à température ambiante. Aucun précipité n'a été formé durant la période de refroidissement. L'évaporation du solvant en excès donne des monocristaux de couleur marron claire (figure III 1) avec un rendement de 80 %. Après un pic up, nettoyage avec d'huile de paraffine, les cristaux sont prêts à être analysés par les RX. Le schéma III 2, montre la séquence réactionnelle de la synthèse effectuée.

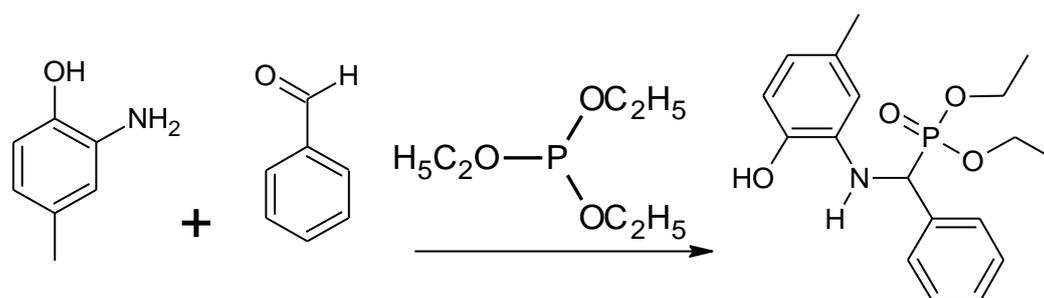


Schéma III 2: Schéma réactionnel de synthèse de la molécule diéthyl [(2-hydroxy-5-méthylphényl)amino](phényl)méthylphosphonate, (5-HMAP)

III.2.2.2 Synthèse de la molécule diéthyl [(2-hydroxy-5-nitrophényl)amino](phényl)méthylphosphonate, 5-HNAP

Dans un ballon de 250ml, on introduit 0.1 mole (1.573 g) de 2-amino-4-nitrophenol et 0.1 mole (1.775 mL) de triéthylphosphite dissoute dans 20 mL d'éthanol. Ensuite, on met le mélange sous agitation. Après 10 minutes d'agitation on ajoute 0.1 mol (1.031mL) de benzaldéhyde gout à gout et trois gouttes d'HCl 36%. Enfin on porte le mélange à reflux pendant 4 heures. Après on laisse le mélange refroidir et on élimine l'excès de l'éthanol par évaporation à l'air libre. Après le séchage total de l'éthanol, des monocristaux de couleur jaune sont récupérés avec un rendement de 75 %.

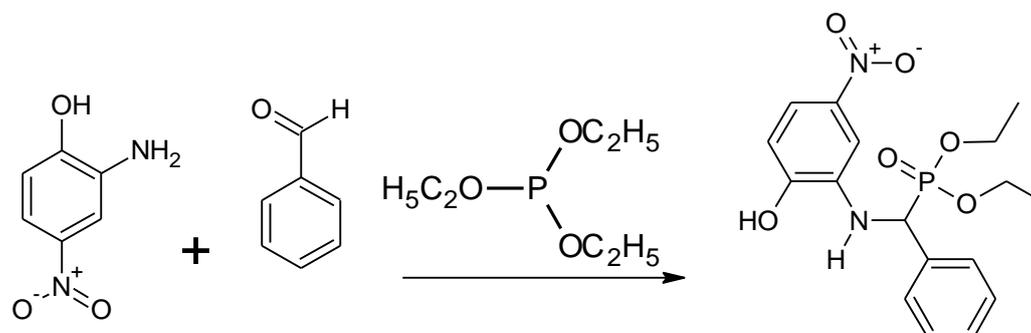


Schéma III 3: Schéma réactionnel de synthèse de diéthyl [(2-hydroxy-5-nitrophényl) amino](phényl)méthylphosphonate (5-HNAP)

III.2.2.3 Synthèse de diethyl {[2-hydroxy-4-nitrophenyl]amino} (phenyl)methylphosphonate, 4-HNAP

La molécule **4-HNAP** a été synthétisée selon la même procédure, on fait réagir 0.1 mole de 2-amino-5-nitrophenol (1.605mg) avec 0.1 mol de triéthylphosphite (1.031 mL) dans 20 mL d'éthanol, après 10 minutes d'agitation on ajoute 0.1 mol de benzaldéhyde (1.775 mL) et trois gouttes d'HCl 36%. Après 4h d'agitation à reflux le mélange réactionnel est laissé à l'air libre pour être séché. Après séchage total on observe la formation des monocristaux jaune, le rendement de ce produit est 85 % (tableau III 7).

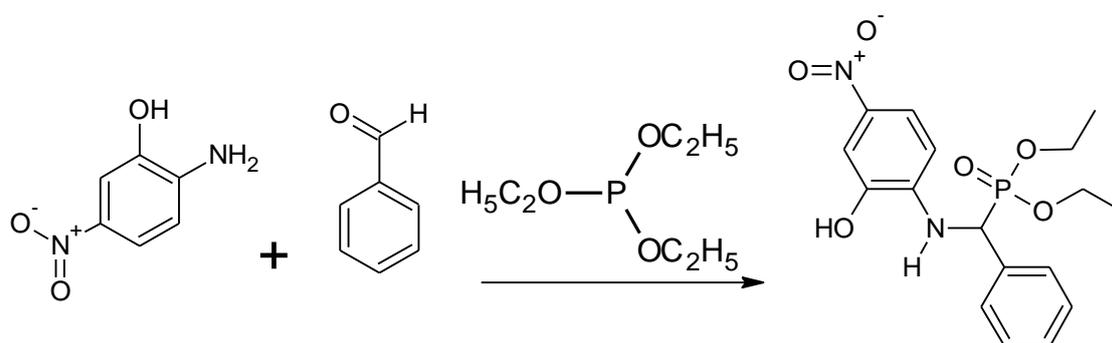


Schéma III 4: Schéma réactionnel de synthèse de diethyl {[2-hydroxy-4-nitrophenyl]amino}(phenyl)methylphosphonate, 4-HNAP

III.2.3 Mécanismes réactionnels

La synthèse des molécules α -aminophosphonates, 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP, se fait selon la réaction de *Kabachnik-Fields*, optimale pour la synthèse des composés α -aminophosphonates, grâce à la disponibilité aisée des matières premières et aussi à sa réalisation facile et simple.

Jusqu'à ces derniers temps, il n'y avait pas d'accord clair et un point de vue uniforme des chercheurs sur le mécanisme de cette réaction, et les résultats proposés étaient souvent incohérents. Beaucoup de contradictions dans l'interprétation du mécanisme de la réaction *Kabachnik-Fields* ont été surmontées après des recherches complexes basées sur l'utilisation de méthodes cinétiques, spectrales et synthétiques [14–17]. Le nombre de publications qui décrivent les variations des procédures de la réaction de *Kabachnik-Fields* est énorme. La plupart de ces protocoles sont considérés par les auteurs comme des protocoles "verts". Pour cette raison, nous n'avons pas l'intention d'examiner de manière exhaustive toutes les données de la littérature.

Le premier mécanisme implique une réaction initiale de l'amine avec le composé carbonyle pour donner une imine, suivie de l'ajout du phosphite à la liaison C=N (comme dans la réaction de Pudovik) pour fournir le α -aminophosphonate (*voie I*).

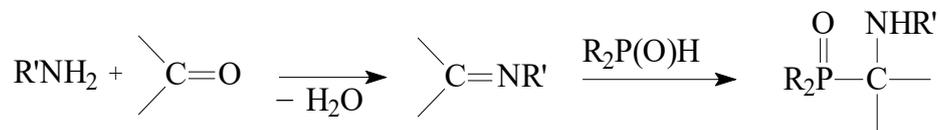


Schéma III 5: Voie I, de la synthèse des α -aminophosphonates à travers la formation d'une imine lors de la réaction

Une autre possibilité impliquerait la formation d'un intermédiaire α -hydroxyphosphonate. Selon cette proposition, un phosphite de di- ou tri-alkyle réagirait avec le composé carbonyle pour donner un α -hydroxyphosphonate (la réaction d'Abramov), suivi d'une substitution du groupe hydroxyle du α -hydroxyphosphonate par une amine pour fournir l' α -aminophosphonate (*voie II*).

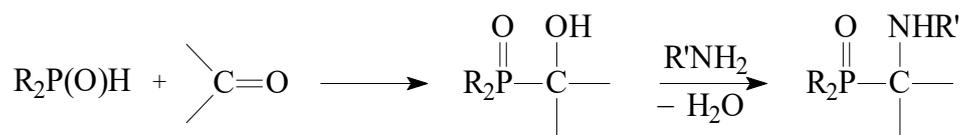


Schéma III 6: Voie II de la synthèse des α -aminophosphonates, à travers la formation d'un intermédiaire α -Hydroxyphosphonates lors de la réaction

Ces mécanismes dépendent de la nature des substrats ; souvent, la basicité de l'amine permet de déterminer la voie que suit la réaction. Des amines peu basiques comme l'aniline, qui peuvent agir comme donneurs de proton dans des liaisons hydrogènes, favorisent la formation de l'imine, alors que les amines alkylées comme la cyclohexanamine ne forment pas d'imine[13,18].

Aucun de ces mécanismes ne s'est encore avéré sans ambiguïté, et le raisonnement disponible n'est pas rarement controversé et s'appuie sur des preuves indirectes. Pour prédire le chemin de nos réactions, nous avons proposé, sur la base des résultats d'études de la modélisation moléculaire grâce au logiciel *Gaussien 09* qui permettent la détermination des indices de la réactivité chimiques de chaque réactif (la dureté et la mollesse) via les énergies *HOMO-LUMO*.

III.2.3.1 Calculs pour prédire le mécanisme réactionnel

L'étude du mécanisme réactionnel de la synthèse de nos molécules a été réalisée en utilisant le programme Gaussien 09, les résultats obtenus sont visualisés au moyen du logiciel *GaussView 5.0.8* [19]. Les calculs ont été effectués au niveau DFT « *density functional theory* » avec la base standard 6-31G (d,p). Nous avons utilisé la fonctionnelle B3LYP dans laquelle l'énergie d'échange est calculée par la méthode de Becke à trois paramètres et la corrélation par la méthode de Lee, Yang et Paar [20–22]. Après optimisation de la géométrie des réactifs, on a calculé leurs gaps énergétiques LUMO/HOMO ainsi que leurs indices de réactivité globaux dérivant de la DFT telle que le potentiel chimique électronique μ et l'indice d'électrophilicité globale ω pour déterminer le transfert électronique durant la réaction phosphamanich de kabachnik-field.

Dans cette partie, nous avons réalisé une étude théorique de la réaction des aminophénols avec le benzaldéhyde et le triéthylphosphite, nous avons discuté, du point de vue basé sur les orbitales et par les indices de réactivités globaux, que le chemin de la réaction de formation des α -aminophosphonates de ce travail, suit la voie de formation d'une imine **Voie I**.

Les énergies (en a.u) des orbitales frontières (LUMO et HOMO), sont présentées dans le tableau III 3.

Tableau III 3: Les énergies (en u.a) des orbitales frontières (LUMO et HOMO) où *ampl* : aminophénol, *ben* : benzaldéhyde et *TEP* : Triéthylphosphite

Réactifs	ELUMO	EHOMO	HOMO _{ampl} LUMO _{benz}	HOMO _{benz} LUMO _{TEP}
Triéthylphosphite (TEP)	-0.01026	-0.30368	-	0.26287
Benzaldéhyde	-0.08141	-0.27313	-	-
2amino-4-methylphenol	-0.01566	-0.20776	0.12635	-
2amino-4-nitrophenol	-0.10757	-0.24538	0.16397	-
2amino-5-notrophenol	-0.10402	-0.23505	0.15364	-

D'après la théorie des orbitales frontières, lors de l'interaction entre deux molécules, les orbitales frontières à considérer sont l'HOMO de l'une et la LUMO de l'autre, choisies de telle sorte que l'écart énergétique ΔE qui les sépare soit le plus faible possible [23].

Les résultats suggèrent un transfert électronique d'aminophénols (ampl) vers le benzaldéhyde en donnant un écart énergétique correspondant à la combinaison $HOMO_{(ampl)} / LUMO_{(benz)}$ inférieur à celui correspondant à la combinaison $HOMO_{(benz)} / LUMO_{(TEP)}$. Les valeurs des énergies ΔE (u.a), La dureté η , ainsi que l'indice d'électrophilicité globale ω de chaque réactif sont mentionnés dans le tableau III 4.

Tableau III 4: Paramètres de prédiction du mécanisme réactionnel.

Réactifs	$\Delta E(u.a) = E_{(LUMO)} - E_{(HOMO)}$	La dureté $H(u.a) = 1/2 (E_{LUMO} - E_{HOMO})$	l'indice d'électrophilicité globale $\omega(u.a)$
<i>TEP</i>	0.29342	0.14671	0.08397376
<i>benzaldehyde</i>	0.19172	0.09586	0.1639091
<i>2amino-4-methylphenol</i>	0.1921	0.09605	0.0649616
<i>2amino-4-nitrophenol</i>	0.13781	0.068905	0.22598814
<i>2amino-5-notrophenol</i>	0.13103	0.065515	0.21935523

D'après les résultats mentionnés dans le tableau III 4, on observe que la dureté du benzaldéhyde est inférieure à celle du TEP, ce qui implique que le TEP est plus dur que les autres réactifs nucléophiles (amines), il est donc plus stable et moins réactif. C'est le réactif nucléophile le plus faible par rapport aux aminophénols, le benzaldéhyde est la molécule la plus molle et plus réactive ; c'est le réactif électrophile. C'est celui qui doit subir une attaque nucléophile [24]. D'autre part les aminophénols sont des réactifs plus nucléophiles que le TEP. Ils vont attaquer les sites électrophiles (benzaldéhyde) mieux que le TEP, de plus, les indices d'électrophilicité globale des aminophénols sont supérieurs à celui du TEP, ce qui confirme que les aminophénols sont plus nucléophiles expliquant ainsi l'attaque nucléophile des aminophénols. Enfin, on peut conclure que les gaps HOMO / LUMO, les valeurs des potentiels chimiques électroniques et les indices d'électrophilicité globale deviennent un transfert électronique des aminophénols vers le benzaldéhyde ce qui est en bon accord avec le mécanisme proposé selon la voie de la formation d'une imine in situ.

D'après cette étude, il est clair que : La voie I, représente le chemin essentiel de notre réaction, dans la première étape, l'aminophénol (réactif plus nucléophile) attaque le carbone de la fonction carbonyle de l'aldéhyde (réactif électrophile). Le résultat est un zwitterion, qui

réagit par réarrangement d'un atome d'hydrogène et l'élimination ultérieure d'eau ce qui conduit à la formation d'une imine. Dans l'étape suivante, le TEP est ajouté à l'imine. Ce qui conduit en fin de compte à la formation de l'ester α -aminophosphonate.

Le mécanisme de formation des esters α -aminophosphonates détaillé se décompose en succession d'étapes suivantes :

- Protonation, en milieu acide (HCl), du benzaldéhyde.
- Attaque nucléophile par les doublets libres de l'azote de la fonction amine et la formation d'une imine.
- Attaque nucléophile par les doublets libres du phosphore du triéthylphosphite est la formation de l' α -aminophosphonate.

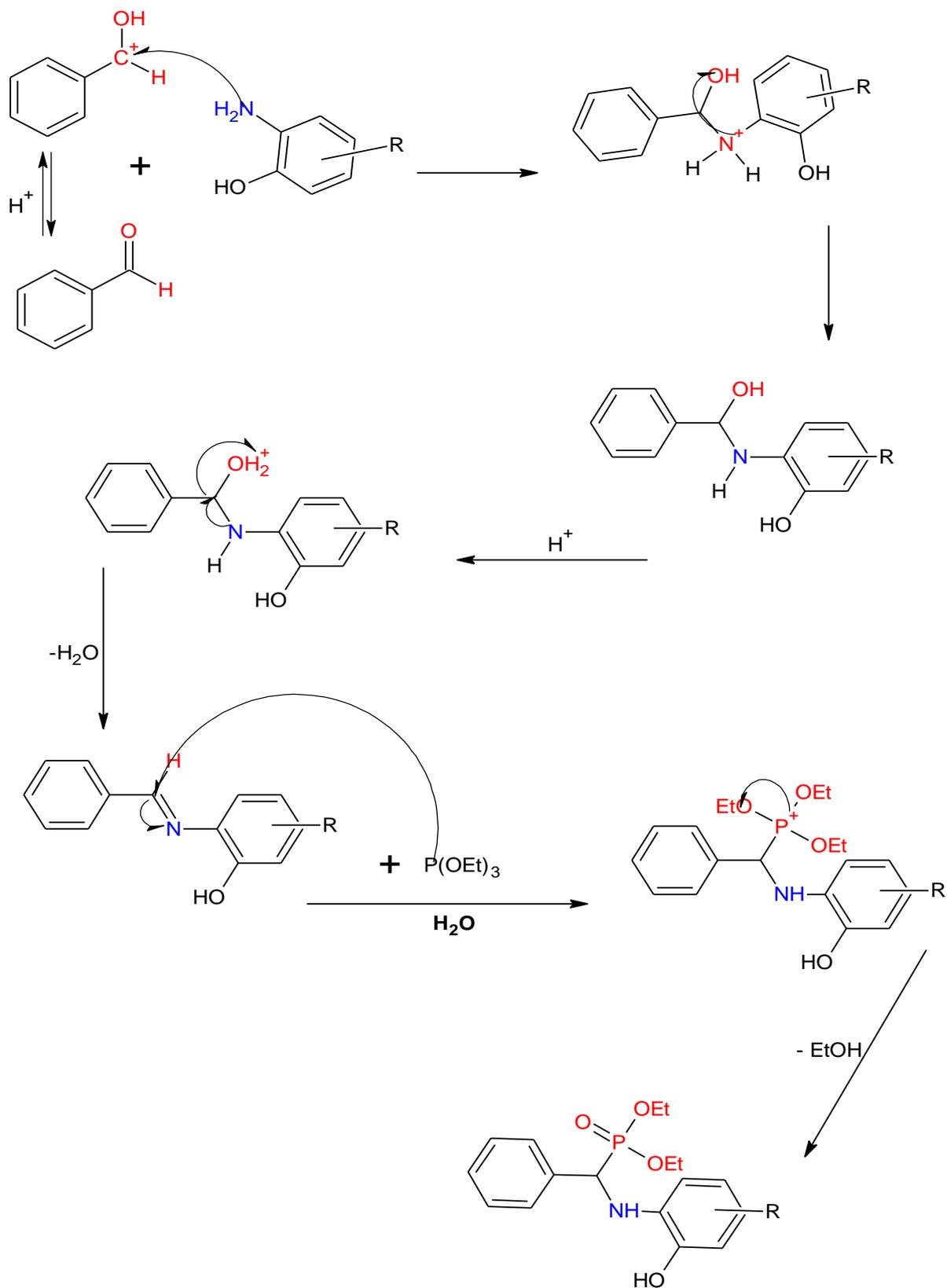


Schéma III 7: Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des ester α -aminophosphonates 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP

III.3 Caractérisation des produits synthétisés

III.3.1 Détermination des propriétés physiques des produits synthétisés

III.3.1.1 Analyse chromatographique par CCM

L'avancement des réactions de synthèse a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaques de gel de silice 60 F254 (Merck) (40-63 μm) en utilisant un mélange d'acétate d'éthyle / n-hexane (2/3, V/V) comme éluant. L'analyse des plaques sous une lampe UV permet d'estimer la fin des réactions, la nature de la réaction, réversible ou irréversible et de confirmer si les produits obtenus sont purs ou non. Dans notre cas, l'apparition d'une seule tache, pour chaque produit synthétisé, différente de celle du produit de départ, constituée un critère de confirmation de l'obtention de nouveaux produits, alors que la disparition de l'un des produits de départ confirme que la réaction est irréversible, elle est totale.

La CCM nous a permis de déterminer le rapport frontal R_f , de chaque produit. Le rapport frontal (R_f) est un paramètre caractéristique de chaque espèce, facile à déterminer en tant que rapport de la distance parcourue par l'espèce isolée et celle parcourue par l'éluant, sa valeur dépende de la polarité de la substance, d'éluant et de l'adsorbant.

$$R_f = \text{hauteur de la tache} / \text{hauteur du front du solvant} \quad [\text{III. 1}]$$

Tableau III 5: Rapports frontaux des produits des produits analysés par CCM, de départ et les composés synthétisés

produit	R_f
<i>2amino-4-methylphnol</i>	0.52
<i>2amino-4-nitrophenol</i>	0.46
<i>2amino-5-notrophenol</i>	0.26
<i>5-HMAP</i>	0.91
<i>5-HNAP</i>	0.71
<i>4-HNAP</i>	0.61

Les résultats présentés dans le tableau III 5, indiquent que les composés séparés sont différents entre eux-mêmes et avec ceux des produits de départ, les valeurs de R_f bien différentes révèlent la différence de polarité de ces composés, et indiquent que les produits

synthétisés sont moins polaires que les réactifs de départ, ils sont purs et faciles à séparer, leur polarité suit l'ordre croissant suivant :



III.3.1.2 Aspects générales des molécules synthétisées

Les résultats obtenus montrent que les α -aminophosphonates synthétisés sont des solides monocristaux de couleur jaune et marron clair (figure III 1), avec un bon rendement, allant de 75 à 85% (Tableau III 7).

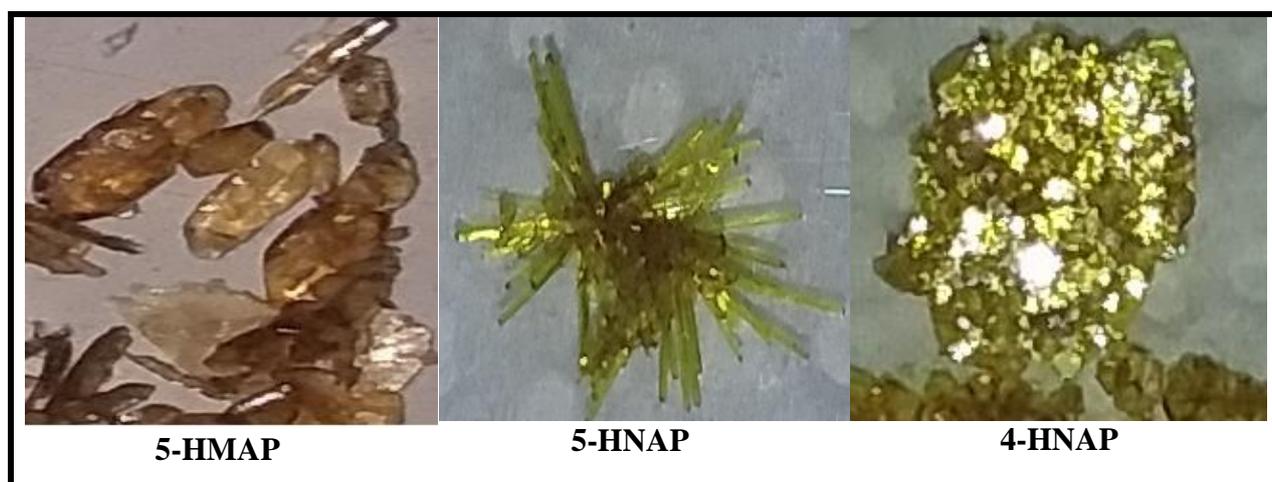


Figure III 1: *Etat physique et couleurs des α -aminophosphonates synthétisés*

III.3.1.3 La solubilité des α -aminophosphonates synthétisés

La solubilité est un paramètre physique caractéristique de la matière, c'est la capacité d'un soluté à se dissoudre dans un solvant, pour former un mélange homogène. Nous avons étudié la solubilité des dérivés α -aminophosphonates synthétisés dans des solvants à polarités différentes, le tableau III 6, regroupe les résultats des tests de solubilité effectués.

Tableau III 6: Solubilité des produits synthétisés dans les solvants organiques principaux et dans l'eau

solvant	5-HMAP	5-HNAP	4-HNAP
DMSO	très soluble	très soluble	très soluble
DMF	très soluble	très soluble	très soluble
éthanol	soluble	soluble	soluble
méthanol	soluble	soluble	soluble
acétone	soluble	soluble	soluble
chloroforme	très soluble	soluble	soluble
Ether de pétrole	insoluble	insoluble	insoluble
n-hexane	insoluble	insoluble	Peu soluble
dichlorométane	soluble	peu soluble	soluble
Acétate d'éthyle	peu soluble	peu soluble	peu soluble
H ₂ O	insoluble	insoluble	insoluble

III.3.1.4 Points de fusion des α -aminophosphonates synthétisés

Le point de fusion est un critère de pureté d'une substance solide qui présente un point de fusion bien net.

La mesure de points de fusion a donné les résultats portés dans le tableau III 7, ils montrent que les produits synthétisés sont différents à celle du produit de départ, ceci confirme que les produits obtenus ont des structures chimiques différentes à celles de produits de départs.

Tableau III 7: Caractères principaux des produits synthétisés.

<i>Produits</i>	<i>Formule brute</i>	<i>M (g/mol)</i>	<i>Couleur</i>	<i>Rendement</i>	<i>T_f (°C)</i>
2-A4MP	C ₇ H ₉ NO	123.15	marron	-	136
2-A4NP	C ₆ H ₆ N ₂ O ₃	154.12	marron	-	144.0
2-A5NP	C ₆ H ₆ N ₂ O ₃	154.12	jaune	-	208.5
5-HMAP	C ₁₈ H ₂₄ NO ₄ P	349.36	marron claire	80%	156
5-HNAP	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O ₆ P	380.33	jaune	75%	214
4-HNAP	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O ₆ P	380.33	jaune	85%	190

III.3.2 Propriétés spectroscopiques des produits synthétisés

III.3.2.1 Analyse par la spectroscopie infrarouge (FT-IR)

L'analyse par la spectroscopie FT-IR est primordiale pour la confirmation des structures moléculaires des molécules préparées, les mesures FT-IR ont été réalisées entre 600 et 4000 cm⁻¹. Nous avons analysé les produits de départ et les produits synthétisés afin de pouvoir comparer les différents spectres caractéristiques des composés impliqués dans la synthèse correspondante. Les figures III (2, 3, 4), illustrent les spectres IR des composés synthétisés : 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HMAP et ceux des aminophénols correspondants.

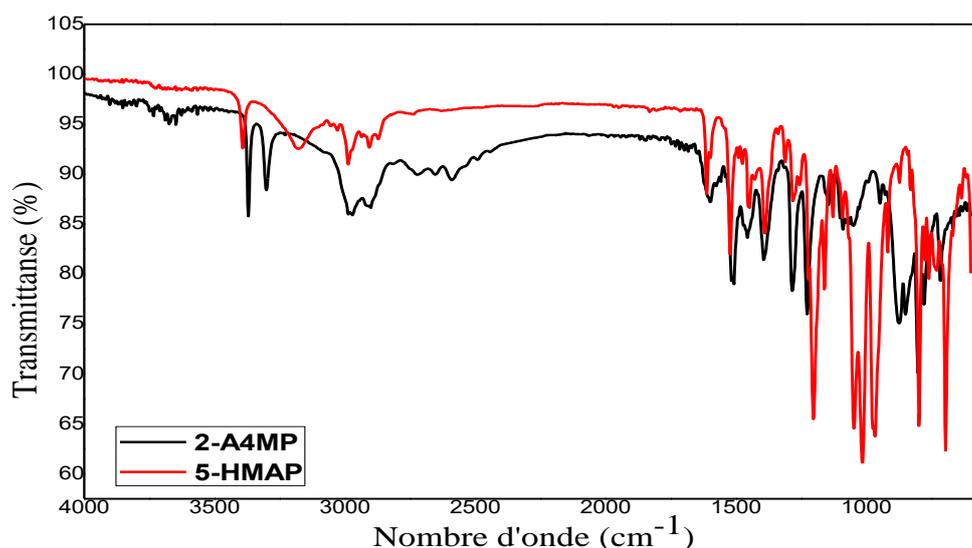


Figure III 2: Spectres infrarouge caractéristiques des molécules 5-HMAP et 2-amino-4-méthylphénol (2-A4MP)

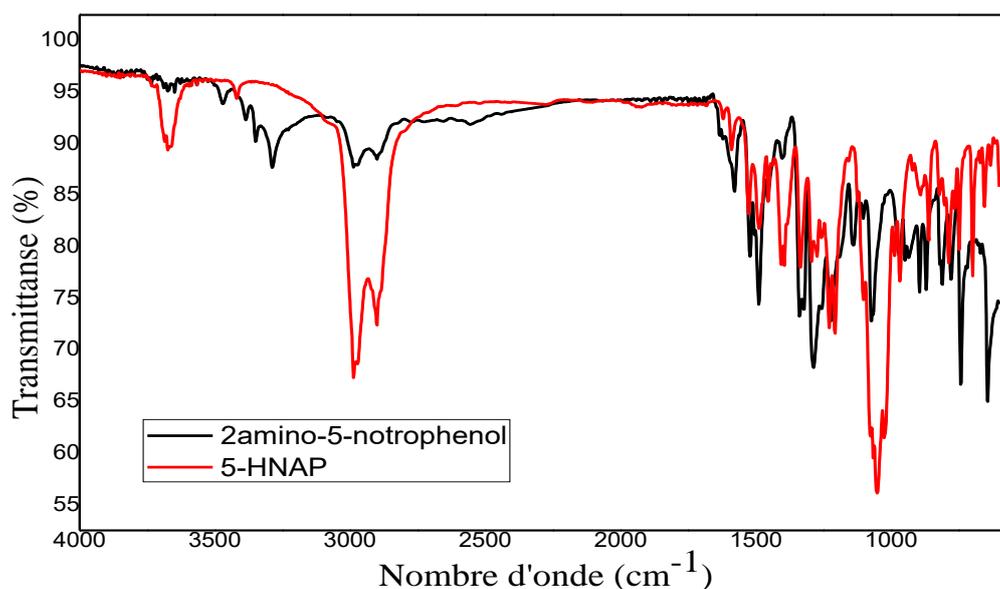


Figure III 3 : Spectres infrarouge caractéristiques des molécules 5-HNAP et 2-amino-4-nitrophenol (2-A4NP)

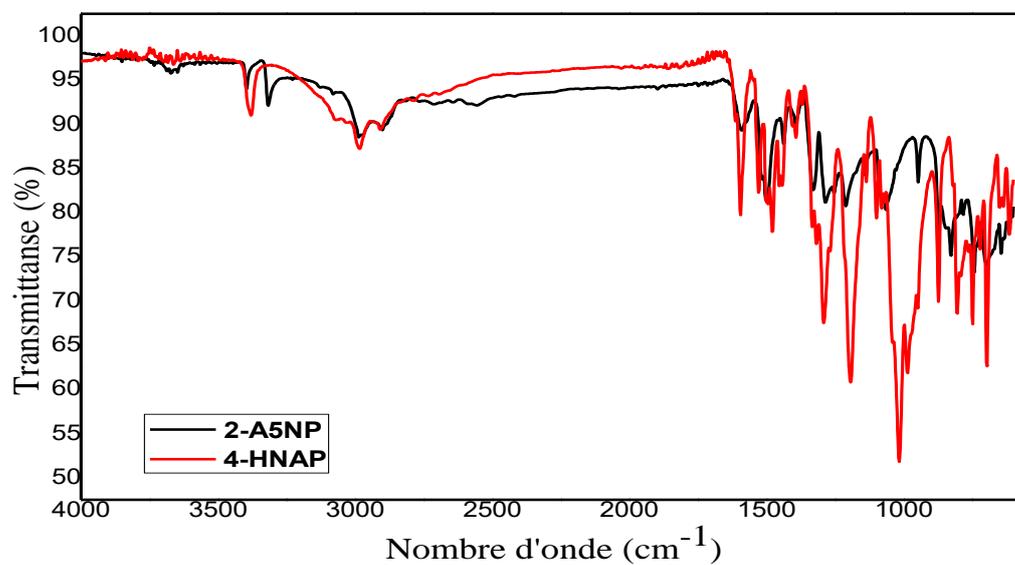


Figure III 4 : Spectres infrarouge caractéristiques des molécules 4-HNAP et 2-amino-5-nitrophenol (2-A5NP)

Le tableau III 8, regroupe les pics IR apparaissant sur les spectres caractéristiques des molécules étudiées, ainsi que leurs possibles attributions. Nous les avons classées, ci-dessous, en deux familles, l'une regroupant les liaisons existant initialement dans les molécules de départ et l'autre regroupant les nouvelles liaisons dans les molécules synthétisées. En effet,

dans le cas de formation d'un nouveau produit, on observe un déplacement des pics et l'apparition ou la disparition d'autres. Les vibrations IR associées aux groupes fonctionnels principaux et caractéristiques sont résumées dans le tableau III 8 et représentées sur Les figures ci-dessus.

Tableau III 8: Principaux pics caractéristiques des vibrations IR des produits synthétisés et leurs produits de départ correspondant, avec : Phe. (phénol), A.pri. (Amine primaire), A.sec (Amine secondaire), Aliph. (Aliphatique), Ar. (aromatique)

<i>Fréquences cm⁻¹</i>						
<i>Attributio</i>	<i>2-A4MP</i>	<i>5-HMAP</i>	<i>2-A4NP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>2-A5NP</i>	<i>4-HNAP</i>
$\bar{\nu}_{O-H}$ Phe	3676	3644	3663	3656	3671	3659
$\bar{\nu}_{N-H}$ A.pr <i>i</i>	3368 et 3296	-	3450 et 3373	-	3392 et 3316	-
$\bar{\nu}_{N-H}$ A.se	-	3393	-	3412	-	3385
$\bar{\nu}_{C-N}$ Alip <i>l</i>	-	1125	-	1101	-	1101
$\bar{\nu}_{C-H}$ Alip <i>l</i>	2979-2918	3117-2850	-	3015-2872	-	3063-3023
$\bar{\nu}_{C-H}$ Ar <i>l</i>	1996-1651	1969-1654	2174-1663	2134-680	2033-1642	2033-1677
$\bar{\nu}_{C=C}$ Ar	1600	1616	1581	1587	1590	1590
$\bar{\nu}_{C-C}$	-	963	-	968	-	881
$\bar{\nu}_{P-CH_2}$	-	1309	-	1388	-	1298
$\bar{\nu}_{P=O}$	-	1204	-	1208	-	1194
$\bar{\nu}_{P-O}$	-	963	-	961	-	985
$\bar{\nu}_{P-O-C}$	-	1014 et 694	-	1054 et 785	-	1012 et 695

Les spectres enregistrés pour les produits synthétisés, sur les figures III (2, 3, 4), indiquent des différences bien claires entre les amines de départ et les composés synthétisés, ce qui différencie ces spectres c'est surtout la disparition totale de la bande empreinte des amines primaires, 2-A4MP (3368-3296 cm⁻¹), 2-A4NP (3450 et 3373 cm⁻¹) et 2-A5NP (3392 et

3316 cm^{-1}) sur les spectres des molécules synthétisées et l'apparition des nouvelles bandes d'absorption caractéristiques des composés phosphorés. Les spectres IR des α -aminophosphonates présentent des pics caractéristiques attribués aux vibrations P=O, P-C et P-O-C, notons que la position des bandes d'absorption P-C et P=O dépende fortement du type des substituants,

S. A. *Katcyba et all* ont rapporté des études plus détaillées sur des spectres vibrationnels de certains représentants des phosphonates [25].

Comme remarque générale, nous devons souligner que le chevauchement important des bandes d'absorption complique considérablement l'interprétation des spectres IR. Pour cette raison, nous présentons ici la tentative de fournir une description plus détaillée des principales bandes vibratoires à l'aide de l'analyse vibrationnelle DFT et des données expérimentales. De plus, les fréquences calculées sont mises à l'échelle en utilisant un facteur d'échelle de 0,9614 [26,27].

En raison de la complexité des structures étudiées, toutes les fréquences rapportées correspondent à des mouvements vibrationnels complexes de plusieurs parties de la molécule, telle que les parties alkyle, phényle, phosphonate, NH et CH. Dans les molécules diester 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP, se produit autour de 3400-3000 cm^{-1} . Les modes de déformation NH sont trouvés avec les bandes aromatiques (C=C) entre 1600 et 1500 cm^{-1} . Il est bien connu que les interactions complexes et importantes des modes vibrationnels dans la région 1250-750 cm^{-1} dans les spectres IR ne permettent généralement qu'une description cumulative des bandes dans cette région, tableau III 8. Les calculs théoriques par DFT confirment l'affectation que nous proposons et montrent que dans nos systèmes, divers modes d'étirement des phosphonates (P=O, P-O-C, P-C) sont fortement couplés aux vibrations de (=CH) des deux cycles benzéniques et aux vibrations des groupes ester éthylique.

Les diesters α -aminophosphonates présentent des bandes caractéristiques de la fonction P-O-C phosphonate de 1012 cm^{-1} à 1054 cm^{-1} et de 694 cm^{-1} à 785 cm^{-1} , ces pics sont absents sur les spectres des produit de départ [28–30].

Dans la zone allant de 1194 cm^{-1} à 1208 cm^{-1} on trouve le pic caractéristique de la liaison P=O ces pics sont aussi absents sur le spectre du produit de départ.

La large bande d'absorption observée vers $3600\sim 3650\text{ cm}^{-1}$ provient de l'étirage de $-\text{OH}$ phénolique du groupe phénol dans les aminophénols et les esters α -aminophosphonates synthétisés.

Tous les composés synthétisés présentent des bandes d'absorption du carbone (sp^3) à $2979\text{--}3117\text{ cm}^{-1}$.

Les pics à 1510 cm^{-1} et 1604 cm^{-1} caractérisent les vibrations de cycle aromatique [31].

Le pic principal situé entre 1000 et 1200 cm^{-1} , présente un intérêt particulier. Dans notre cas, il est attribué à la vibration de la liaison P-CH qui pourrait être mis à profit pour confirmer la formation d'une liaison entre le triéthylphosphite et le benzaldehyde.

III.3.2.2 Analyse par la spectrophotométrie UV-visible

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire des rayonnements dans le domaine ultraviolet visible a toujours été une technique de mise en œuvre facile, en s'appuyant sur la structure électronique d'un composé ou plutôt d'une fraction de ce composé pour mettre en évidence sa présence (analyse qualitative), ce qui permet la comparaison des spectres des produits synthétisés avec ceux des produits de départ pour détecter les différences significatives entre les λ_{max} des produits de départ et ceux synthétisés. En effet, λ_{max} est une grandeur caractéristique d'un composé chimique. Elle permet donc de confirmer la formation d'une espèce chimique en solution, distinguée par des maxima d'absorption et des absorbances différentes.

Les spectres électroniques d'absorption des produits analysés ont été enregistrés dans l'éthanol, solvant transparent (non absorbants), à la température ambiante sur des solutions de même concentration 10^{-6} mg/mL dans des cuves en quartz de trajet optique de 1 cm sur le domaine total $200\text{ nm} - 900\text{ nm}$, en utilisant un spectrophotomètre JASCO V-650 piloté par le logiciel Spectra Manager.

Le spectromètre enregistre les longueurs d'onde auxquelles se produit l'absorption, ainsi que le degré d'absorption à chaque longueur d'onde. Les spectres résultants sont présentés sous la forme d'un graphe de l'absorbance (A) en fonction de la longueur d'onde (λ). Les figures III (5, 6, 7), représentent les spectres d'absorption des différentes molécules synthétisées et leurs produits de départ.

- **UV-vis de la molécule 5-HMAP**

La figure III 5, représente les spectres d'absorption UV-visible de la molécule synthétisée 5-HMAP et du produit du départ *2-amino-4-methylphnol* (2-A4MP). Nous constatons que les deux produits présentent une bande d'absorption intense située aux alentours de 212 nm et 217 nm attribuer à l'amine de départ et à la molécule synthétisés correspondant aux transitions électroniques ($\pi \rightarrow \pi^*$) du noyau aromatique, le spectre de l'amine présente un épaulement vers 235 nm, une bande d'absorption d'intensité moyenne à $\lambda_{\max} = 293$ nm attribuées aux transitions électroniques ($n \rightarrow \sigma^*$) des chromophores NH et au groupement phénolique OH de l'amine *2-amino-4-methylphnol*, tandis que le spectre de la molécule 5-HMAP, est caractérisé par deux bandes d'absorptions principales, situées à $\lambda_{\max} = 244$ nm, et à $\lambda_{\max} = 296$ nm, ce qui indique qu'il y a des déplacements bathochromes significatifs correspondants aux nouvelles bandes caractéristiques de la molécule synthétisée par rapport à l'amine de départ.

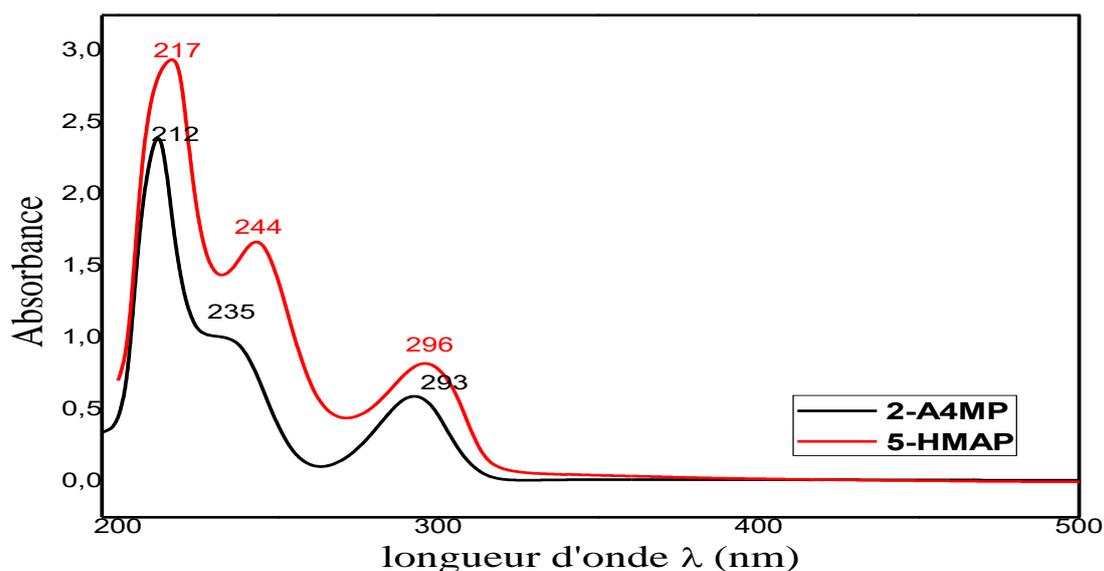


Figure III 5: Spectres UV-vis du composé 5-HMAP et son amine de départ, 2-A4MP enregistrés en éthanol à température ambiante dans une cuve de trajet optique $l = 1$ cm

- **UV-vis de la molécule 5-HNAP**

Les spectres UV-vis de la molécule **5-HNAP** et de son amine de départ 2-amino-4-nitrophénol **2-A4NP**, sont présentés par la **Figure** suivante.

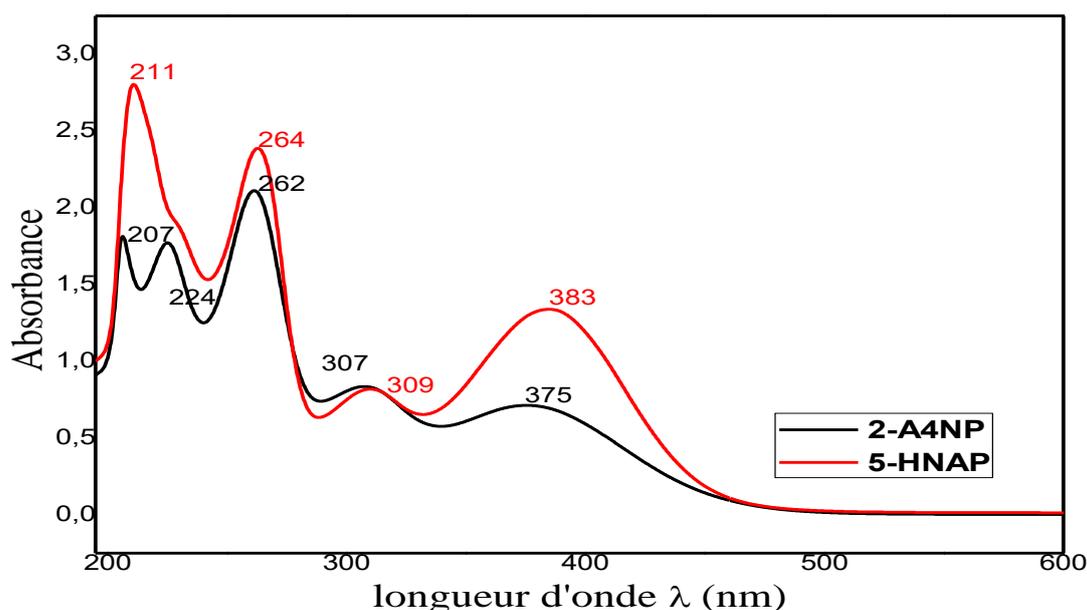


Figure III 6: Spectres UV-vis de la molécule 5-HNAP et son amine de départ 2-A4NP, enregistrés en éthanol à température ambiante dans une cuve de trajet optique $l = 1$ cm

Le spectre UV-vis enregistré pour l'amine **2-A4NP** est caractérisé par cinq bandes d'absorption : deux bandes d'intensité moyenne situées à $\lambda_{\max 1} = 207$ nm et $\lambda_{\max 2} = 224$ nm, une bande très intense située à $\lambda_{\max 3} = 262$ nm et deux bandes larges situées à $\lambda_{\max 4} = 307$ nm et $\lambda_{\max 5} = 375$ nm. Le spectre de la molécule **5-HNAP**, dérivée de cette amine, présente une bande d'absorption située à $\lambda_{\max} = 211$ nm attribuée aux transitions électroniques du noyau aromatique, une bande intense bien définie située à $\lambda_{\max} = 264$ nm et de deux bandes relativement larges situées à $\lambda_{\max} = 309$ nm et $\lambda_{\max} = 383$ nm. On constate la disparition de la bande caractéristique de l'aminophénol de départ 2-A4NP située $\lambda_{\max 2} = 224$ nm, ainsi que des déplacements bathochromes des bandes caractéristiques de la molécule **5-HNAP** par rapport à celles de l'amine de départ.

- **UV-vis de la molécule synthétisée 4-HNAP**

L'amine de départ 2-A5NP utilisé dans la synthèse de la molécule 4-HNAP est caractérisé par les bandes d'absorption de $\lambda_{\max} = 206$ nm, $\lambda_{\max} = 262$ nm et $\lambda_{\max} = 394$ nm attribuées aux transitions électroniques du noyau aromatique et aux groupements NH, NO₂ et OH. Alors que la molécule obtenue 4-HNAP, est caractérisée par trois bandes d'absorption bien définies, et différentes de celles de l'amine, la première située à $\lambda_{\max} = 213$ nm attribuée aux transitions électroniques du noyau aromatique, la deuxième est d'intensité moyenne située à $\lambda_{\max} = 262$ nm et une bande principale intense située à $\lambda_{\max} = 384$ nm, figures III 7.

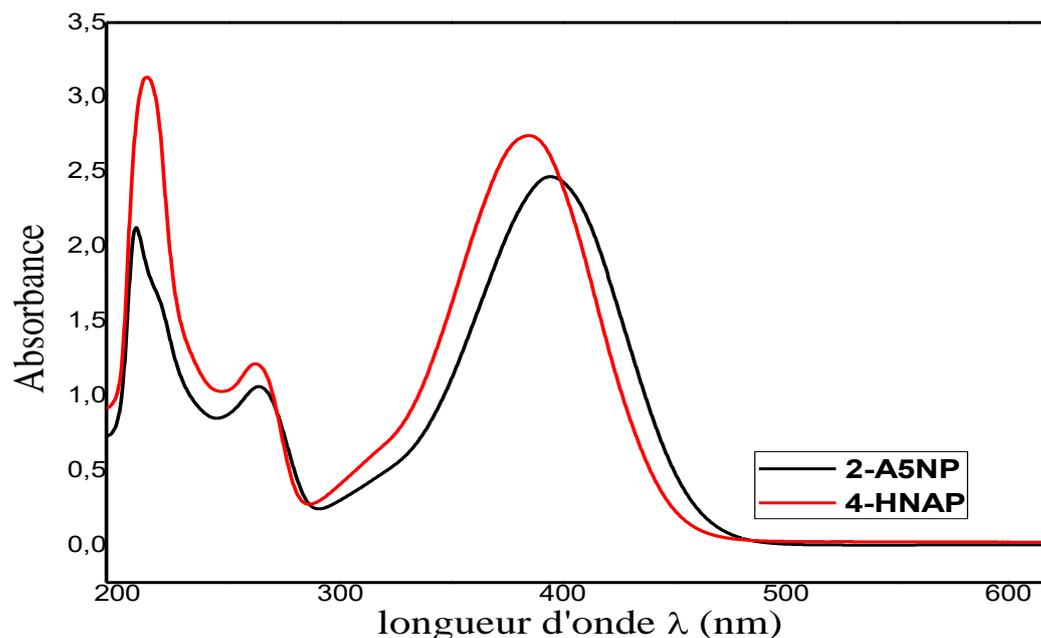


Figure III 7: Spectres UV-vis de la molécule 4-HNAP et son réactif 2-A5NP, enregistrés en éthanol à température ambiante dans une cuve de trajet optique $l = 1$ cm

La comparaison des spectres des produits synthétisés avec ceux des produits de départ (amines), montre l'apparition et la disparition de nouvelles bandes sur les spectres des phosphonates synthétisés bien différentes de celles des produits de départ. Ainsi que des déplacements bathochromes (augmentation de la longueur d'onde λ_{\max}) en général, et un effet hyperchrome (augmentation de l'absorbance), ces déplacements peuvent être expliqués par la présence des groupements phosphonates dans les structures moléculaires des produits synthétisés. L'apparition de ces bandes dans la région UV peut être assignée aux transitions $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$, ce type de transition est lié à la présence des hétéroatomes N et O. Les modifications observées sont liées au griffage de nouveaux substituants sur les molécules de départ qu'à conduit au changement des structures et des masses moléculaires des produits obtenus.

III.3.2.3 Analyse par la spectrométrie de résonance magnétique RMN

Les molécules synthétisées sont caractérisées par la spectroscopie de résonance magnétique, nucléaire RMN, cette technique est capable de fournir des informations précises sur les structures des molécules analysées. Elle est basée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Les spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C , RMN ^{31}P sont enregistrés à l'aide du spectromètre Bruker AC 400. Les déplacements chimiques sont donnés en partie par

million (δ ppm) et les constantes de couplage (J) en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est indiquée par les abréviations suivantes : s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; q, quadruplet ; m, multiplet, massif. Les données spectrales en RMN ^1H sont présentées dans l'ordre : déplacement chimique, multiplicité, constantes de couplage, nombre de proton, attribution.

III.3.2.3.1 Analyse RMN de la molécule 5-HMAP

- **Le spectre RMN ^1H caractéristique de 5-HMAP**

Le spectre RMN ^1H correspondant aux déplacements chimiques de la molécule 5-HMAP est représenté par la figure III 8, il révèle les déplacements chimiques suivants :

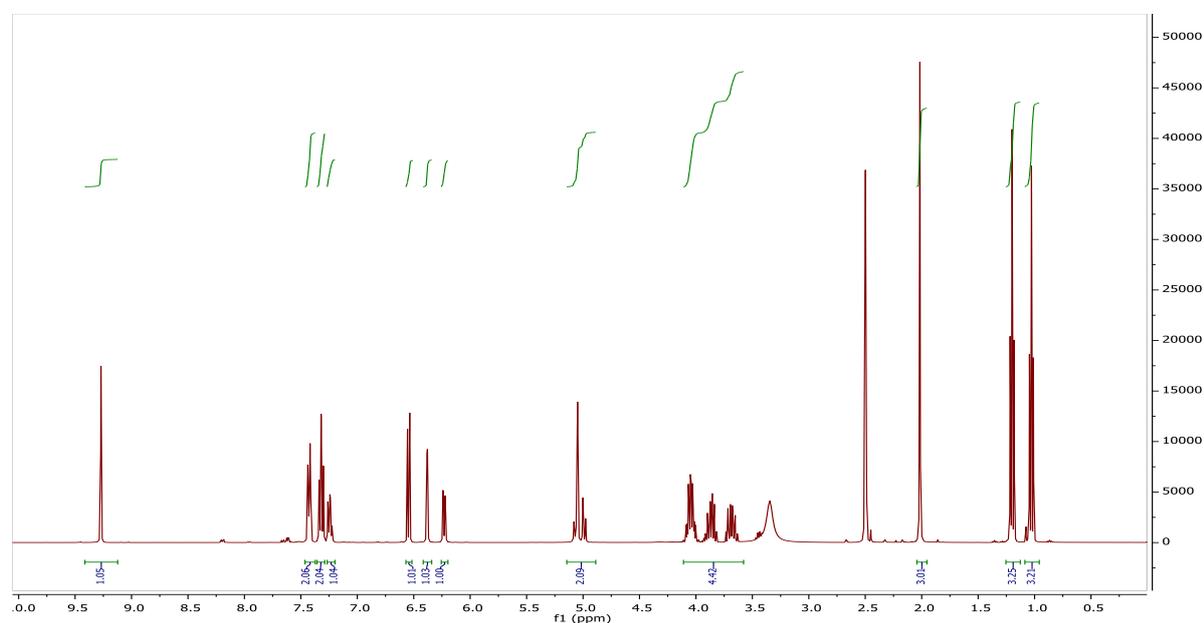


Figure III 8: Spectre RMN ^1H caractéristique de la molécule 5-HMAP

RMN ^1H (^1H NMR (400.13 MHz, DMSO- d_6)), δ (ppm): 1.03 et 1.20 (2 t, $J = 7.0$ Hz, 6 H, P-O-CH $_2$ -CH $_3$), 2.01 (s, 3H, CH $_3$ -5''), 3.35 (s, 1H, NH -1) 3.61– 4.12 (m, 4 H, P-O-CH $_2$ -CH $_3$), 4.94- 5.10 (m, 1H, C-H-1), 6.23 (dd, $J = 7.9, 2.0$ Hz, 1 H, C-H-4''), 6.38 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H, H-6''), 6.55 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H-3''), 7.20-7.28 (m, 1H, C-H-4'), 7.28-7.36 (m, 2H, C-H-3' et C- H-5'), 7.40-7.46 (m, 2H, H-2' et C-H-6'), 9.27 (s, 1 H, O-H-2'').

Les déplacements chimiques observés d'après l'analyse de la molécule 5- HMAP par RMN ^1H correspondent à la structure de la figure III 9 :

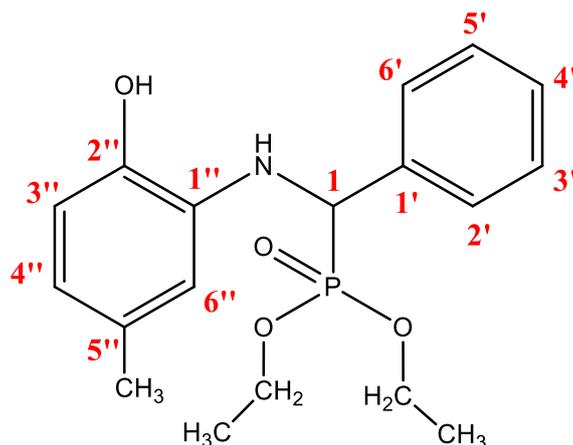


Figure III 9: Structure proposée pour la molécule 5- HMAP d'après l'RMN 1H

- **Spectre RMN ^{13}C caractéristique de la molécule 5-HMAP**

Le spectre RMN ^{13}C correspondant aux déplacements chimiques de la molécule 5-HMAP est représenté par la figure III 10, il révèle les déplacements chimiques suivants :

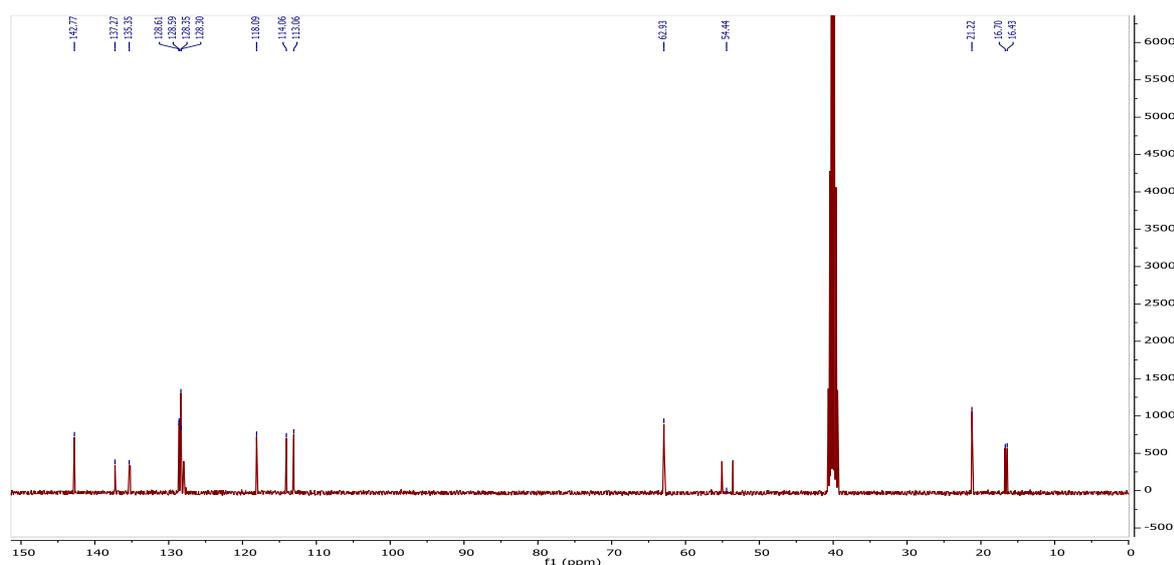


Figure III 10: Spectre RMN ^{13}C caractéristique de la molécule 5-HMAP

RMN ^{13}C (^{13}C NMR (100.75 MHz, DMSO- d_6)) sont, δ : 16.5 et 16.7 2X (P-O-C-CH3), 21.2 (5''-CH3), 54.3 (C-1), 62.9, 2X(P-O-CH2), 113.1 (C-6''),114.1 (C-3''), 118.1 (C-4''), 128.0 (C-4'), 128.3 (C-2' et C-6'),128.4 (C-5''), 128.6 (C-3' et C-5'), 135.3 (C-1'), 137.3 (C-1'), 142.6 (C-2'') ppm.

Les résonances du carbone aromatique et aliphatique protonnés, ont été décrites dans le spectres RMN ^{13}C à l'aide des corrélations 2D HSQC (figure III 11), ces déplacements confirment la structure proposée dans la figure III 9.

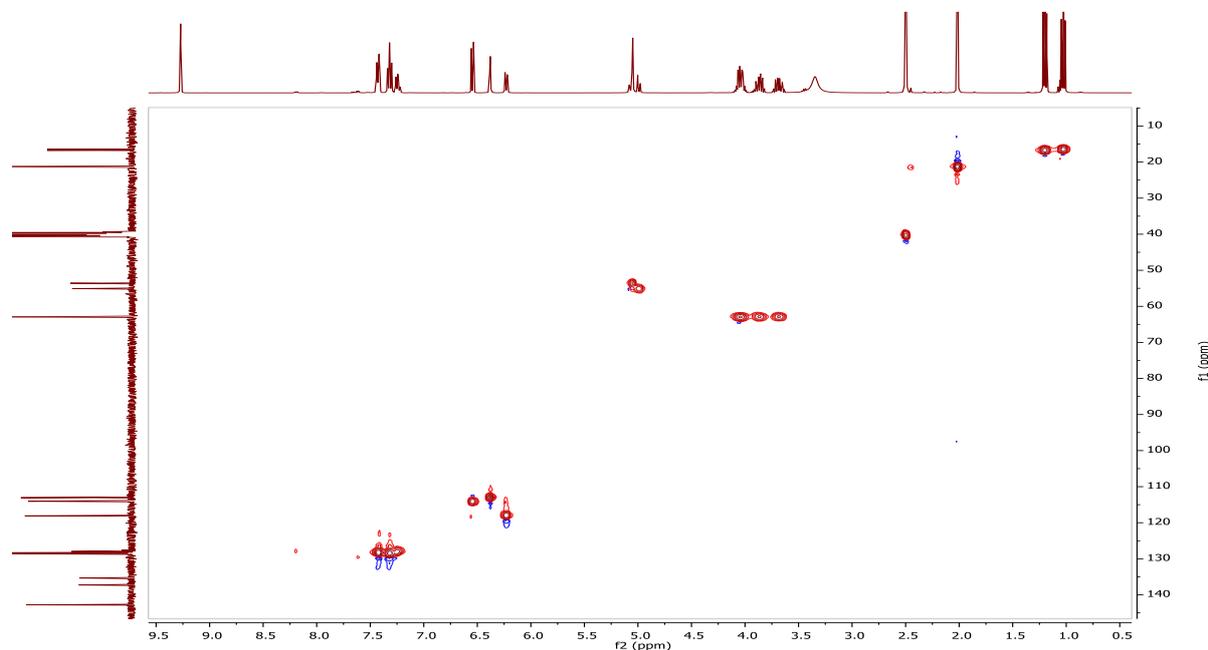


Figure III 11 : Spectre RMN de corrélation hétéronucléaire à courte distance HSQC du composé 5-HMAP, avec les connectivités ^1H - ^{13}C observées

- **Spectre RMN de corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C HMBC de 5-HMAP**

Les principales corrélations HMBC observées dans les spectres du composé 5-HMAP (figure III 12) sont présentées par la figure III 13 :

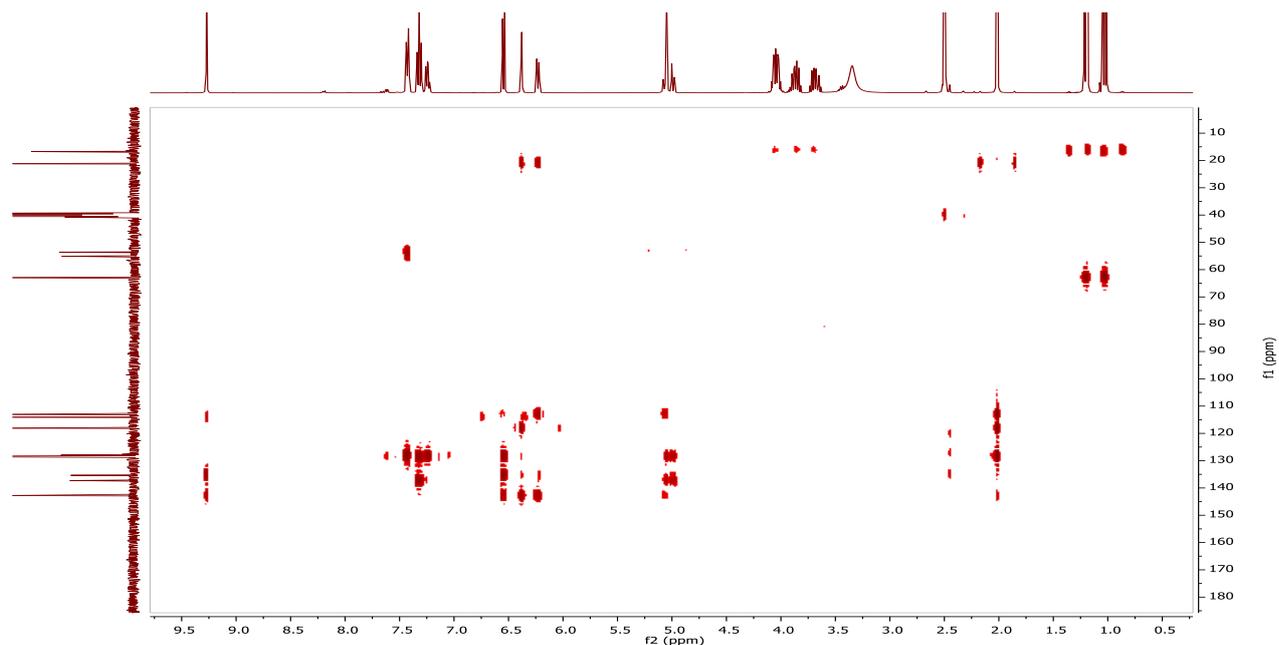


Figure III 12 : Spectre RMN de corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C à longue distance HMBC du composé 5-HMAP, avec les corrélations les plus significatives observées

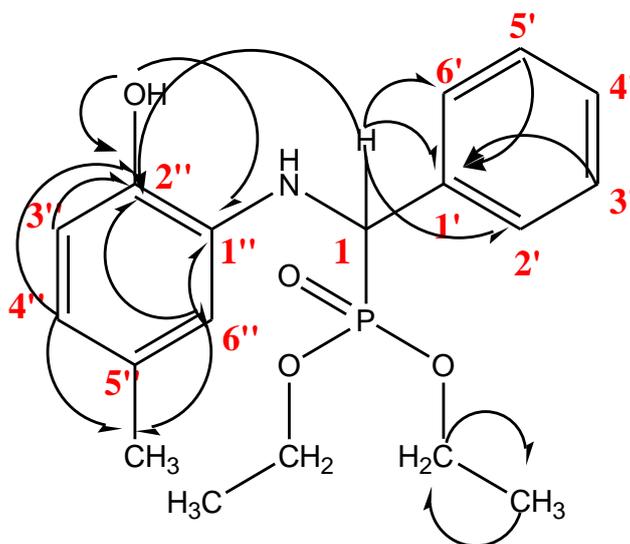


Figure III 13: Principales corrélations HMBC du composé 5-HMAP

Les résultats établis par l'RMN bidimensionnelles sont en bon accord avec les résultats de l'RMN monodimensionnelles.

III.3.2.3 Analyse RMN de la molécule 5-HNAP

- *Le spectre RMN ^1H caractéristique de 5-HNAP*

Le spectre RMN ^1H correspondant aux déplacements chimiques de la molécule 5-HNAP est représenté par la figure III 14, il révèle les déplacements chimiques suivants :

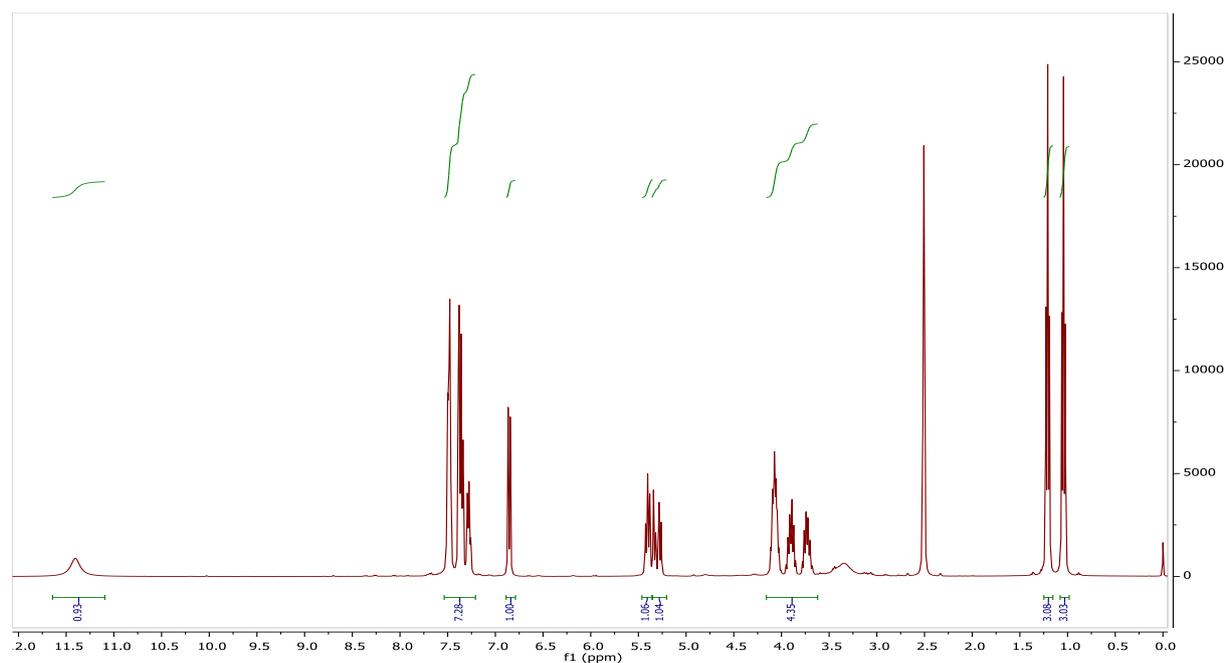


Figure III 14: Spectre RMN ^1H caractéristique de la molécule 5-HNAP

RMN ^1H (400.13 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 1.04 et 1.21 (2 t, $J = 7.0$ Hz, 6 H, P-O-CH₂-CH₃), 3.3 (s, 1H, 1-NH), 3.66– 4.15 (m, 4 H, P-O-CH₂-CH₃), 5.30 (m, $J = 23.2, 9.0$ Hz 1H, CH-1), , 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, CH-6''), 7.32–7.41 (m, 2 H, CH-2' et CH-6'), 7.23–7.54 (m, 3 H, CH-3', CH-4' et CH-5'), 7.23-7.54 (m, 2H, CH-4'' et CH-3''), 11.40 (s, 1 H, 2''-OH) ppm.

Les déplacements chimiques observés d'après l'analyse de la molécule 5-HNAP par RMN ^1H permettent de proposer la structure présentée la figure III 15 :

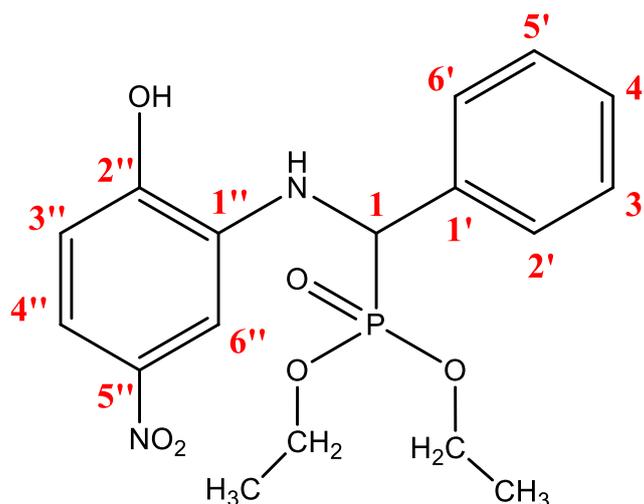


Figure III 15: Structure proposée pour la molécule 5- HNAP d'après l'RMN

- **Spectre RMN ^{13}C caractéristiques de 5-HNAP**

Le spectre RMN ^{13}C correspondant aux déplacements chimiques de la molécule 5-HNAP est enregistré à l'aide de l'appareil Bruker AC 400 (100.75 MHz, DMSO- d_6) et représenté par la figure III 16, ce spectre révèle les déplacements chimiques suivants :

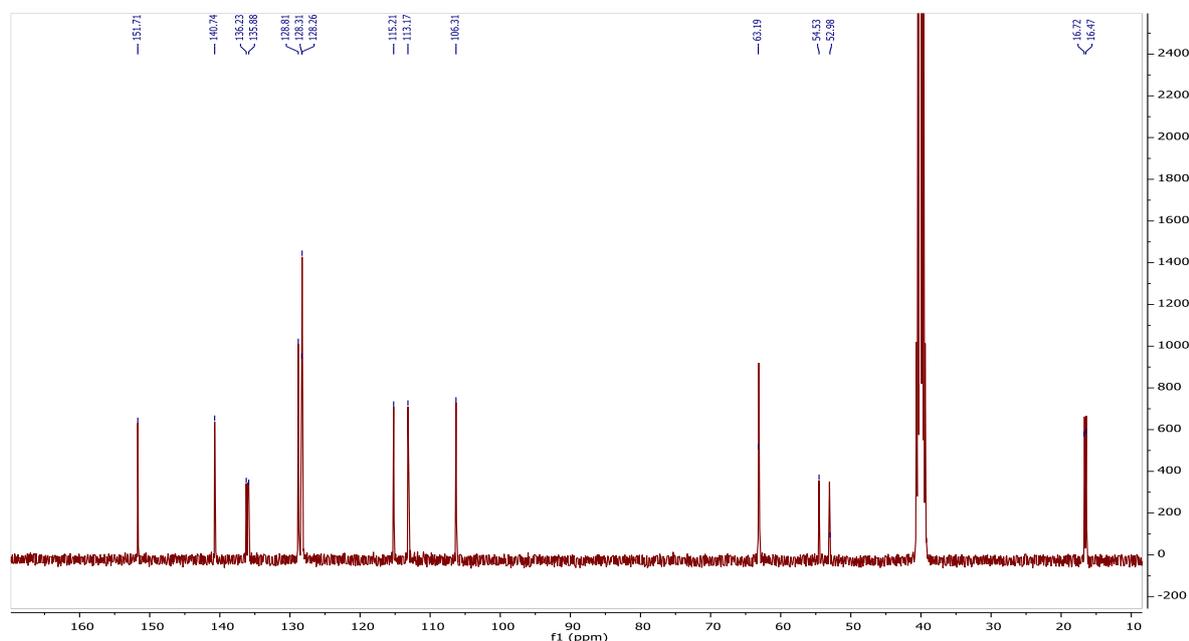


Figure III 16: Spectre RMN ^{13}C caractéristique de la molécule 5-HNAP

RMN ^{13}C (^{13}C NMR (100.75 MHz, DMSO- d_6)), δ (ppm): 16.4 et 16.7, 2X (P-O-C- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 54.5 ($\underline{\text{C}}-1$), 63.1, 2X(P-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$), 106.5 ($\underline{\text{C}}-3''$), 113.2 ($\underline{\text{C}}-6''$), 115.2 ($\underline{\text{C}}-4''$), 128.2 ($\underline{\text{C}}-2'$ et $\underline{\text{C}}-6'$), 128.3 ($\underline{\text{C}}-4'$), 128.8 ($\underline{\text{C}}-3'$ et $\underline{\text{C}}-5'$), 135.9 ($\underline{\text{C}}-1'$), 136.2 ($\underline{\text{C}}-1''$), 140.7 ($\underline{\text{C}}-5''$), 151.7 ($\underline{\text{C}}-2''$).

Les résonances du carbone aromatique et aliphatique protonnés, ont été décrites dans les spectres RMN ^{13}C à l'aide des corrélations 2D HSQC (figure III 17), ces déplacements confirment la structure proposée dans la figure III 15.

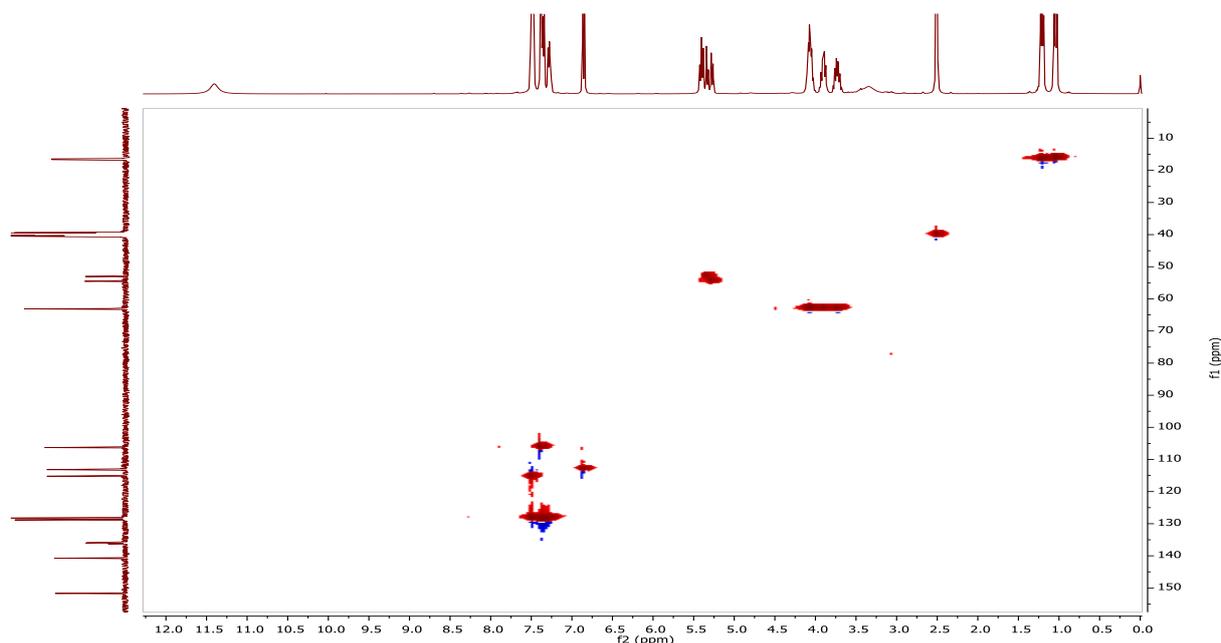


Figure III 17 : Spectre RMN de corrélation hétéronucléaire à courte distance HSQC du composé 5-HNAP, avec les connectivités $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ observées

- **Spectre RMN de corrélation hétéronucléaire $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC de 5-HNAP**

Les principales corrélations HMBC observées dans les spectres du composé 5-HNAP (figure III 18) sont présentées par la figure III 19 :

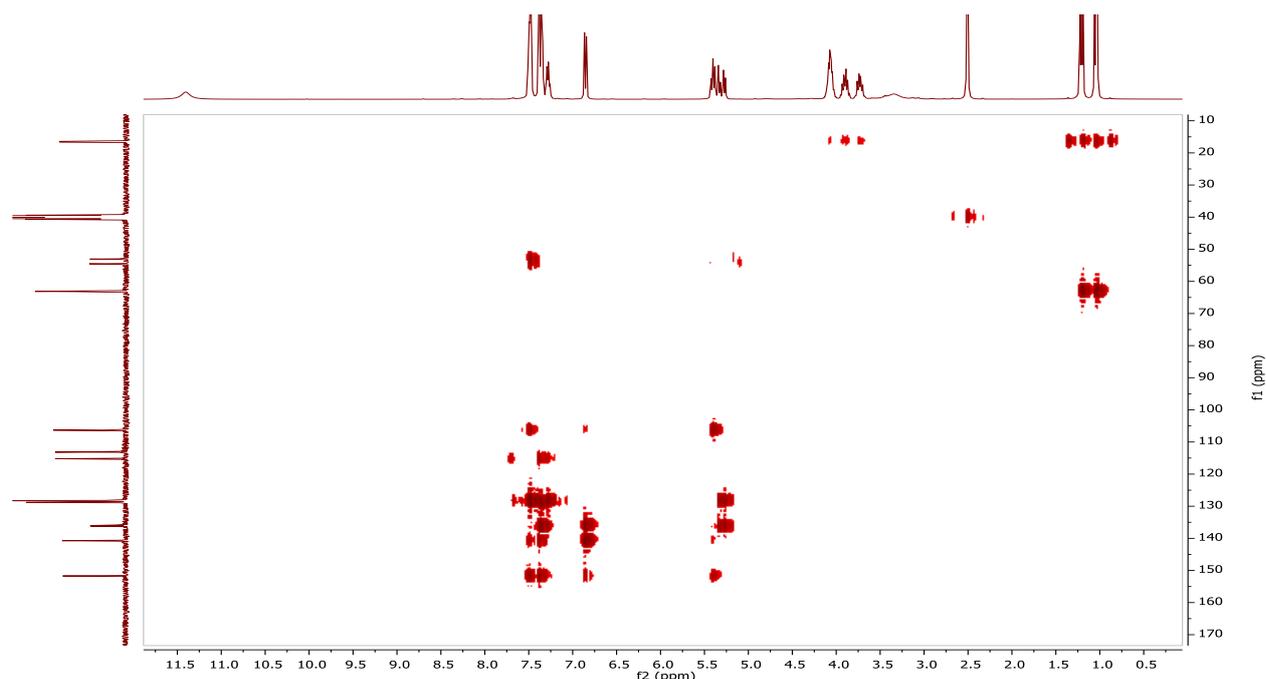


Figure III 18 : Spectre RMN de corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C à longue distance HMBC du composé 5-HNAP, avec les corrélations les plus significatives observées

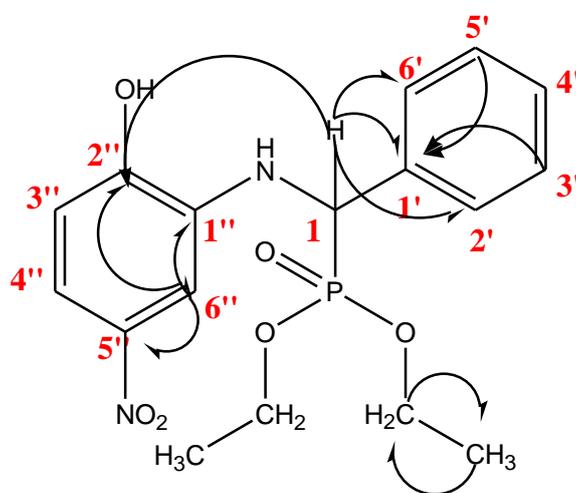


Figure III 19: Principales corrélations HMBC du composé 5-HNAP

- **Spectre RMN ^{31}P caractéristique de 5-HNAP**

Le spectre RMN ^{31}P correspondant aux déplacements chimiques de la molécule 5-HNAP est enregistré à l'aide d'un spectromètre ^{31}P -NMR (161.9 MHz, DMSO- d_6), et représenté par la figure III 20. Ce spectre révèle un seul singulet à $\delta = 22.45$ ppm confirmant ainsi la présence d'un atome de phosphore dans la molécule 5-HNAP, ce qui correspond à la structure proposée.

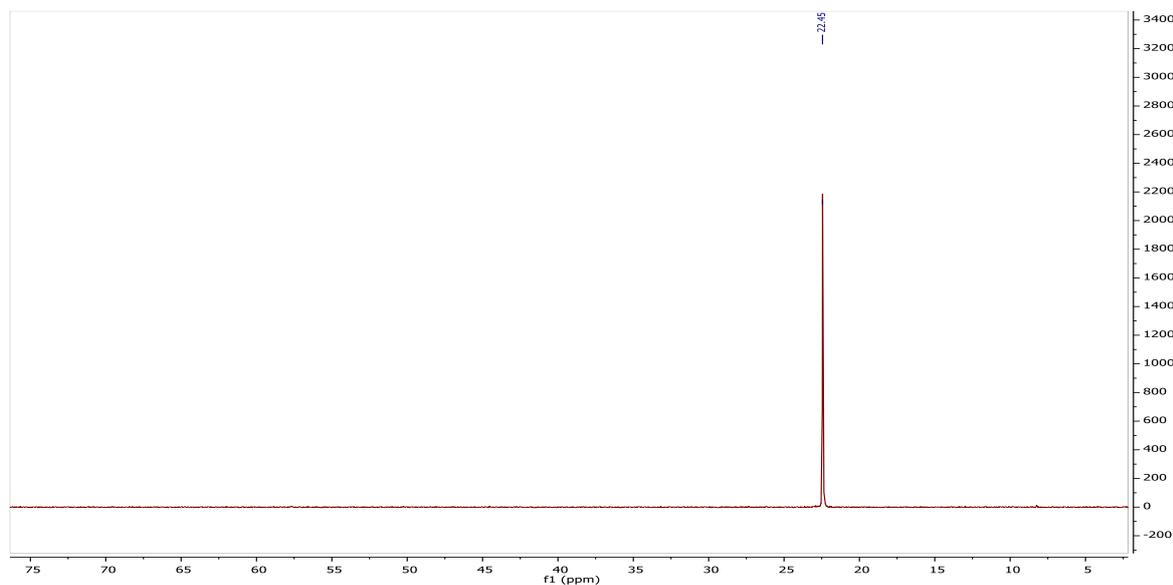


Figure III 20: *Spectre RMN³¹P caractéristique de la molécule 5-HNAP*

III.3.2.3 Analyse RMN de la molécule 4-HNAP

- *Spectre RMN ¹H caractéristique de la molécule 4-HNAP*

Le spectre RMN ^1H correspondant aux déplacements chimiques de la molécule 4-HNAP est représenté par la figure III 20, il révèle les déplacements chimiques suivants :

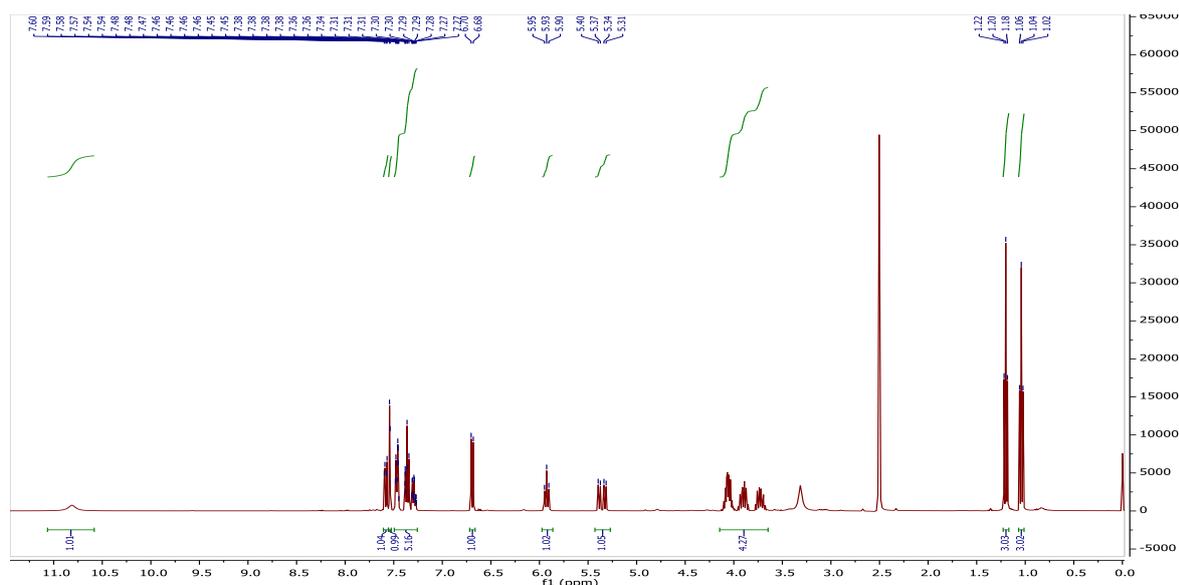


Figure III 20 : Spectre RMN ^1H caractéristique de la molécule 4-HNAP

^1H NMR (400.13 MHz, DMSO- d_6), δ : 1.04 et 1.20 (2 t, $J = 7.0$ Hz, 6 H, P-O- CH_2 - CH_3), 3.35 (s, 1H, 1-NH), 3.67– 4.12 (m, 4 H, P-O- CH_2 - CH_3), 5.35 (m, $J = 9.0, 23.7$ Hz, 1H, CH -1), 6.69 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, CH -6''), 7.26-7.32 (m, 1 H, CH -4'), 7.33–7.39 (m, 2 H, CH -2' et CH -6'), 7.44–7.50 (m, 2 H, CH -3' et CH -5'), 7.54 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, CH -3''), 7.58 (m, $J=2.6, 8.9$ Hz, 1 H, CH -5''), 10.81 (s, 1 H, 2''-OH) ppm.

Les déplacements chimiques observés d'après l'analyse de la molécule 4-HMAP par RMN ^1H permettent de proposer la structure présentée par la figure III 21.

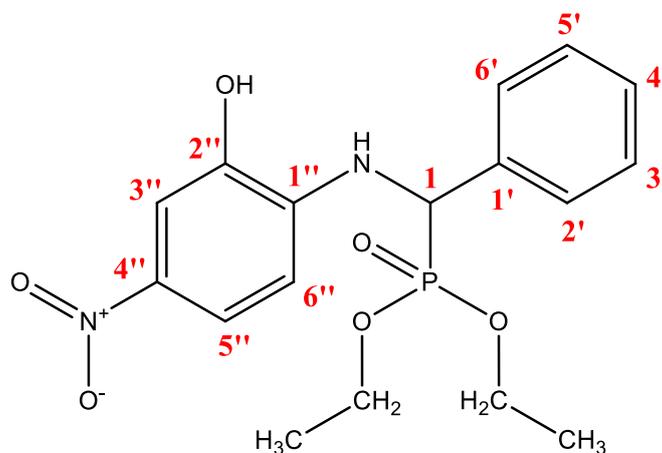


Figure III 21: Structure proposée pour la molécule 4- HNAP d'après l'RMN

- **Spectre RMN ^{13}C caractéristiques de 4-HNAP**

Le spectre RMN ^{13}C correspondant aux déplacements chimiques de la molécule 4-HNAP est enregistré à l'aide du l'appareil (^{13}C NMR (100.75 MHz, DMSO-d₆) et représenter par la figure III 22, ce spectre révèle les déplacements chimiques suivants :

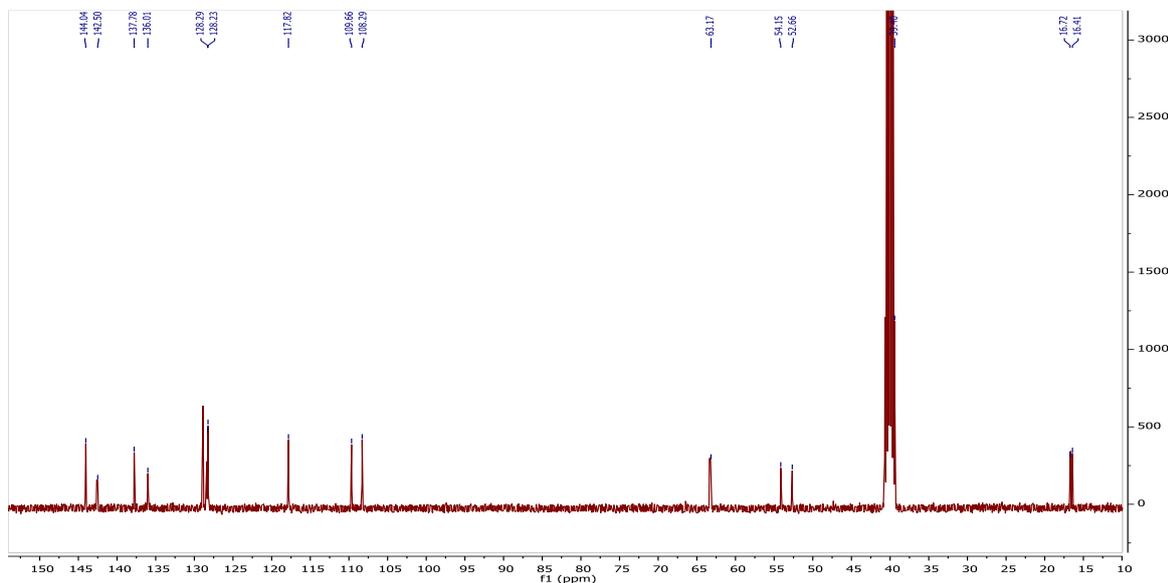


Figure III 22: Spectre RMN ^{13}C caractéristique de la molécule 4-HNAP

RMN ^{13}C (^{13}C NMR (100.75 MHz, DMSO-d₆)), δ : 16.4 et 16.7, 2X (P-O-C-CH3), 54.1 (C-1), 63.2 et 63.4, 2X(P-O-CH₂- CH₃), 108.3 (C-3''), 109.7 (C-6''), 117.8 (C4'') 128.2 (C-2' et C-6'), 128.4 (C-4'), 128.9 (C-3' et C-5'), 136.0 (C- 1'), 137.8 (C-5''), 142.8 (C-1''), 144.0 (C-2'') ppm.

Les résonances du carbone aromatique et aliphatique protonnés, ont été décrites dans le spectres RMN ^{13}C à l'aide des corrélations 2D HSQC (figure III 23) ces déplacements confirment la structure proposée dans la figure III 21.

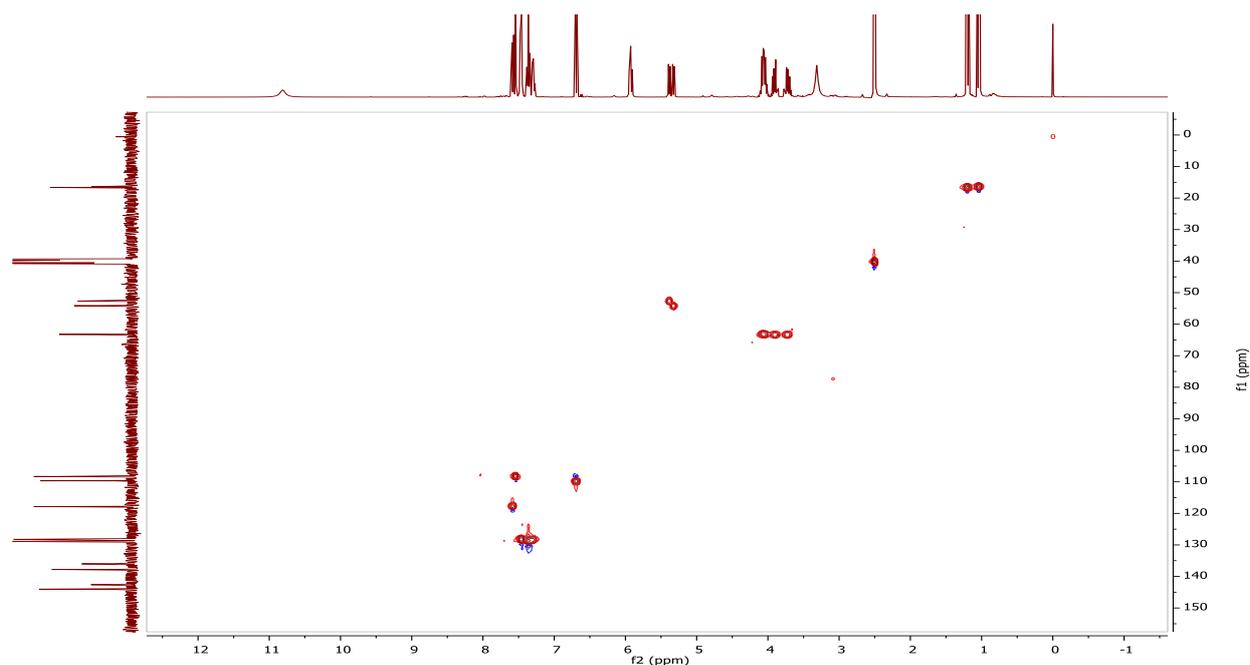


Figure III 23 : Spectre RMN de corrélation hétéronucléaire à courte distance HSQC du composé 4-HNAP, avec les connectivités ^1H - ^{13}C observées

- **Spectre RMN de corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C HMBC de 4-HNAP**

Les principales corrélations HMBC observées dans les spectres du composé 4-HNAP (figure III 24) sont présentées par la figure III 25.

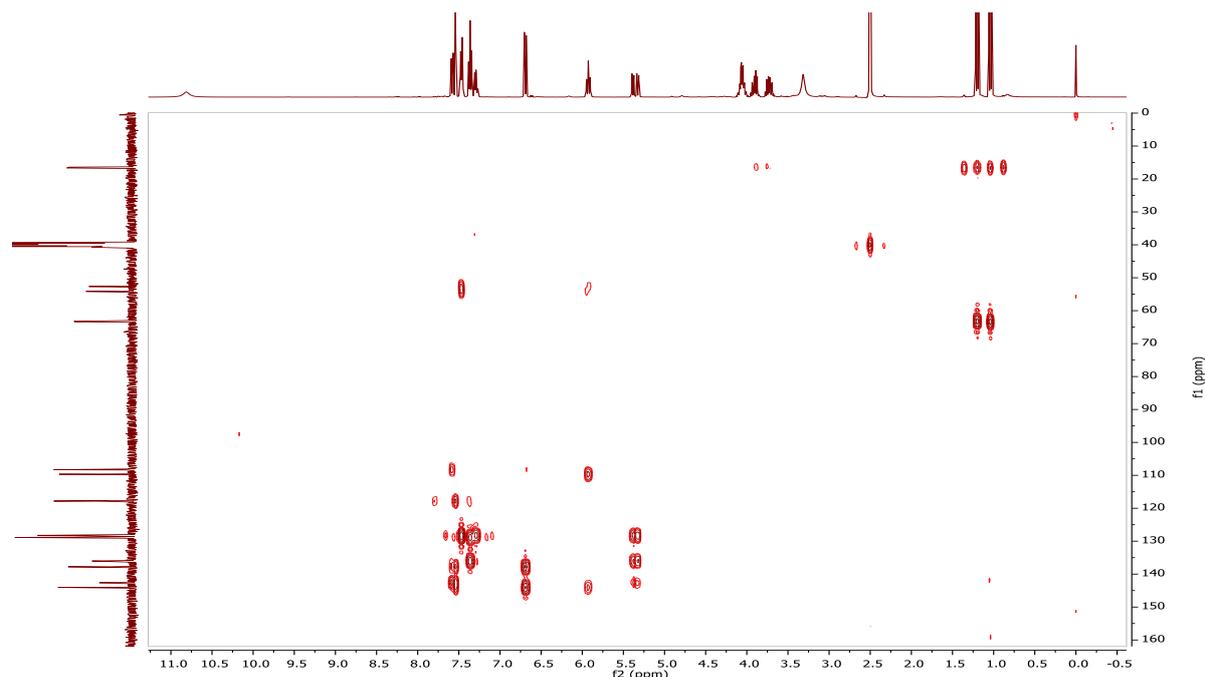


Figure III 24 : Spectre RMN de corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C à longue distance HMBC du composé 4-HNAP, avec les corrélations les plus significatives observées

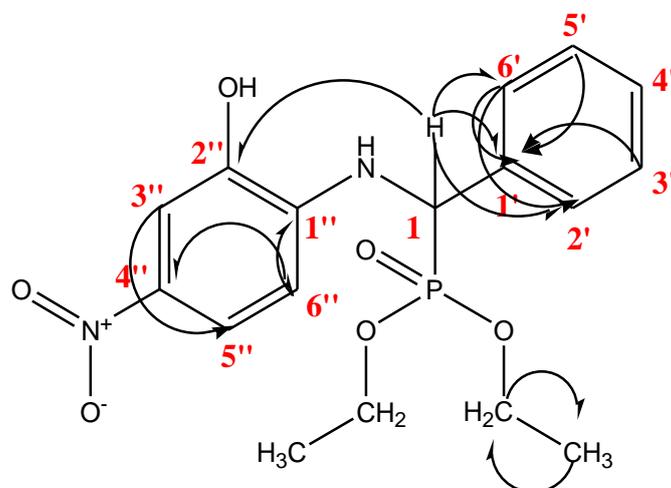


Figure III 25: Principales corrélations HMBC du composé 4-HNAP

- **Spectre RMN ^{31}P caractéristique de 4-HNAP**

Le spectre RMN ^{31}P correspondant aux déplacements chimiques de la molécule 4-HNAP est enregistré à l'aide d'un spectromètre ^{31}P -NMR (161.9 MHz, DMSO- d_6), et représenté par la figure III 26. On constate que ce spectre révèle un seul singulet à $\delta = 21,87$ ppm confirmant ainsi la présence d'un atome de phosphore dans la molécule 4-HNAP, ce qui correspond à la structure proposée.

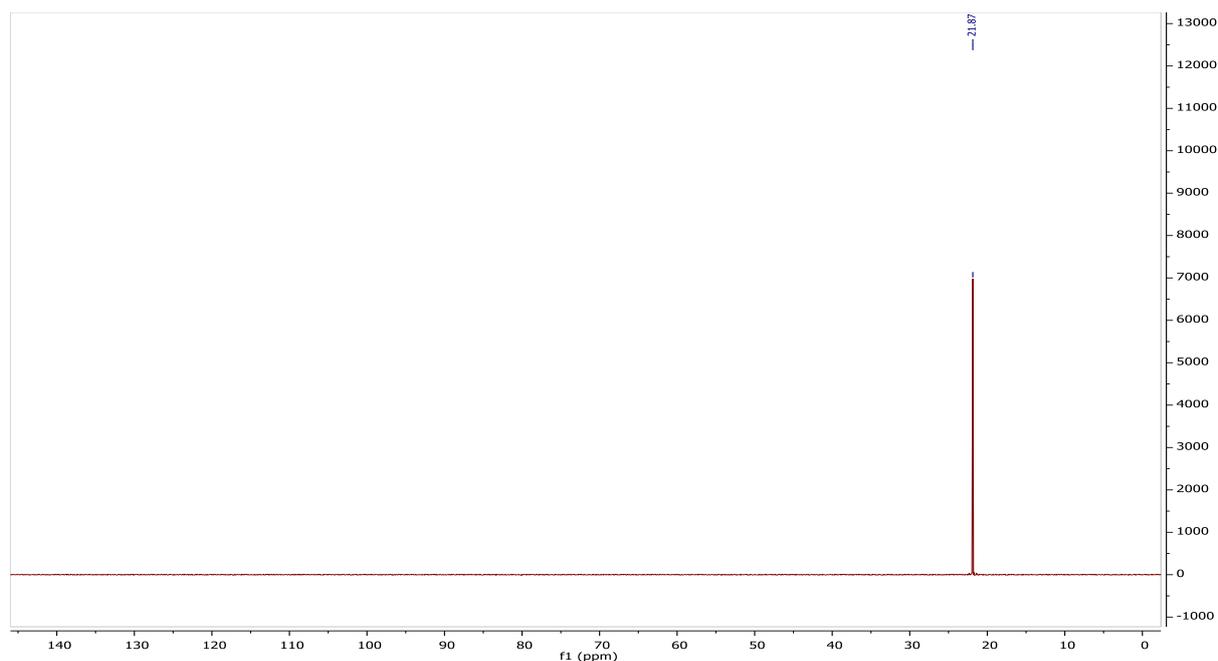


Figure III 26: Spectre RMN³¹P caractéristique de la molécule 4-HNAP

L'analyse par la spectroscopie RMN permet de conclure que les nouvelles molécules esters d'acide α -aminophosphoniques synthétisées ont été entièrement caractérisées par la spectroscopie RMN 1D (¹H, ¹³C et ³¹P) et l'RMN 2D. La RMN ¹H a montré la présence des groupes ethoxy (-OCH₂CH₃) dans les trois molécules synthétisées, sous forme de deux triplets vers (δ H = 1,03 et 1,20 ppm, 3H chacun, J = 7.0 Hz) et multiplet dans la région δ H = 3.66-4.15 ppm (4H), le proton NH apparaissant comme singulet vers (δ) \approx 3.35.

Le spectre RMN à 2D HSQC (Heteronuclear Single-Quantum correlation) permet l'identification des protons attachés à chaque carbone. Les carbones quaternaires ne se coordonnent pas avec les protons, de même pour les protons portés par un hétéroatome HX (X= N, O, P, ...), qui ne donnent pas de signaux. Les résonances du carbone aromatique et aliphatique protonnés, ont été décrites dans les spectres RMN ¹³C à l'aide des corrélations 2D HSQC. Dans les molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP à titre d'exemple, C-1 à δ C =54.3 et C-4' à 128,3 ppm, C-1 à δ C =54,5 et C-4' à 128,3 ppm et C-1 à δ C =54,1 et C-4' à 128,4 ppm respectivement.

Le spectre RMN à 2D HMBC donne les corrélations ¹H-¹³C à longue distance. Il permet l'attribution des atomes de carbone non protonnés et confirme l'attribution des protons ¹H-¹³C établi par la méthode spectroscopique HSQC. Tous les carbones quaternaires ont été

correctement assignés en utilisant la corrélation des pics croisés HMBC 2D, le proton intéressant H-1 ($\delta\text{H} = 5,04$ ppm) de 5-HMAP, ($\delta\text{H} = 5,30$ ppm) de 5-HNAP et ($\delta\text{H} = 5,35$ ppm) de 4-HNAP qui montrent des corrélations 2J et 4J évidentes avec les carbones quaternaires C-1' ($\delta\text{C} = 137,3$ ppm) et C-2'' ($\delta\text{C} = 142,6$ ppm), C-1' ($\delta\text{C} = 135,9$ ppm) et C-2'' ($\delta\text{C} = 151,7$ ppm) et C-1' ($\delta\text{C} = 136,0$ ppm) et C-2'' ($\delta\text{C} = 144,0$ ppm) respectivement. Ce qui concorde avec la structure de nos composés.

III.3.3 Résolution structurale par diffraction des rayons X sur monocristal

III.3.3.1 Enregistrement des intensités :

La collecte des données cristallographiques a été réalisée à température ambiante (293K) pour les composés **5-HMAP** et **5-HNAP** sur un diffractomètre à quatre cercles Bruker APPEX II [32], équipé d'un détecteur bidimensionnel CCD sur monocristal, en utilisant la radiation $K\alpha$ du Mo.

III.3.3.2 Résolution et affinement de la structure

L'utilisation de la chaîne de programme disponible sur l'interface WinGX [33] a permis la résolution et l'affinement de chaque structure. Le modèle structural a été établi par les méthodes directes au moyen du programme SIR92 [33] L'affinement des atomes par la méthode des moindres carrés à l'aide du programme SHELXL97 [34] a été effectué en définissant les facteurs d'agitation thermique comme anisotropes, contrairement aux atomes d'hydrogène dont les facteurs d'agitation thermique ont été fixés comme isotropes. Les atomes d'hydrogène appartenant aux groupements amine, hydroxy, aux cycles aromatiques et groupement éthyle ont été placés par calcul géométrique avec des distances N-H = 0,85 Å, O-H = 0,82 Å et C-H = 0,93 Å, 0,96 Å, 0,97 Å et 0,98 Å respectivement pour les atomes hydrogènes des cycles aromatiques, CH₃, CH₂ et CH tel que $U_{iso}(H) = xU_{eq}(C, N, O)$, ou $x=1.5$ pour l'atome H du groupement hydroxy et $x=1.2$ pour les autres atomes H. L'affinement des atomes d'hydrogène de la molécule d'eau a été effectué en mode rigide après leur localisation sur des cartes de Fourier différence. Les données cristallographiques ainsi que les conditions d'enregistrement et d'affinement sont reportées dans le tableau III 9. Les coordonnées atomiques, les facteurs d'agitation thermique isotropes et anisotropes, les paramètres géométriques expérimentaux (longueur de liaisons et mesures d'angle) comparés par rapport aux valeurs théoriques calculées en utilisant (DFT / B3LYP avec la base 6-31G (d, p)) sont consignés dans les annexes 1 et 2 pour les dérivés 5-HMAP et 5-HNAP,

respectivement. Alors que, l'annexe 3 regroupe seulement les paramètres géométriques calculées de 4-HNAP.

Tableau III 9: Données cristallographiques, Conditions d'enregistrement et d'affinement des molécules 5-H MAP (I) et 5-HNAP (II).

Composé	5-HMAP	5-HNAP
Formule	C ₁₈ H ₂₄ NO ₄ P	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O ₆ P
Mr	349.35	380.33
Température/K	296	296
Système cristallin	Triclinique	Monoclinique
Groupe d'espace, N	P-1, 2	P2 ₁ /n, 14
a/Å	9.1055(4)	8.0797(5)
b/Å	10.4616(4)	15.6659(9)
c/Å	10.6677(4)	15.0026(9)
α/°	98.196(2)	90
β/°	105.462(2)	97.211(1)
γ/°	107.129(2)	90
V/Å ³	908.60(6)	1883.9(2)
Z	2	4
D _c (g cm Å ⁻³)	1.277	1.341
Réflexions mesurées, indépendantes et observées [I > 2σ(I)]	15460/4199/3146	63362/9133/7786
R _{int}	0.052	0.020
Data/restraints/paramètres	4199/0/217	9133/0/235
R ₁ /wR ₂ [I > 2σ(I)]	0.052/0.160	0.041/0.126
Goodness-of-fit on F ²	1.05	1.04
Δρ _{max} , Δρ _{min} (e Å ⁻³)	0.40/-0.31	0.67/-0.48

III.3.3.3 Etude structurale et Analyse des surfaces Hirshfeld

III.3.3.3.1 Description structurale du composé 5-HMAP

Le composé 5-HMAP cristallise dans le groupe d'espace centrosymétrique $P-1$ du système triclinique. L'unité asymétrique du composé comprend une entité symétriquement indépendante de 5-HMAP (Figure III 27).

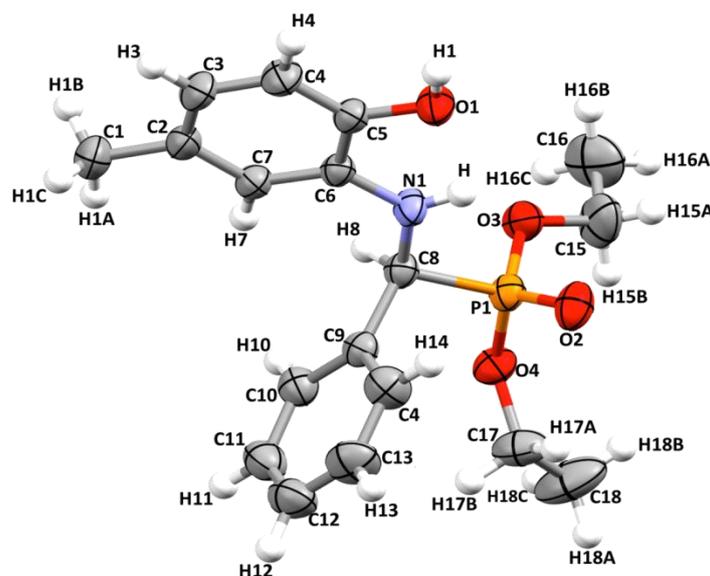


Figure III 27 : Ortep de l'unité asymétrique du composé [(2-Hydroxy-5-méthyl-phenylamino)-diphényl-méthyl]-phosphonic acid diéthyl ester

L'empilement cristallin est formé par des couches de molécule parallèles 5-HMAP au plan (bc). Chaque couche est formée par des doubles chaînes de molécule 5-HMAP qui se déploient le long de l'axe a, à $c=0$ et $\frac{1}{2}$ (Figure III 28).

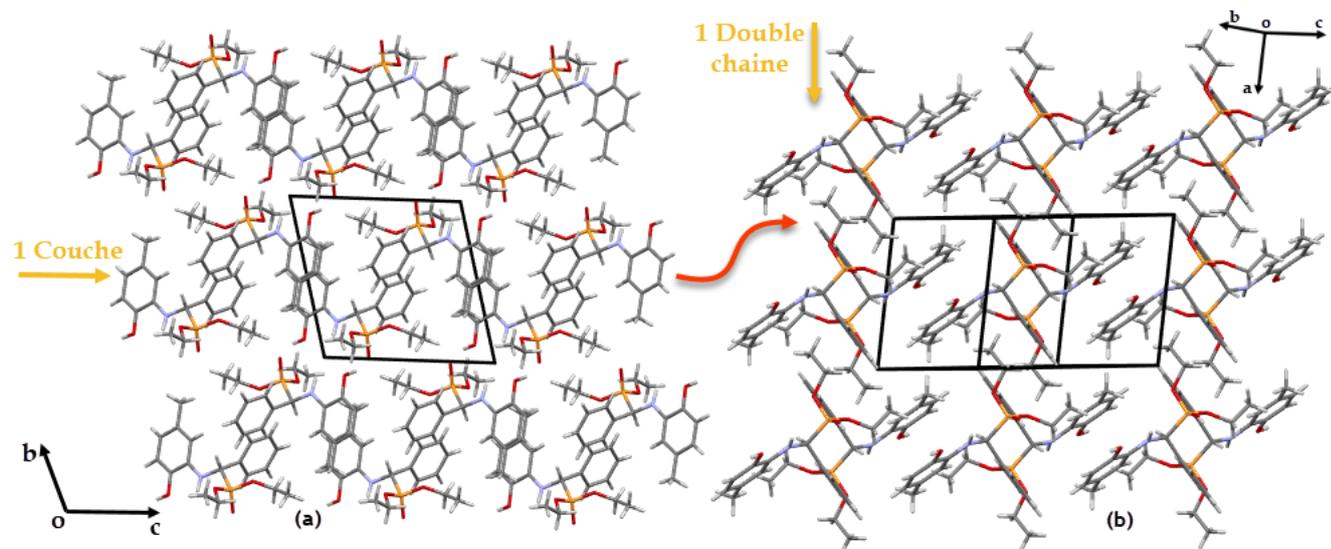


Figure III 28 : (a)Empilement cristallin et (b) Doubles chaines de la molécule 5-HMAP

La cohésion au sein de l'édifice cristallin de la structure est assuré par deux liaisons hydrogènes fortes et faibles O-H...O et C-H...O (Tableau III 10) établie respectivement entre les atomes d'oxygène O1 et O2ⁱ des groupements hydroxyle et phosphonate, et des atomes C18 et O1ⁱⁱ du groupement hydroxyle, [Codes de symétrie : (i) $-x+1,-y,-z$; (ii) $x, y, z+1$]. De ce fait les interactions entre les molécules de 5-HMAP forment des chaines dimériques avec un motif cyclique R₂² (16) et R₄⁴ (16) qui se déploient le long de l'axe c (Figure III 29).

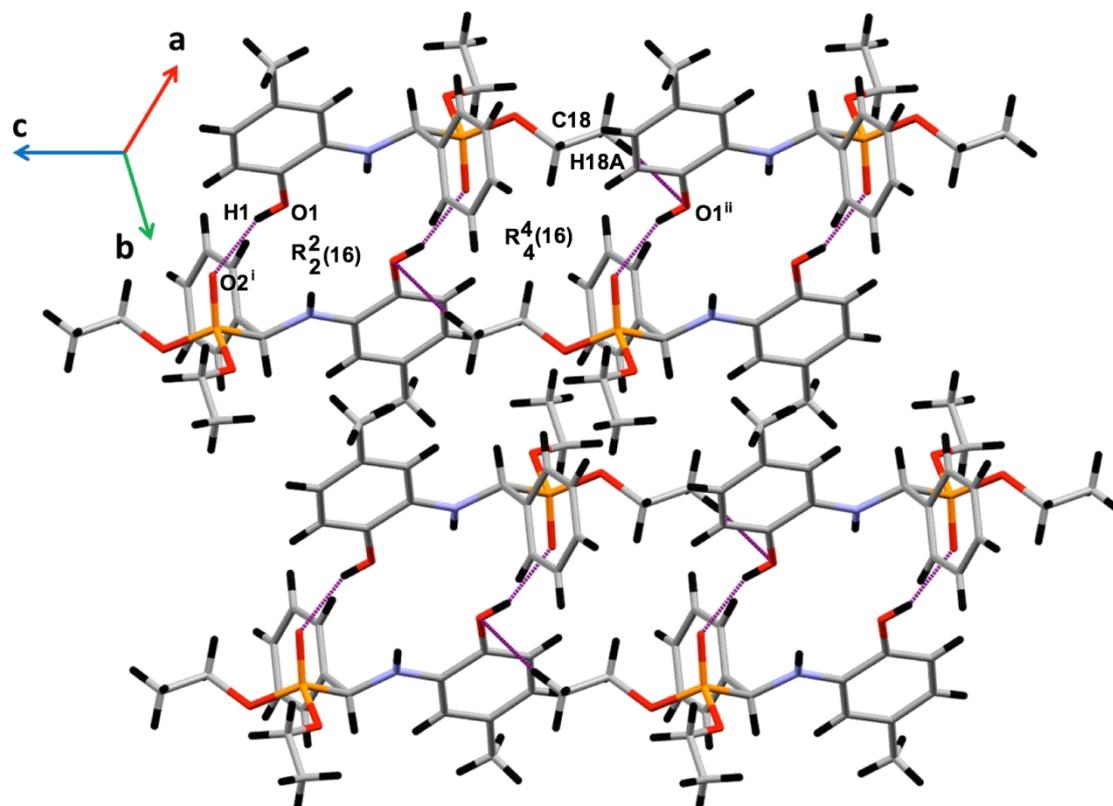


Figure III 29 : chaînes dimériques de liaisons hydrogène $O-H\cdots O$ et $C-H\cdots O$ de la molécule 5-HMAP [Code de symétries: (i) $-x+1, -y, -z$; (ii) $x, y, z+1$]

Tableau III 10 : Liaisons hydrogènes du composé 5-HMAP (Å, °)

D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A	N°
O1-H1...O2 ⁱ	0.8200	1.9000	2.6713(1)	156.00	1
C18-H18A...O1 ⁱⁱ	0.9600	2.6340	3.5360(3)	156.54	2

Codes de symétries : (i) $-x+1, -y, -z$; (ii) $x, y, z+1$

III.3.3.3.2 Description structurale du composé 5-HNAP

L'unité asymétrique du composé (2) est formée par une molécule de 5-HNAP symétriquement indépendante. Le composé 5-HNAP cristallise dans le groupe d'espace $P2_1/n$ du système monoclinique.

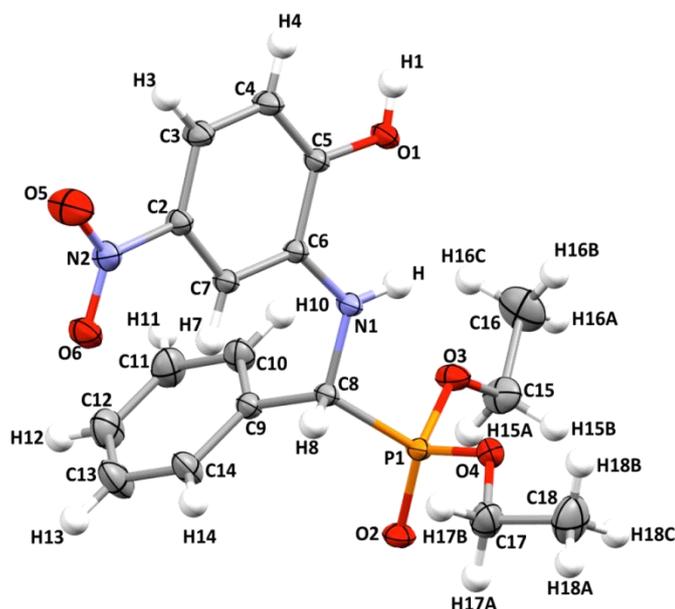


Figure III 30 : Ortep de l'unité asymétrique du composé *[(2-Hydroxy-5-nitro-phenylamino)-(phenyl)-methyl]-phosphonic acid diethyl ester*

L'empilement cristallin est formé par une succession de couches parallèles à la rangée (101) (**Figure III 31**).

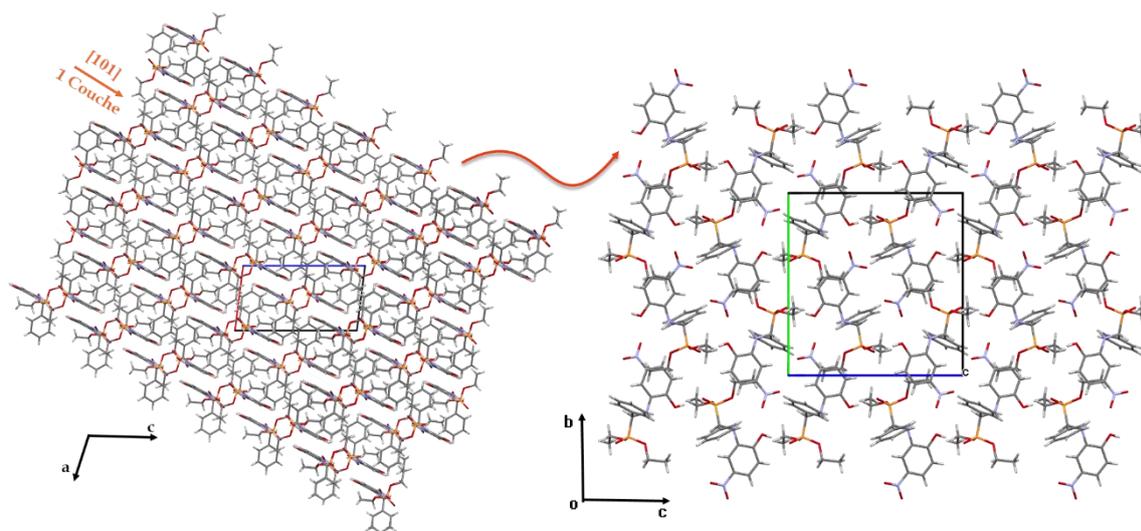


Figure III 31: Empilement cristallin de la structure du composé 5-HNAP

La jonction entre les molécules de 5-HNAP appartenant à la même couche est assurée par deux liaisons hydrogène forte et faible respectivement de type $O-H \cdots O$ et $C-H \cdots O$ générées entre les atomes d'oxygène $O1$ et $O2^i$ des groupements hydroxyle et phosphonate, et des atomes $C8$ et $O6$ groupement nitro, ces liaisons forment des cycles de motifs $R^2_2(16)$ $R^6_6(40)$. La tridimensionnalité de la structure est assurée par la liaison hydrogène de type $C-H \cdots \pi$, établie entre l'atome $C16$ et le centre aromatique $Cg2$ du cycle phényle $C9-C14$ avec $(H16A \cdots Cg2^{iii}) = 2.76 \text{ \AA}$ et $C16-H16A \cdots Cg2^{iii} = 149^\circ$ [code de symétrie : (iii) $1/2-x, 1/2+y, 3/2-z$].

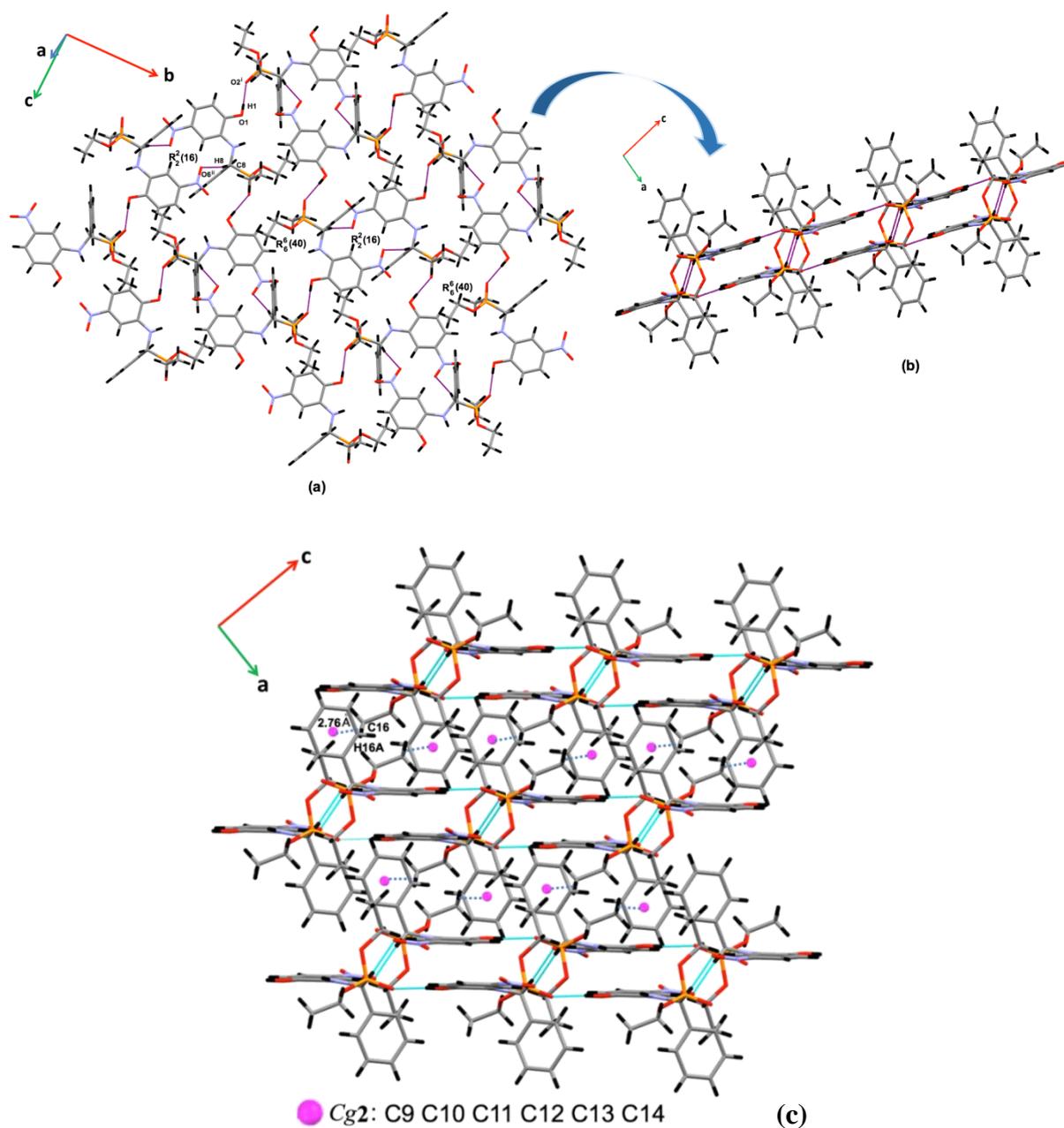


Figure III 32 : (a) Liaisons hydrogène et (b) réseau a 2D de la structure du composé 5-NAPH, (c) Réseau tridimensionnel et liaison hydrogène de type C-H... π .

Tableau III 11 : Liaisons hydrogène (\AA , $^\circ$) de NAPH, Cg2 est le centroïde du cycle C9–C14 rings

D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A	N $^\circ$
O1-H1...O2 ⁱ	0.8200	1.8200	2.6436(2)	177.00	1
C8-H8...O6 ⁱⁱ	0.9800	2.5700	3.5345(2)	170.00	2
C16-H16A...Cg2 ⁱⁱⁱ	0.9600	2.7600	3.6188(15)	149.00	2

Code de symétries : (i) $x+1/2, -y+3/2, z+1/2$; (ii) $-x+1, -y+1, -z+1$; (iii) $-x+1/2, y+1/2, -z+3/2$

III.3.3.3 Analyse de la structure cristalline

L'étude conformationnelle des deux composés 5-HMAP et 5-HNAP, à montrer que pour les deux composés le benzène et les groupements 2-hydroxy-5-méthyl-phényle et 2-hydroxy-5-nitro-phényle sont presque planaires avec une déviation par rapport au plan moyen de 0,0051/0,0031 et 0,0046/0,0033 \AA respectivement.

L'angle dièdre entre les plans contenant le benzène et les groupes 2-hydroxy-5-méthyl-phényle/2-hydroxy-5-nitro-phényle est de 86,15 (6) et 89,26 (3) $^\circ$ respectivement, **Figure III 33**.

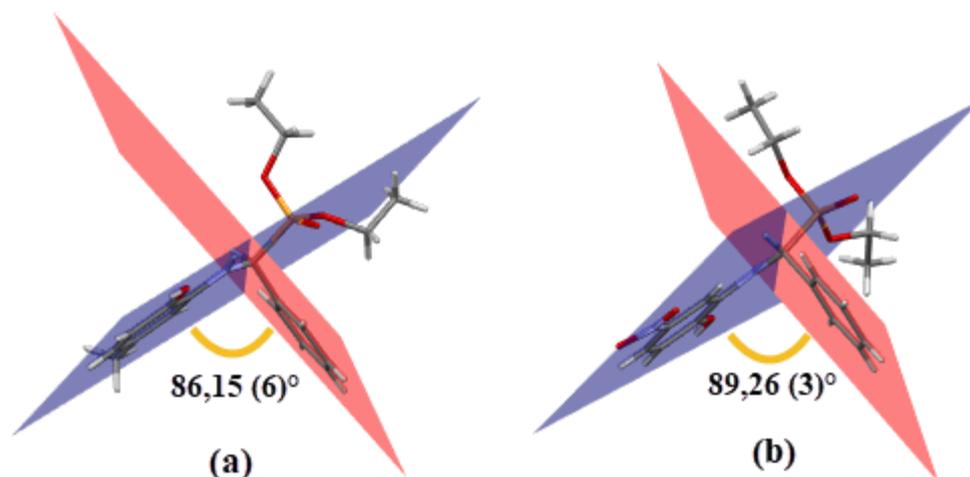


Figure III 33: Angle dièdre des molécules (a) 5-HMAP et (b) 5-HNAP entre les cycles benzène (bleu), (a) 2-hydroxy-5-méthyl-phényle et (b) 2-hydroxy-5-nitro-phényle (rouge).

Les distances des liaisons P1-O et P1-C8 (tableau III 12) sont en bon accord avec celles des structures apparentées [35].

La longueur de la liaison C6-N1 [1,397(2) \AA (5-HMAP), 1,3818(9) (5-HNAP)] est intermédiaire entre les distances des liaisons simples C-N et doubles C=N, ce qui montre

l'influence de la délocalisation des électrons du cycle benzénique. Les angles de liaison O2-P1-O3, O2-P1-O4 et O2-P1-C8 sont plus grands que ceux d'O4-P1-O3, O4-P1-C8 et O3-P1-C8, ce qui indique que l'atome de phosphore adopte une configuration tétraédrique légèrement déformée, qui peut s'expliquer par les effets stériques des groupes ethoxy adjacents.

Tableau III 12 : Longueurs de liaison (Å) et angles (°) sélectionnés des molécules 5-HMAP et 5-HNAP

<i>Molecule</i>	5-HMAP		5-HNAP		
	<i>liaisons/ angles</i>	<i>Exp.</i>	<i>Theo.</i>	<i>liaisons/ angle</i>	<i>Exp.</i>
P1-O2	1.4650(16)	1.4975	P1-O2	1.4748(6)	1.4948
P1-O3	1.5552(16)	1.6118	P1-O3	1.5646(6)	1.6051
P1-O4	1.5617(14)	1.6162	P1-O4	1.5709(7)	1.6161
P1-C8	1.8167(18)	1.8599	P1-C8	1.8160(7)	1.8621
O4-C17	1.449(3)	1.4569	O4-C17	1.4627(12)	1.4568
O3-C15	1.464(3)	1.4552	O3-C15	1.4501(11)	1.4551
N1-C8	1.444(2)	1.4388	O1-C5	1.3468(9)	1.3565
C6-C7	1.385(3)	1.3974	N1-C8	1.4505(9)	1.463
C6-C5	1.402(3)	1.4027	N2-C2	1.4548(10)	1.468
C8-C9	1.518(3)	1.5123	C6-C7	1.3881(10)	1.3909
C9-C14	1.381(3)	1.3974	C9-C14	1.3898(11)	1.3952
O2-P1-O3	116.23(10)	116.1009	O2-P1-O3	115.99(4)	118.3324
O2-P1-O4	113.59(9)	114.2882	O2-P1-O4	113.97(4)	113.9999
O3-P1-O4	102.65(8)	103.6653	O3-P1-O4	102.80(4)	102.0805
O2-P1-C8	113.70(9)	114.0632	O2-P1-C8	113.61(4)	111.2052
O3-P1-C8	102.97(8)	100.5683	O3-P1-C8	101.34(3)	99.8784
O4-P1-C8	106.42(9)	106.6628	O4-P1-C8	107.81(4)	110.1504
C17-O4-P1	124.31(15)	122.7715	C17-O4-P1	119.95(6)	121.5998
C15-O3-P1	119.61(17)	120.7668	C6-N1-C8	121.25(6)	118.824
C6-N1-C8	120.94(15)	118.8418	C7-C6-N1	123.99(6)	119.2867
N1-C8-P1	108.79(12)	108.117	C7-C6-C5	118.76(6)	119.3003
C9-C8-P1	108.20(12)	110.6992	N1-C6-C5	117.21(6)	118.6321
C14-C9-C10	118.2(2)	119.003	N1-C8-C9	115.21(6)	113.7561

III.3.3.3.4 Analyse des Surfaces Hirshfeld (HS) des composés

L'analyse de surface de Hirshfeld (HS) définie comme la surface limite de densité électronique entre les molécules dans un cristal, est une méthode très utile pour analyser et visualiser les contacts intermoléculaires. L'analyse des surfaces hirshfeld est complémentaire à l'étude structurale par diffraction des RX, elle est devenue un outil indispensable pour l'analyser et étudier les aspects détaillés de l'empilement moléculaire ; par exemple : le polymorphisme et d'autres aspects de l'arrangement supramoléculaire [36]. Les surfaces moléculaires de Hirshfeld [36–41] dans la structure cristalline sont générées en se basant sur la distribution des électrons calculée comme la somme des densités électroniques des atomes sphériques [36–41]. Pour une structure cristalline donnée et un ensemble de densités électroniques atomiques sphériques, la surface de Hirshfeld est unique [36], cela est dû à son caractère complémentaire à la visualisation traditionnelle de la structure, où les interactions ne sont pas examinées isolément mais plutôt dans le contexte de l'ensemble du système. La cartographie des couleurs des fonctions décrivant les propriétés spécifiques de la surface Hirshfeld permet une reconnaissance intuitive et une analyse quantitative des interactions entre les molécules [36–41].

La distance de contact normalisée (d_{norm}) est définie par les distances internes d_i et externes d_e , et les rayons de van der Waals (r_i^{vdw}) des atomes, tels qu'ils sont donnés par l'équation [III.2].

$$d_{norm} = \frac{d_i - r_i^{vdw}}{r_i^{vdw}} + \frac{d_e - r_e^{vdw}}{r_e^{vdw}} \quad \text{[III.3]}$$

Permet d'identifier les régions d'importance particulière pour les interactions intermoléculaires [36]. La combinaison de d_e et d_i sous la forme d'un tracé d'empreintes digitales 2D [36] fournit un résumé des contacts intermoléculaires dans le cristal [36] où d_i et d_e représentent les distances du point sur le SH aux atomes les plus proches internes et externes à la surface, respectivement. Deux fonctions à savoir Shape-index et Curvedness sont utiliser pour une analyse plus approfondie des interactions ayant lieux à la surface de la molécule :

L'indice de forme « Shape-index » qui est une mesure qualitative de la forme et peut être sensible à des changements très subtils de la forme de la surface, en particulier dans les régions où la courbure totale est très faible. Un attribut important de l'indice de forme est que deux régions où l'indice de forme ne diffère que par un signe, représentent des paires

complémentaires de "tampon" et de "moule". Cela signifie que des cartes d'indice de forme sur la surface de Hirshfeld peuvent être utilisées pour identifier des creux (avec un indice de forme < 0) et des bosses (avec un indice de forme > 0) complémentaires [42–45].

La propriété « Curvedness » est fonction de la courbure quadratique moyenne de la surface. Les zones plates de la surface correspondent à de faibles valeurs de courbure, tandis que les zones de courbure nette correspondent à des valeurs élevées de courbure et ont généralement tendance à diviser la surface en plaques, indiquant des interactions entre les molécules voisines [42–45].

L'analyse de surface de Hirshfeld comprenant la surface d_{norm} , la courbure et l'indice de forme ainsi que les tracés d'empreintes digitales (FP) 2D ont été générées pour les composés 5-HMAP (1) et 5-HNAP (2) et réalisé à l'aide du programme CrystalExplorer 17 [46] afin de confirmer les interactions intermoléculaires citées ci-dessus et également de fournir des données quantitatives pour les contributions relatives aux surfaces de Hirshfeld. L'échelle des propriétés cartographiées sur la surface de Hirshfeld, et en particulier d_e , varie selon les types d'atomes et les interactions intermoléculaires présentes dans la structure. Dans la discussion suivante, la surface d_{norm} a été dépeinte sur une plage de couleur de (-0,6633 à 1,3285) pour le composé 5-HMAP (1) et (-0,7364 à 1,5776) pour le composé 5-HNAP (2) la courbure est toujours mappée sur les surfaces de Hirshfeld entre -0,4 (rouge) et +0,4 (bleu), et l'indice de forme est toujours mappé entre -1,0 (rouge) et +1,0 (bleu). L'indice de forme est très sensible aux changements très subtils de la forme de la surface ; les informations véhiculées par l'indice de forme sont en accord avec les tracés d'empreintes digitales 2D. La courbure est la mesure de « combien de forme », les zones plates de la surface correspondent à de faibles valeurs de courbure, tandis que les zones de courbure nette correspondent à des valeurs élevées de courbure et ont généralement tendance à diviser la surface en plaques, indiquant des interactions entre molécules voisines. Les structures cristallines ont été importées à partir de fichiers CIF [36–41].

Les surfaces Hirshfeld, la courbure, l'indice de forme et la norme sont indiqués dans la (figure III 34). Les valeurs de d_{norm} ont été cartographiées en utilisant un schéma de couleurs rouge-bleu-blanc comme suit : les régions rouges avec les valeurs négatives de d_{norm} représentent les contacts intermoléculaires plus courts que la somme des rayons de van der Waals ; les régions bleues avec des valeurs positives de d_{norm} représentent les contacts intermoléculaires plus longs que la somme des rayons de van der Waals ; les régions blanches

dénote la distance des contacts correspondant exactement à la séparation de van der Waals avec des valeurs d_{norm} de zéro [36–41]. Ainsi plus l'interaction est forte plus la tâche est intense. Les surfaces d_{norm} des composés 1 et 2 montrent deux points rouges d'intensité forte et faible indiquant respectivement des contacts étroits dus aux interactions O-H...O (forte) et CH...O (faible) ces interactions sont labellées 1 et 2 et correspondent aux liaisons hydrogène numérotées dans les tableaux III (11 et 10).

L'indice de forme « Shape-index » est très sensible aux changements très subtils dans la forme de la surface ; les informations véhiculées par l'indice de forme sont en accord avec les tracés d'empreintes digitales 2D. La courbure est la mesure de « combien de forme », les zones plates de la surface correspondent à de faibles valeurs de courbure, tandis que les zones de courbure nette correspondent à des valeurs élevées de courbure et ont généralement tendance à diviser la surface en plaques, indiquant des interactions entre molécules voisines [36–41].

Les graphes d'empreintes digitales 2D "Deux dimensions" « 2 Dimensional Fingerprints Plots 2D-FPs » des interactions des composés, et les surfaces HS en mode « Curvedness » et « Shape-index » sont illustrés à la (figure III 34). Les graphes d'empreinte 2D des deux composés (1) et (2) montrent un nuage distinct entre les deux extrémités pointues (labelle 1 de la figure III 34) correspondant à l'empreinte d'interactions H... H avec respectivement $d_e \approx d_i \approx 1,12\text{Å}$ pour le composé 1 et $d_e \approx d_i \approx 1,17\text{Å}$ pour le composé 2. Ce nuage se produit lorsque le contact le plus court est entre trois atomes, plutôt qu'un contact direct à deux atomes. L'absence de taches de couleurs verte-bleu vers $d_e \approx d_i \approx 1,8\text{Å}$ sur le graph 2D-FPs des deux composés indiquent l'absence d'interactions de type π - π , cette observation est d'autant vérifiée par l'absence de triangle bleu-rouge sur la surface moléculaire dépeinte en mode « shape-index » mais aussi dans le mode « curvedness » où les surfaces autour des cycles aromatiques sont bien délimitées.

Cependant contrairement au composé (1) la structure cristalline du composé (2) présente une interaction C-H... π qui peut être identifiée sur le tracé d'empreinte digitale 2D-FPs (étiquette 2 de la figure III 34) comme un motif distinct d'une paire d'ailes qui est un trait caractéristique de l'interaction C-H... π .

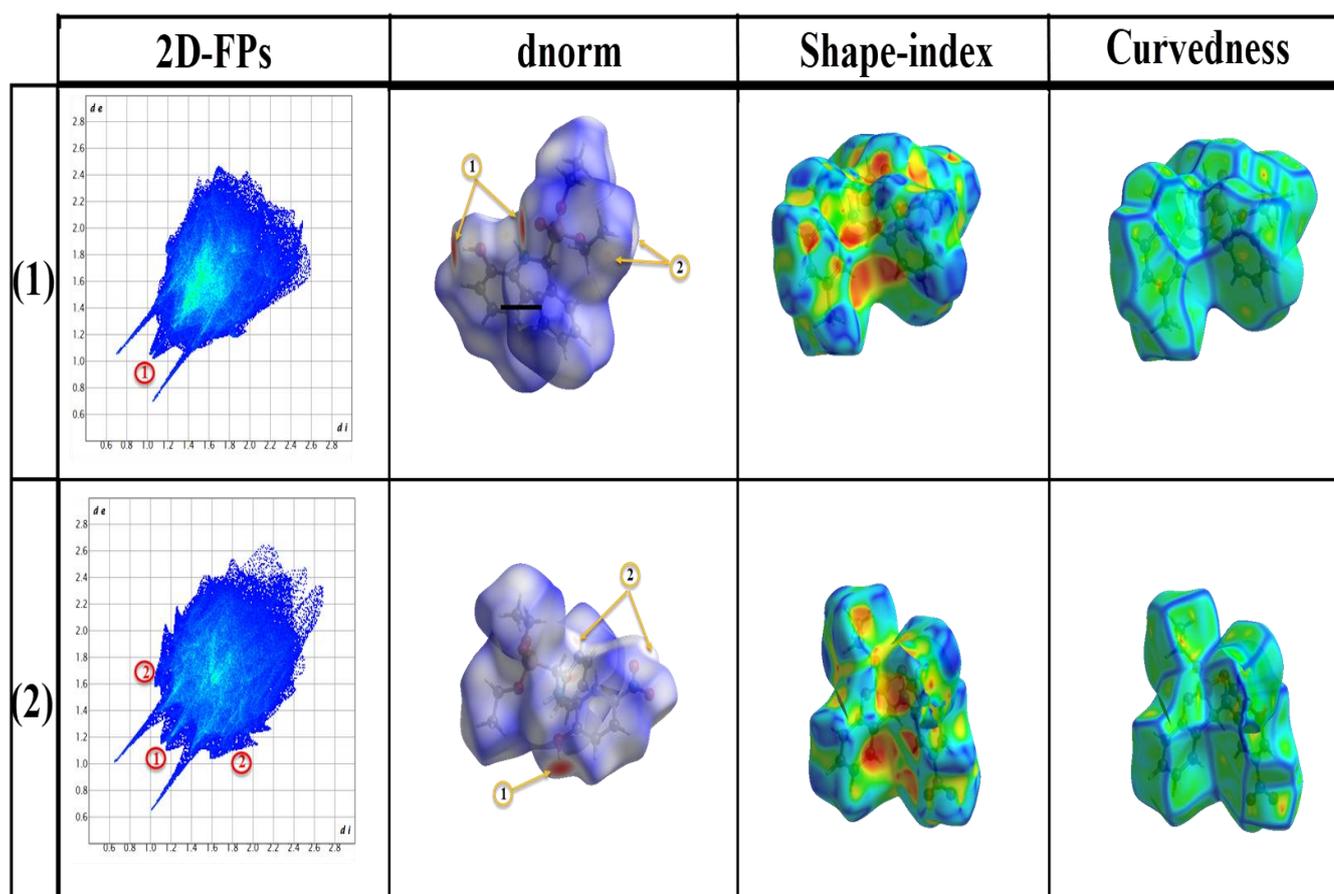


Figure III 34 : Surface Hirshfeld dépeinte en mode *dnorm*, *shape index* et *Curvedness*, et le graph de l'empreinte digitale 2D-FPs des composés 5-HMAP et 5-HNAP

Les graphes 2D-FPs peuvent être fractionnés, ainsi pour chaque type de contact correspond une empreinte avec leur contribution relative exprimé en pourcentage ce qui permet de déterminer le degrés d'importance de chaque interaction et donc de mener une analyse quantitative des interactions de la surface des composés étudiés. Les graphes 2D-FPs ainsi que la contribution relative des différentes interactions des composés (1) et (2) représenté sur (la figure III 35) indiquent clairement une prédominance d'interactions de type H...H pour les deux composés avec une contribution relative respectivement de 67.5% et 43.7%.

Les interactions de type O...H/H...O représente le deuxième type d'interactions ayant une contribution importante à la surface et présent avec une contribution relative de 15.9 et 31.5 % pour les composés (1) et (2). On retrouve ensuite les interactions de type C...H/H...C qui représente un taux de contribution à la surface totale de 14.2 et 21.1% respectivement pour le

composé (1) et (2). Les interactions de type N...H/H...N représente un taux de contribution totale à la surface de 0.7 et 2.9% respectivement pour les composés (1) et (2), ce faible taux de contribution en fait l'interaction la moins importante pour les deux composés.

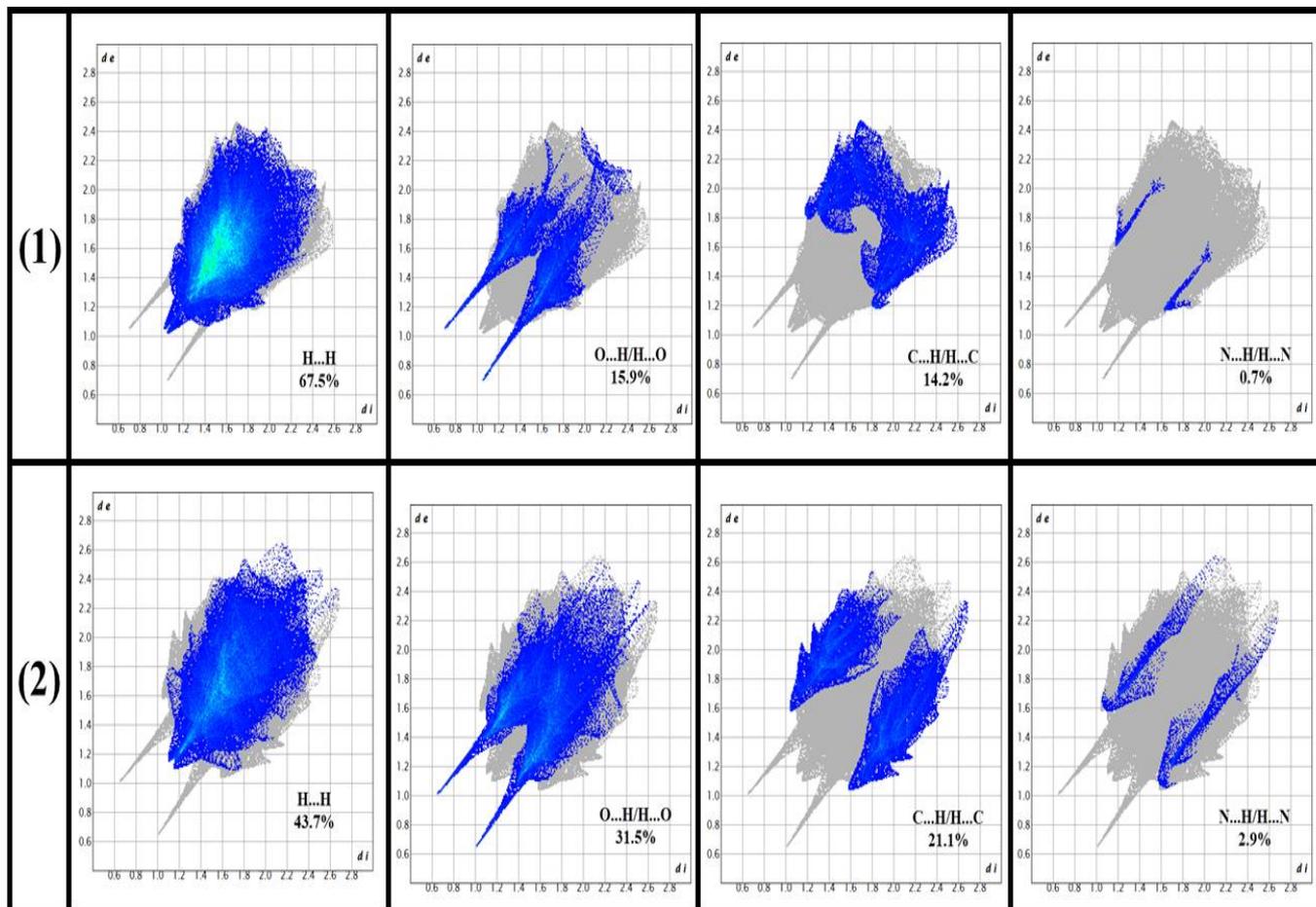


Figure III 35 : Empreinte Digital 2D-FPs des différents contacts de la surface et le taux de contribution de la surface totale des composés 5-HMAP (1) et 5-HNAP (2)

Références bibliographiques

- [1] P. Kafarski, B. Lejczak, Aminophosphonic Acids of Potential Medical Importance, CMCACA. 1 (2001) 301–312. <https://doi.org/10.2174/1568011013354543>.
- [2] S.A. Dake, Environmentally Friendly Approach: Synthesis and Biological Evaluation of α -Aminophosphonate Derivatives, in: Green Chemistry and Sustainable Technology, Apple Academic Press, 2020: pp. 95–136.
- [3] M.K.R. Kandula, M. Gundluru, B.R. Nemallapudi, S. Gundala, P. Kotha, G.V. Zyryanov, S. Chadive, S.R. Cirandur, Synthesis, antioxidant activity, and α -glucosidase enzyme inhibition of α -aminophosphonate derivatives bearing piperazine-1, 2, 3-triazole moiety, Journal of Heterocyclic Chemistry. 58 (2021) 172–181.
- [4] K.M.K. Reddy, S. Santhisudha, G. Mohan, K. Peddanna, C.A. Rao, C. Suresh Reddy, Nano Gd₂O₃ catalyzed synthesis and anti-oxidant activity of new α -aminophosphonates, Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. 191 (2016) 933–938.
- [5] A. Hellal, S. Chafaa, N. Chafai, L. Touafri, Synthesis, antibacterial screening and DFT studies of series of α -amino-phosphonates derivatives from aminophenols, Journal of Molecular Structure. 1134 (2017) 217–225.
- [6] M.H. Shaikh, D.D. Subhedar, F.A.K. Khan, J.N. Sangshetti, B.B. Shingate, [Et 3 NH][HSO 4]-catalyzed one-pot, solvent-free synthesis and biological evaluation of α -amino phosphonates, Research on Chemical Intermediates. 42 (2016) 5115–5131.
- [7] R.M.N. Kalla, J.-S. Choi, J.-W. Yoo, S.J. Byeon, M.S. Heo, I. Kim, Synthesis of 2-amino-3-cyano-4H-chromen-4-ylphosphonates and their anticancer properties, European Journal of Medicinal Chemistry. 76 (2014) 61–66.
- [8] P. Savignac, B. Iorga, Modern phosphonate chemistry, CRC press, 2003.
- [9] A. Vinu, P. Kalita, V.V. Balasubramanian, H. Oveisi, T. Selvan, A. Mano, M.A. Chari, B.S. Reddy, Mesoporous aluminosilicate nanocage-catalyzed three-component coupling reaction: an expedient synthesis of α -aminophosphonates, Tetrahedron Letters. 50 (2009) 7132–7136.
- [10] M.I. Kabachnik, T.Y. Medved, New synthesis of aminophosphonic acids, in: Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1952: pp. 689–692.
- [11] E.K. Fields, The synthesis of esters of substituted amino phosphonic acids 1a, Journal of the American Chemical Society. 74 (1952) 1528–1531.
- [12] H. Wang, Comprehensive Organic Name Reactions, Wiley, 2010.

- [13] G. Keglevich, E. Bálint, The Kabachnik–Fields reaction: Mechanism and synthetic use, *Molecules*. 17 (2012) 12821–12835.
- [14] R. Aissa, S. Guezane-Lakoud, L. Gali, M. Toffano, A. Ignaczak, M. Adamiak, M. Merabet-Khelassi, R. Guillot, L. Aribi-Zouiouche, New promising generation of phosphates α -aminophosphonates: Design, synthesis, in-vitro biological evaluation and computational study, *Journal of Molecular Structure*. 1247 (2022) 131336. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131336>.
- [15] H. Zandieh, J. Mokhtari, K. Larijani, Synthesis of α -Amino Phosphonates Catalyzed by Copper-Based Metal Organic Frameworks, *Journal of Organometallic Chemistry*. (2021) 122156.
- [16] T. Bailly, R. Burgada, Etude des réactions de Kabachnik-Fields et de Moedritzer-Irani. i reaction du trans diamino 1, 2-cyclohexane dl, Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. 101 (1995) 131–140.
- [17] P. Kafarski, M.G. Górniak, I. Andrasiak, Kabachnik–Fields reaction under green conditions—A critical over-view, *Curr. Green Chem.* 2 (2015) 218–222.
- [18] G. Keglevich, ed., 6. Synthesis of α -aminophosphonates by the Kabachnik–Fields reaction and by the Pudovik reaction, in: *Organophosphorus Chemistry*, De Gruyter, 2018: pp. 108–147. <https://doi.org/10.1515/9783110535839-006>.
- [19] A. Frisch, A.B. Nielson, A.J. Holder, *Gaussview User Manual*, Gaussian Inc., PA, (2000).
- [20] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction, *The Journal of Chemical Physics*. 96 (1992) 2155–2160.
- [21] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B*. 37 (1988) 785–789. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>.
- [22] M. Mehri, N. Chafai, L. Ouksel, K. Benbouguerra, A. Hellal, S. Chafaa, Synthesis, electrochemical and classical evaluation of the antioxidant activity of three α -aminophosphonic acids: Experimental and theoretical investigation, *Journal of Molecular Structure*. 1171 (2018) 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.05.074>.
- [23] J. Louis, Rivial; *éléments de chimie quantique à l’usage des chimistes*, CNRS Éditions. (1994).

- [24] S. AYADI, ETUDE DFT DES REACTIONS DE CYCLOADDITION DE TYPE DIELS-ALDER SUR LA MOLECULE DU FULLERENE, Moroccan Journal of Heterocyclic Chemistry. 15 (2016).
- [25] S.A. Katcyuba, N.I. Monakhova, L.K. Ashrafullina, R.R. Shagidullin, Vibrational spectra, conformations and force constants of dialkylphosphites (RO) 2P (O) H, Journal of Molecular Structure. 269 (1992) 1–21.
- [26] A. Hellal, Synthèse d'une nouvelle génération de phosphonates à base des dérivés aminophénols applications, PhD Thesis, Université Ferhat Abbas, 2016.
- [27] M. Juribašić, L. Tušek-Božić, Spectroscopic and DFT study of 3-quinolyl- α -aminophosphonates, Journal of Molecular Structure. 924–926 (2009) 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2008.11.007>.
- [28] L. Tušek-Božić, M. D'Alpaos, Palladium (II) coordination chemistry of monoethyl 2-quinolylmethylphosphonate, Polyhedron. 17 (1998) 1481–1493.
- [29] J.P. Coates, The interpretation of infrared spectra: Published reference sources, Applied Spectroscopy Reviews. 31 (1996) 179–192.
- [30] P.A. Tanner, K.-H. Leung, Spectral interpretation and qualitative analysis of organophosphorus pesticides using FT-Raman and FT-infrared spectroscopy, Applied Spectroscopy. 50 (1996) 565–571.
- [31] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, Principes d'analyse instrumentale, De Boeck Supérieur, 2003.
- [32] B. APEX, SAINT and SADABS Bruker AXS Inc, Madison, WI, USA. (2009).
- [33] A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, Completion and refinement of crystal structures with SIR92, Journal of Applied Crystallography. 26 (1993) 343–350.
- [34] G.M. Sheldrick, SHELXS-97, University of Göttingen, Germany, 1997; b) GM Sheldrick, SHELXL-97, University of Göttingen, Germany, 1997; c) A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, J. Appl. Crystallogr. 26 (1993) 343–350.
- [35] A. Ihammi, M. Chigr, E.M. Ketatni, M. Saadi, L. El Ammari, E.M. Rakib, Synthesis of new α -amino-1H indazolyl-phosphonate derivatives: Crystal structure, Hirshfeld surface analysis and DFT studies, Journal of Molecular Structure. 1220 (2020) 128702.
- [36] M.A. Spackman, J.J. McKinnon, Fingerprinting intermolecular interactions in molecular crystals, CrystEngComm. 4 (2002) 378–392.

- [37] J.J. McKinnon, D. Jayatilaka, M.A. Spackman, Towards quantitative analysis of intermolecular interactions with Hirshfeld surfaces, *Chemical Communications*. (2007) 3814–3816.
- [38] M.A. Spackman, J.J. McKinnon, D. Jayatilaka, Electrostatic potentials mapped on Hirshfeld surfaces provide direct insight into intermolecular interactions in crystals, *CrystEngComm*. 10 (2008) 377–388.
- [39] M.A. Spackman, D. Jayatilaka, Hirshfeld surface analysis, *CrystEngComm*. 11 (2009) 19–32.
- [40] F.L. Hirshfeld, Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities, *Theoretica Chimica Acta*. 44 (1977) 129–138.
- [41] H.F. Clausen, M.S. Chevallier, M.A. Spackman, B.B. Iversen, Three new co-crystals of hydroquinone: crystal structures and Hirshfeld surface analysis of intermolecular interactions, *New Journal of Chemistry*. 34 (2010) 193–199.
- [42] M.A. Spackman, P.G. Byrom, A novel definition of a molecule in a crystal, *Chemical Physics Letters*. 267 (1997) 215–220.
- [43] J.J. McKinnon, A.S. Mitchell, M.A. Spackman, Hirshfeld surfaces: a new tool for visualising and exploring molecular crystals, *Chemistry–A European Journal*. 4 (1998) 2136–2141.
- [44] J.J. McKinnon, M.A. Spackman, A.S. Mitchell, Novel tools for visualizing and exploring intermolecular interactions in molecular crystals, *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*. 60 (2004) 627–668.
- [45] J.J. Koenderink, A.J. Van Doorn, Surface shape and curvature scales, *Image and Vision Computing*. 10 (1992) 557–564.
- [46] M.J. Turner, J.J. McKinnon, S.K. Wolff, D.J. Grimwood, P.R. Spackman, D. Jayatilaka, M.A. Spackman, *CrystalExplorer17*, (2017).

CHAPITRE IV

ASPECTS

BIOCHIMIQUES DES

MOLECULES

SYNTHETISEES.

IV.1 Introduction

Pour évaluer et valoriser l'intérêt biochimique de nouvelles molécules α -aminophosphonates synthétisées dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antioxydante par différentes méthodes ainsi que leur activité anti-inflammatoire, SPF et antimicrobienne. Nous avons également étudié leur capacité anti-enzymatique notamment, leur activité anti-Alzheimer, antidiabétique et anti-ulcéreuse. Des tests d'hémolyse ont été effectués sur les molécules synthétisées pour la mise en évidence de leur cytotoxicité.

IV.2 L'activité antioxydante

De nombreuses études ont été réalisées sur le stress oxydant et son impact négatif sur la santé, notamment par la favorisation de la survenue de pathologies telles que l'athérosclérose, le cancer, le diabète du type 2, les maladies neurodégénératives et les maladies rhumatismales. Ainsi, il est légitime de penser que si l'on supplémente la population en antioxydants, toutes ces pathologies pourraient tendre à disparaître.

Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour la synthèse, l'identification et la quantification des composés d'activité antioxydante efficace.

Les antioxydants exogènes peuvent réagir de plusieurs façons afin d'inhiber les phénomènes d'oxydation en utilisant trois principaux mécanismes d'action : soit par piégeage ou réduction des radicaux libres, ou par la chélation des métaux de transition. En se basant sur ces mécanismes, et compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, l'activité antioxydante ne doit pas être conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant, car il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Par conséquent, il est difficile de comparer pleinement une méthode à une autre [1–4].

Actuellement, une grande diversité des méthodes analytiques est disponible pour la détermination *in vitro* et *in vivo* du potentiel antioxydant sur des échantillons d'intérêt biochimique.

Dans ce contexte, les tests les plus utilisés : la capacité de piégeage des radicaux (DPPH, ABTS et GOR), la capacité réductrice des ions cuivriques (CUPRAC) et ferriques (FRAP et PHENANTHROLINE) et la capacité de prévention de la peroxydation lipidique par le test du blanchiment de la beta carotène, ont été appliqués pour évaluer les capacités antioxydantes de

5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et comparées à l'activité des antioxydants standards BHT et BHA.

De plus, les valeurs d'IC₅₀ et A_{0.5}, qui font référence à la plus petite concentration d'antioxydants nécessaires pour 50% de réactivité, ont été calculées. L'efficacité des propriétés antioxydantes est inversement corrélée avec leurs IC₅₀ et A_{0.5}. Une valeur IC₅₀ ou A_{0.5} inférieures indiquent une activité plus élevée.

IV.2.1 Activité anti-radicalaire

Les capacités de piégeage des radicaux libres ont été mesurées à l'aide des radicaux DPPH•, ABTS⁺ et GOR•. Les résultats de ces tests sont exprimés en IC₅₀.

IV.2.1.1 Activité de piégeage de radical DPPH

Les antioxydants font un don d'électron ou d'hydrogène pour réduire le radical stable DPPH• en DPPH-H, forme non radicalaire. La réduction peut être visualisée par changement de couleur de violet au jaune et la capacité de réduction du radical DPPH• est déterminée par la diminution de l'absorbance à la longueur d'onde de 517 nm [5].

La possibilité que les esters α -aminophosphonates 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP font un don d'électron ou d'hydrogène pour réduire le radical stable DPPH• en DPPH-H, forme non radicalaire est mesurée par la diminution de l'absorbance à 517 nm [6]. Les valeurs des absorbances mesurées nous ont permis de calculer les pourcentages d'inhibition selon l'équation [IV.1] :

$$I_{\text{DPPH}} \% = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100 \quad [\text{IV.1}]$$

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV 1.

Tableau IV 1: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et des standards BHT et BHA

<i>concentration</i> <i>µg/ml</i>	<i>Inhibition (%)</i>				
	<i>5-HAMP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>4-HNAP</i>	<i>BHT</i>	<i>BHA</i>
0.78	21.58±0.23	-	1.85±1.41	-	-
1.56	40.48±0.31	-	33.31±0.62	-	-
3.125	72.61±0.36	-	48.58±0.11	11.69±1.88	28.95±1.16
6.25	91.08±0.02	-	58.52±0.06	22.21±1.30	54.33±1.59
12.5	Sat	33.63±0.17	69.12±1.03	37.12±1.80	76.76±1.65
25	Sat	50.63±0.22	77.76±0.11	52.63±2.70	84.09±0.35
50	Sat	73.35±0.17	85.10±0.17	56.02±0.53	87.53±0.82
100	Sat	81.96±0.11	-	83.60±0.23	87.73±0.15
200	-	87.50±0.12	-	87.28±0.26	88.43±0.23
400	-	88.51±0.17	-	-	-
IC₅₀ µg/ml	2.06±0.01	26.72±0.08	4.27±0.04	22.32±1.19	5.73±0.41

Sat : Saturé, - : Non Mesuré

Les résultats obtenus, ont permis de tracer les courbes de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des molécules étudiées $I\% = f(C)$ (Figure IV 1).

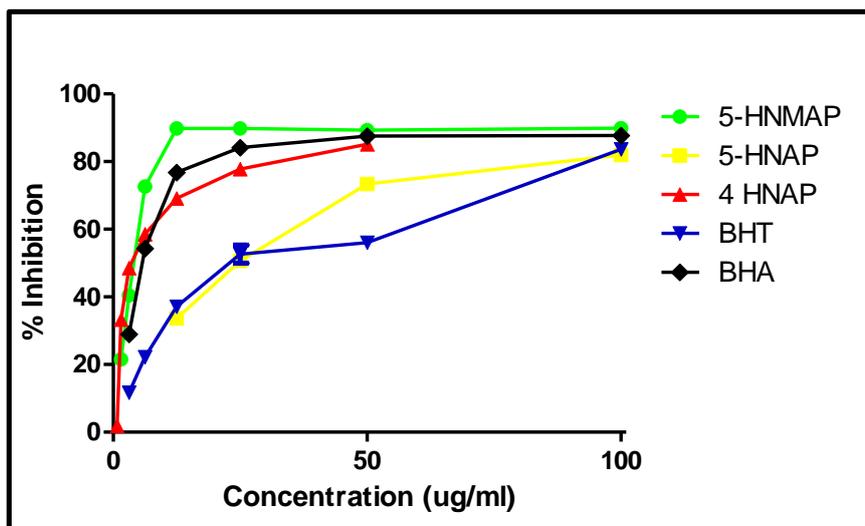


Figure IV 1 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition du radical DPPH des molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et des standards BHT et BHA

La figure IV 1 rapporte le pourcentage de l'effet de piégeage des composés testés ainsi que ceux des standards utilisés BHT et BHA.

D'après les résultats obtenus, on peut constater que toutes les molécules testées possèdent un pouvoir anti-radicalaire vis-à-vis du DPPH• (Tableau IV 1 et figure IV 1).

Les résultats montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH• est proportionnel à la concentration des esters α -aminophosphonates synthétisés et des standards BHA et BHT utilisés. Quand la concentration des composés étudiés augmente dans le milieu réactionnel, le pourcentage d'inhibition augmente jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'inhibition presque totale du DPPH• présent dans ce milieu.

La molécule 5-HMAP possède un pouvoir de piégeage du radical DPPH• très important avec un pourcentage d'inhibition élevé à des faibles concentrations par rapport aux autres molécules. Une concentration de 6.25 $\mu\text{g/mL}$ de chaque molécule testée a permis d'établir le pourcentage d'inhibition suivant :

(5-HMAP= 91.08%), (5-HNAP= Non Mesuré), (4-HNAP= (58.52%), (BHT= 22.21%) et (BHA= 54.33%).

Pour mieux évaluer la capacité antioxydante de nos composés vis-à-vis du DPPH•, les résultats ont été exprimés en IC_{50} ; ce paramètre (Concentration d'inhibition à 50 %) est défini comme étant la concentration du substrat nécessaire à diminuer de 50 % l'absorbance de la

solution initiale du DPPH. Les IC_{50} sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important [7,8].

Les valeurs IC_{50} moyennes ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,95 ($R^2 > 0,95$) où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH, et ont été comparées avec ceux d'antioxydants standards (BHT, BHA), les IC_{50} des chaque molécule et des standards BHT et BHA ont été représentées par la figure suivante.

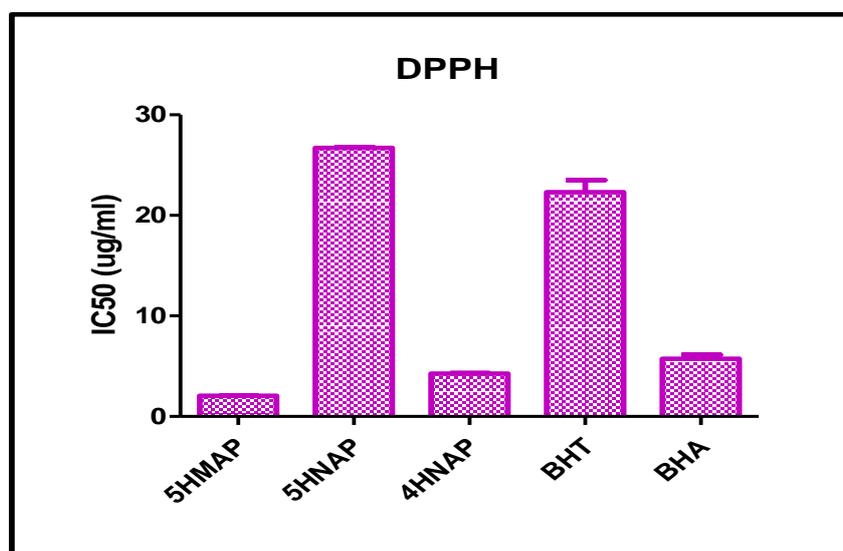


Figure IV 2: Présentation des concentrations inhibitrices IC_{50} du radical DPPH exprimées en $\mu\text{mol.mL}^{-1}$, (valeur moyenne \pm S.D pour $n=3$), les molécules concernées sont: 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP et les standards BHT et BHA

De ces résultats, il apparaît que la réduction de 50% du DPPH a été atteinte pour tous les produits testés.

Les molécules 5-HMAP et 4-HNAP possèdent un pouvoir antioxydant supérieur à celui des standards BHT et BHA avec des valeurs IC_{50} de 2.06, 4.27, 22.32 et 5.73 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour 5-HMAP, 4-HNAP, BHT et BHA respectivement, alors que la molécule 5-HNAP présente l' IC_{50} le plus élevé ($IC_{50} = 26.72 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ce qui correspond à la capacité antioxydante la plus faible, en revanche cette valeur est comparable à celle du BHT.

Ces résultats révèlent que tous les composés testés sont des puissants agents piégeurs des radicaux DPPH•. En général, l'activité antioxydante des composés étudiés peut être classée dans l'ordre décroissant suivant :



IV.2.1.2 Test de piégeage des radicaux ABTS

Le test de piégeage des radicaux ABTS est l'une des méthodes les plus utilisées pour déterminer la capacité antioxydante du don d'hydrogène et de la rupture de chaîne d'oxydation [9].

Le radical ABTS est un composé soluble dans les solutions aqueuses et organiques. Cette particularité lui donne l'avantage d'être testé sur des échantillons hydrophiles et lipophiles. Le schéma de détermination de l'action antioxydante est également pertinent pour ces deux classes hydrophiles et lipophiles d'antioxydants tels que ; flavonoïdes, hydroxycinamates, caroténoïdes, esters et antioxydants dans le plasma [10]. Il peut être généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium [11]. Cette formation se traduit par l'apparition d'une coloration verte-bleu intense. En présence d'un donneur d'hydrogène (agent antioxydant), le passage du radical ABTS à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée à une longueur d'onde de 734 nm.

L'activité des esters α -aminophosphonates synthétisés est mesurée et comparée avec les standards BHT et BHA vis-à-vis le piégeage de radical libre ABTS.

Les résultats montrent que l'absorbance du radical ABTS diminue avec l'augmentation de la concentration des composés étudiés, Les résultats obtenus pour cette activité sont en accord avec les observations (Figure 1 annexe 4). En outre, pour chaque test, l'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation [IV .1] de l'inhibition du radicale DPPH et les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV 2 : Pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS en fonction des concentrations des molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et des standards BHT et BHA

% Inhibition du radical ABTS					
concentration $\mu\text{g}/\text{Ml}$	5-HMAP	5-HNAP	4-HNAP	BHT	BHA
0.78	29.32±0.76	7.87±2.03	Na	35.61±0.75	31.47±1.60
1.56	40.82±2.02	26.37±3.38	2.00±1.81	58.56±3.22	34.13±1.31
3.125	55.96±0.56	33.34±0.83	31.97±2.00	75.57±2.07	40.28±2.88
6.25	81.33±1.24	64.69±1.91	42.79±2.49	92.29±1.60	49.71±0.12
12.5	92.64±0.21	62.22±0.19	68.98±2.24	93.15±0.19	63.72±2.02
25	92.76±0.11	90.01±0.76	80.12±2.47	94.06±0.63	78.52±0.80
50	92.53±0.10	92.48±0.67	85.28±1.33	sat	88.81±0.37
$IC_{50} \mu\text{g}/\text{mL}$	2.55±0.13	4.66±0.11	7.81±0.52	1.55±0.26	7.54±0.67

Sat : Saturé, Na : non absorbé

Les résultats obtenus, permettent de tracer les courbes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des molécules synthétisées ainsi que celles de BHT et BHA, $I\% = f(C)$ (figures IV 3). Cette figure montre que toutes les molécules testées dans cette étude apparaissent d'activité importante de piégeage de radical ABTS.

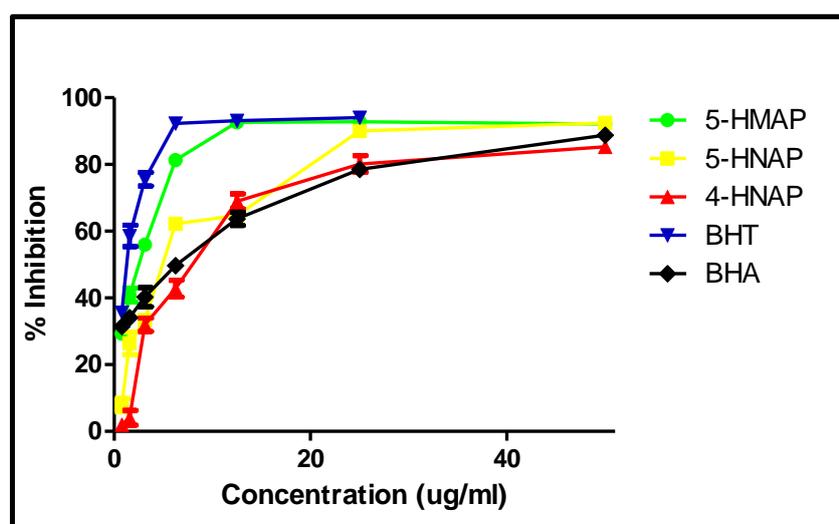


Figure IV 3 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical (ABTS) par les molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP ainsi que les standards BHT et BHA

D'après les résultats obtenus, on peut constater que tous les composés testés ont une capacité anti-radicalaire vis-à-vis le radical ABTS significative dose dépendante, le 5-HMAP et le BHA atteignent rapidement l'activité maximale à une très faible concentration à la différence d'autres produits testés qui nécessite plus de temps et de concentration pour atteindre le même niveau.

Une concentration de 25 $\mu\text{g/mL}$ des produits testés conduit à un pourcentage d'inhibition de : (5-HMAP= 92.8%), (5-HNAP= 90.0%), (4-HNAP= 80.1%), (BHT= 94.1%) et (BHA= 78.5%), l'ordre décroissant de la capacité inhibitrice des molécules étudiées vis-à-vis le radical ABTS est le suivant :

$$\text{BHT} < 5\text{-HNAP} < 5\text{-HMAP} < 4\text{-HNAP} < \text{BHA}.$$

En outre, les valeurs IC_{50} des composés et des standards BHT et BHA ont également été calculées et représentées dans la figure IV 4. Nous rappelons que la concentration inhibitrice IC_{50} est la concentration de l'échantillon nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical ABTS. Une valeur faible d' IC_{50} correspond à une activité antioxydante élevée du composé [5]. Cette valeur est déterminée graphiquement à partir des droites de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des composés étudiés.

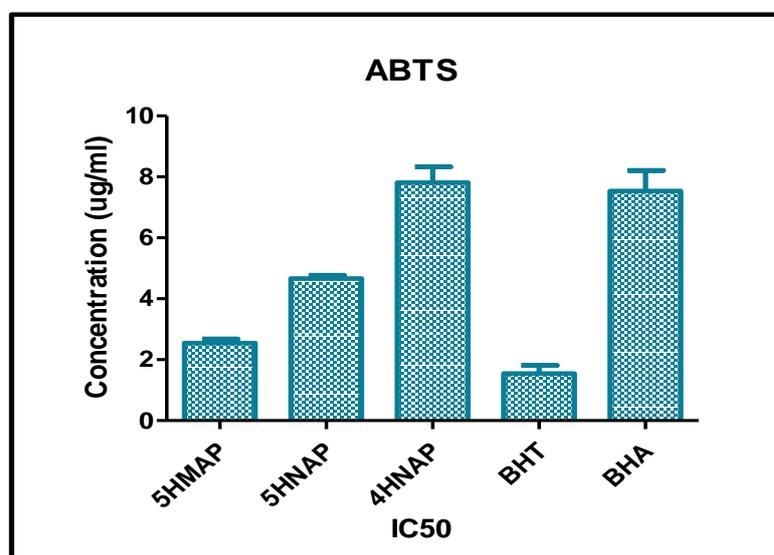


Figure IV 4 : Présentation des concentrations des molécule inhibitrices du radical ABTS IC_{50} exprimées en $\mu\text{mol.mL}^{-1}$, (valeur moyenne \pm S.D pour $n=3$), les molécules concernées sont: 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP et les standards BHT et BHA

D'après les résultats obtenus le 5-HMAP à une meilleure activité inhibitrice d'ABTS ($IC_{50}=2.6\mu\text{g/ml}$), qui est une valeur inférieure à celle de la BHA ($7.5\mu\text{g/mL}$) et comparable à celle de BHT ($1.6\mu\text{g/mL}$), suivis par le 5-HNAP avec un taux d' IC_{50} de $4.7\mu\text{g/mL}$. Alors que le 4-HNAP a montré l'activité inhibitrice la plus faible ce qui correspond à un IC_{50} le plus élevé ($IC_{50} = 7.8\mu\text{g /mL}$).

En général, l'activité antioxydante des composés étudiés peut être classée dans l'ordre décroissant suivant :



IV.2.1.3 Activité de piégeage du radical Galvinoxyl (GOR)

La capacité des esters synthétisés à donner des atomes d'hydrogène a été également étudiée par un troisième test qui est en tout point complémentaire aux deux tests DPPH• et ABTS•+ ; dosage de balayage des radicaux Galvinoxyl. Le radical Galvinoxyl (GOR•) est un radical phénolique relativement stable, peut être réduit par des capteurs de radicaux libres donneurs d'hydrogène. Il peut être réduit de manière irréversible, en raison de son électron impair, le radical Galvinoxyl présente une bande d'absorption puissante à 428 nm, dans son état radicalaire à une faible concentration, une solution de Galvinoxyl apparaît en jaune. Sa couleur est dégradée du jaune foncé en jaune pâle en présence d'un antioxydant et par conséquent son absorbance à 428 est diminuée [12]. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau suivant.

Tableau IV 3: Activité antiradicalaire de GOR par les esters aminophosphonates synthétisés 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP ainsi que les standards BHT et BHA

% inhibition du radical (GOR)					
Concentration $\mu\text{g/mL}$	5-HMAP	5-HNAP	4-HNAP	BHT	BHA
1.56	11.3 \pm 1.9	6.5 \pm 0.70	13.9 \pm 1.0	34.7 \pm 2.6	26.0 \pm 2.6
3.125	37.6 \pm 1.8	17.2 \pm 1.3	34.4 \pm 3.9	49.2 \pm 0.8	39.2 \pm 0.9
6.25	91.1 \pm 0.8	44.5 \pm 2.9	80.9 \pm 1.3	61.3 \pm 0.7	54.2 \pm 0.3
12.5	97.0 \pm 0.2	86.7 \pm 1.3	94.5 \pm 0.3	68.9 \pm 0.3	65.0 \pm 1.3
25	Sat	95.33 \pm 0.2	Sat	70.0 \pm 0.5	70.2 \pm 0.5
50	Sat	Sat	Sat	70.5 \pm 0.6	70.3 \pm 0.7
100	Sat	Sat	Sat	71.1 \pm 0.7	70.6 \pm 0.1
IC₅₀ $\mu\text{g/ML}$	3.8\pm0.0	7.4\pm0.0	4.13\pm0.1	3.3\pm0.2	5.4\pm0.06

Sat : saturé

Les résultats sont illustrés sous forme de courbe de pourcentage d'inhibition du radical Galvanoxyl en fonction des différentes concentrations pour les produits synthétisés et les standards BHT et BHA.

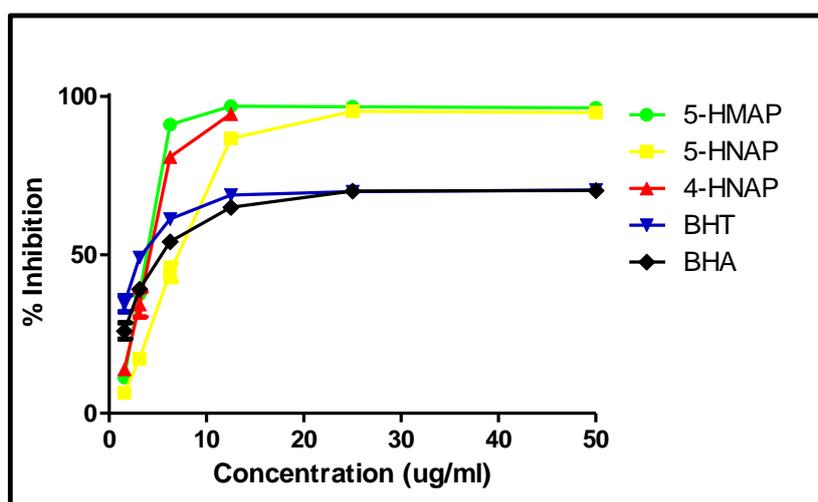


Figure IV 5 : Courbes des pourcentages d'inhibition du radical Galvanoxyl(GOR) des molécules synthétisés 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP et des standards utilisés (BHT et BHA)

Ces résultats indiquent que tous les produits possèdent clairement une activité antiradicalaire vis-à-vis le radicale phénolique Galvanoxyl (GOR) par excellente, cette activité est

proportionnelle à l'augmentation de la concentration et elle est en accord avec ces observations (Figure 2 annexe 4).

A partir de la représentation graphique, il apparaît que le 5-HMAP a un pouvoir inhibiteur du radical libre Galvinoxyl(GOR) le plus significatif, avec un départ d'activité à la concentration de 1.56µg/mL par une inhibition de 11.3%, il atteint son plafonne d'activité 97.0% à une concentration de 12.5 µg/mL, il affiche également une cinétique plus rapide que celle des standards commerciaux utilisés pour cette étude le BHT et le BHA.

Pour le 5-HNAP son effet débute à la concentration de 1.56µg/ml avec une inhibition de 6.5% et donne son activité maximale de 94.5% à la concentration de 25 µg/ml.

Finalement le 4-HNAP présente une activité très similaire à celle de 5-HMAP, son effet inhibiteur commence à 13.9% pour la même concentration de départ (1.56µg/mL), et il atteint son maximum d'effet à 94.5% à 12.5 µg/mL.

D'une manière générale, pour la concentration 12.5 µg/ml, la capacité antioxydante du radical libre Galvinoxyl(GOR) des molécules étudiées suit l'ordre croissant donné par la séquence :

$$5\text{-HMAP}_{(97.0\%)} > 4\text{-HNAP}_{(94.5\%)} > 5\text{-HNAP}_{(86.7\%)} > \text{BHT}_{(68.9\%)} > \text{BHA}_{(65.0\%)}$$

En outre, les valeurs IC₅₀ des composés et des standards ont également été calculées (Tableau IV 3 et figure IV 6). Nous rappelons que la concentration effectrice IC₅₀ est la concentration de l'échantillon nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical GOR, et qu'une valeur faible d'IC₅₀ corresponde à une activité antioxydante élevée du composé.

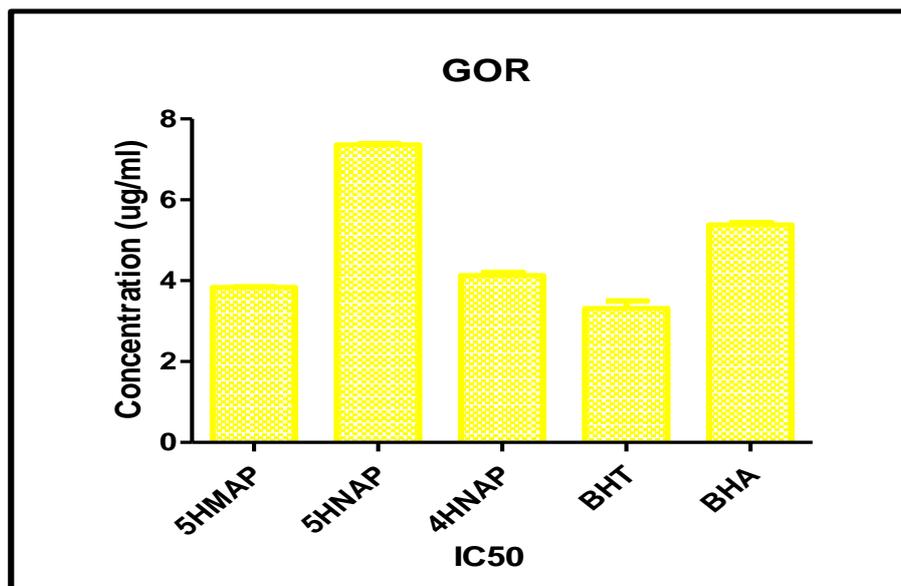


Figure IV 6 : Présentation des concentrations des molécules inhibitrices du radical GOR IC_{50} exprimées en $\mu\text{mol.mL}^{-1}$, (valeur moyenne \pm S.D pour $n=3$), les molécules concernées sont: 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP et les standards BHT et BHA

De ces résultats il apparaît que tous les composés testés sont des puissants agents piègeurs des radicaux GOR, et parmi tous les produits testés, le 5-HMAP exerce une bonne activité réductrice avec une valeur d' IC_{50} atteignant ($3.8 \mu\text{g/mL}$), ce qui est très proche à celle de références le BHA ($3.3 \mu\text{g/mL}$) et supérieur au BHT ($5.4 \mu\text{g/mL}$). Or, en comparaison avec le 5-HNAP et le 4-HNAP on trouve que, le 5-HNAP est le dérivé qui doté d'un potentiel antioxydant le plus faible, donnant une valeur d' $IC_{50}= 7.4 \mu\text{g/mL}$. D'un autre côté, les données enregistrées avec la molécule 4-HNAP ont mis en évidence une valeur d' $IC_{50}= 4.1 \mu\text{g/mL}$. Ces résultats montrent que le dérivé 4-HNAP possède une activité plus importante par rapport au BHA et comparable à celle du BHT.

Les résultats du pourcentage d'inhibition et les valeurs IC_{50} ont montré que l'activité antioxydante Galvinoxyl des esters aminophosphonates synthétisés et les standards commercialisés augmente dans l'ordre suivant :

$$5\text{-HNAP} < \text{BHT} < 4\text{-HNAP} < 5\text{-HMAP} < \text{BHA}$$

En conclusion, les résultats de piégeage de nos produits par les radicaux (DPPH, ABTS et GOR) démontrent que les produits synthétisés peuvent efficacement piéger divers radicaux libres dans des conditions in vitro. Les résultats de l'activité antiradicalaire des esters

synthétisés établis par les trois méthodes appliquées, ont dévoilé que le dérivé 5-HMAP présente une forte activité antioxydante.

Cette activité antioxydante antiradicalaire dépend de la concentration en antioxydant, de la structure chimique et de l'interaction entre les antioxydants.

D'autre part, la présence de certains groupements électrodonneurs et électroattracteurs ainsi que leur position ont un impact sur le pouvoir réducteur des substances [13,14]. La propriété de piégeage de nos produits peut être due aux groupements phosphonates, aux groupes hydroxyle phénolique et aux groupements N-H existant dans la structure chimique qui peut également neutraliser les radicaux DPPH, ABTS et GOR par donation d'hydrogène. De plus, lorsqu'on compare les résultats des trois méthodes DPPH, ABTS, et GOR utilisées on constate que la présence d'un groupement électrodonneur (CH₃) en position méta sur le noyau phénol des α -aminophosphonates a considérablement augmenté l'activité de 5-HMAP par rapport à 5-HNAP et 4-HNAP substitués en position méta et para par le groupement électroattracteur NO₂ respectivement.

IV.2.2 Activité réductrice

Le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. Différentes études ont indiqué que la capacité de don d'électrons des composés bioactifs est associée à une activité antioxydante [15,16].

La capacité réductrice des produits synthétisés a été mesurée à l'aide des tests de CUPRAC, FRAP et phénanthroline. Les résultats de ces tests exprimés en A_{0,5}, la valeur A_{0,5} est définie comme étant la concentration du substrat qui donne une absorbance de 0,50.

IV.2.2.1 Test de l'activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)

Le test de CUPRAC (CUPric Reducing Antioxydant Capacity) est l'une des méthodes les plus utilisées pour déterminer la capacité antioxydante ; le réactif CUPRAC est stable, facilement accessible et peu coûteux. La réaction est effectuée à presque pH physiologique, constituant un avantage de base pour le dosage réaliste des fluides biologiques [17].

Le test de CUPRAC est basé sur la mesure de l'absorbance du chélate de Cu(I)-Néocuproïne(Nc) formé à la suite de la réaction d'oxydoréduction des antioxydants en clivant la chaîne Cu(II)-Nc [18]. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-

neocuproéne est réduit et cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm [19].

La réduction du cuivre (CUPRAC) des produits synthétisés a été déterminée par la méthode décrite par *Apak et al* [17]. La capacité réductrice des molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et des standards BHT et BHA est exprimée par la variation de l'absorbance avec la concentration, l'ensemble des valeurs obtenues est reporté dans le tableau IV 4 et la figure IV 7.

Tableau IV 4: Pouvoir réducteur cuivrique(CUPRAC) exprimé en absorbance des dérivés α -aminophosphonates (5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP) et des standards BHT et BHA

<i>Absorbances du test de la réduction du cuivre (CUPRAC)</i>					
<i>concentration $\mu\text{g}/\text{ml}$</i>	<i>5-HMAP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>4-HNAP</i>	<i>BHT</i>	<i>BHA</i>
1.56	0.15±0.02	0.13±0.01	0.15±0.01	0.11±0.04	0.23±0.07
3.125	0.19±0.02	0.19±0.03	0.25±0.01	0.19±0.01	0.46±0.00
6.25	0.30±0.04	0.25±0.00	0.41±0.01	0.33±0.04	0.78±0.01
12.5	0.47±0.01	0.45±0.05	0.65±0.03	0.66±0.07	1.34±0.08
25	0.95±0.07	0.67±0.01	1.23±0.031	1.03±0.07	2.36±0.17
50	1.91±0.26	1.37±0.13	2.17±0.03	1.48±0.09	3.45±0.02
100	3.37±0.12	2.50±0.06	3.35±0.16	2.04±0.14	3.76±0.03
$A_{0.50}(\mu\text{g}/\text{mL})$	12.52±0.85	16.84±0.55	9.11±0.78	9.62±0.87	3.64±0.19

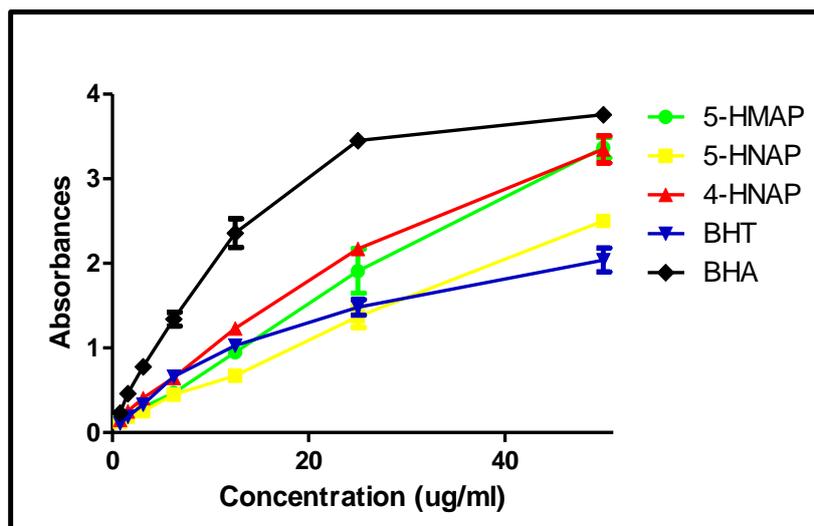


Figure IV 7 : Capacité de réduction du cuivre par les molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et les standards BHT et BHA déterminée d'après la méthode de CUPRAC

Les résultats obtenus montrent que la réduction du cuivre (CUPRAC) de tous les composés dépend de la concentration. D'autre part, les trois composés ont un potentiel réducteur très élevé, à la concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$, l'ordre croissant de la capacité réductrice des molécules étudiées se traduit par des valeurs de densité optique est le suivant :

$$\text{BHA (3.76)} > \text{5-HMAP (3.37)} > \text{4-HNAP (3.35)} > \text{5-HNAP (2.50)} > \text{BHT (2.04)}$$

Les résultats obtenus nous ont permis ensuite de déterminer la concentration efficace qui correspond à l'absorbance 0.5 ou la ($A_{0.5}$), (figure IV 8). Nous rappelons que la concentration $A_{0.5}$ est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5.

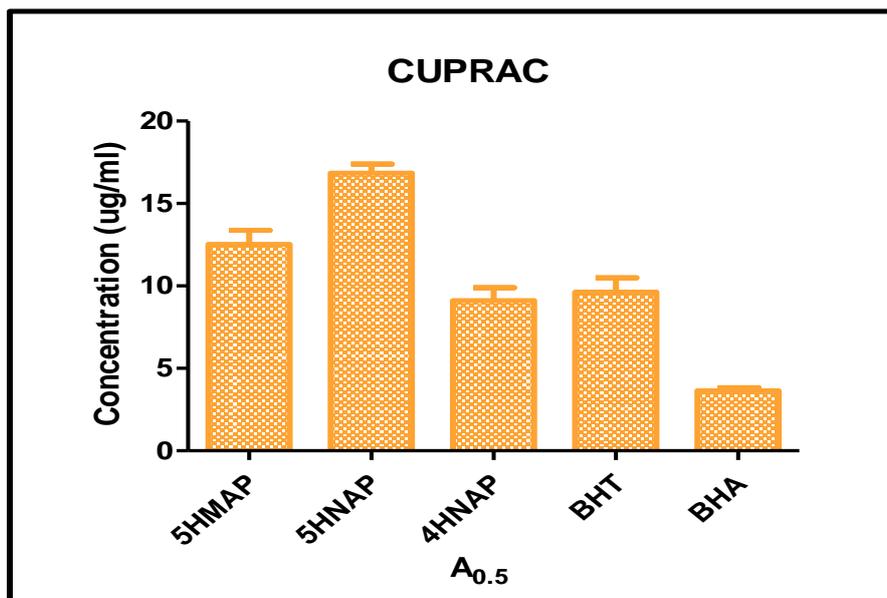


Figure IV 8 : Résultats des $A_{0.5}$ exprimées en $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ des molécules 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP et des standards BHT et BHA par la méthode CUPRAC

Il est bien connu que plus la valeur de $A_{0.5}$ est faible, plus le composé est plus antioxydant. Nous remarquons que le 4-HNAP à manifester une forte activité avec une $A_{0.5}$ d'environ $9.62 \pm 0.87 \mu\text{g}/\text{mL}$ suivie par le 5-HMAP. Tandis que le 5-HNAP a montré une faible capacité à réduire le cuivre. Toutefois, les résultats d'antioxydants standard BHT sont inférieurs à celle de 4-HNAP et comparable à celle de 5-HMAP. Le BHA a manifesté des capacités de réduction plus intéressantes par rapport à nos produits. Les résultats obtenus pour cette activité sont en accord avec les observations (Figure 3 annexe 4).

L'ordre de réduction du cuivre par les différents produits est classé comme suit :

$$5\text{-HNAP } (A_{0.5}=16.84 \mu\text{g}/\text{mL}) < 5\text{-HMAP } (A_{0.5}= 12.52 \mu\text{g}/\text{mL}) < \text{BHT } A_{0.5}= (9.62 \mu\text{g}/\text{mL}) < \\ 4\text{-HNAP } (A_{0.5}= 9.11 \mu\text{g}/\text{mL}) < \text{BHA } (A_{0.5}=3.64 \mu\text{g}/\text{mL}).$$

IV.2.2.2 Capacité des molécules synthétisées à réduire l'ion ferrique FRAP

L'activité réductrice du fer de nos produits est déterminée selon la méthode décrite par Oyaizu [20], Cette méthode est appelée FRAP, elle est basée sur la capacité des antioxydants donateurs d'électron à réduire le fer ferrique Fe^{3+} de ferricyanure de potassium en fer ferreux Fe^{2+} [20]. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évaluée en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert apparaît dans le milieu réactionnel à 700 nm. Une

augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés.

Les résultats du pouvoir réducteur des produits testés sont représentés par les absorbances en fonction des concentrations pour chaque molécule ainsi que les valeurs de la concentration à l'absorbance 0,5 pour les trois produits et les standards (BHT et BHA), Tableau IV.5.

Tableau IV 5: *Pouvoir réducteur des molécules 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP et des standards BHT et BHA sur le fer, déterminé par la méthode FRAP*

<i>Absorbances du test du Pouvoir réducteur de fer (FRAP)</i>					
<i>Concentration $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>5-HMAP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>4-HNAP</i>	<i>BHT</i>	<i>BHA</i>
0.39	<i>0.12\pm0.01</i>	<i>0.15\pm0.04</i>	<i>0.31\pm0.01</i>	-	-
0.78	<i>0.16\pm0.01</i>	<i>0.18\pm0.01</i>	<i>0.39\pm0.04</i>	<i>0.07\pm0.00</i>	<i>0.09\pm0.00</i>
1.56	<i>0.26\pm0.01</i>	<i>0.28\pm0.01</i>	<i>0.56\pm0.04</i>	<i>0.08\pm0.00</i>	<i>0.11\pm0.01</i>
3.125	<i>0.35\pm0.07</i>	<i>0.28\pm0.01</i>	<i>0.59\pm0.00</i>	<i>0.10\pm0.01</i>	<i>0.18\pm0.02</i>
6.25	<i>0.58\pm0.05</i>	<i>0.46\pm0.01</i>	<i>0.83\pm0.00</i>	<i>0.13\pm0.02</i>	<i>0.36\pm0.04</i>
12.5	<i>1.14\pm0.11</i>	<i>0.59\pm0.02</i>	<i>1.06\pm0.02</i>	<i>0.22\pm0.04</i>	<i>0.78\pm0.07</i>
25	<i>1.97\pm0.22</i>	<i>0.76\pm0.03</i>	<i>1.70\pm0.09</i>	<i>0.28\pm0.05</i>	<i>1.74\pm0.07</i>
<i>A_{0.50}($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>4.84\pm0.75</i>	<i>7.78\pm1.30</i>	<i>1.84\pm0.11</i>	<i>>50</i>	<i>8.41\pm0.67</i>

- : Non Mesuré

La lecture des absorbances des solutions préparées a permis de tracer les courbes : Absorption = f (concentrations), présentées sur la figure suivante.

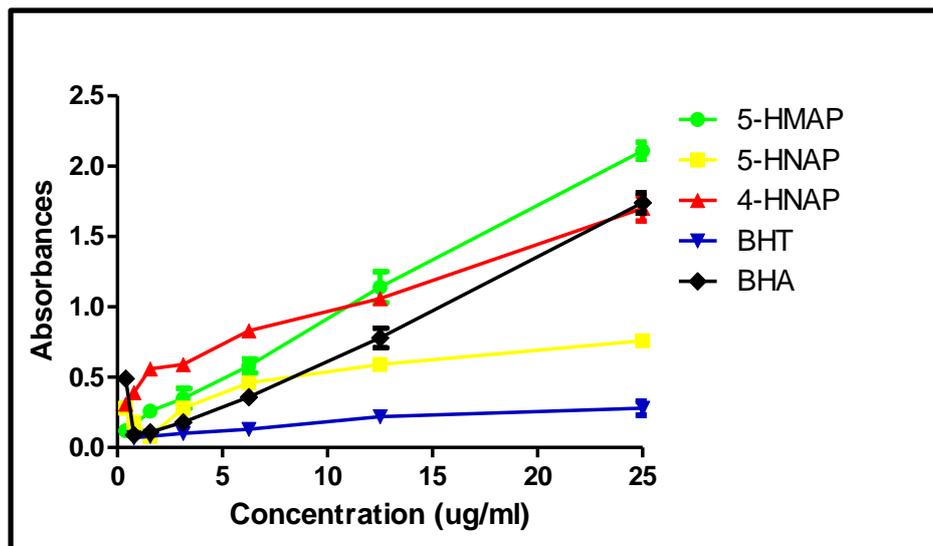


Figure IV 9 : Capacité de réduction du fer des molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et des standards BHT et BHA par la méthode de FRAP

Nous remarquons d'après cette représentation graphique, que le pouvoir réducteur des esters α -aminophosphonates synthétisés est proportionnel à la concentration. D'autre part, les trois composés ont un potentiel réducteur de fer plus élevé que les deux standards BHT et BHA.

A une concentration de 12.5 $\mu\text{g/mL}$, les 5-HMAP et le 4-HNAP ont un pouvoir réducteur très élevé par rapport au 5-HNAP et aussi par rapport aux deux standards (BHT et BHA) avec une absorbance maximale de 1.14 et 1.06 et 0.59 respectivement. Le standard BHT présente le pouvoir réducteur le plus faible de tous les produits testés avec une absorbance égale à 0.22 ± 0.04 nm pour la même concentration de 12.5 $\mu\text{g/ml}$, l'ordre croissant de la capacité réductrice des molécules étudiées se traduit par des valeurs de densité optique :

$$5\text{-HMAP} > 4\text{-HNAP} > \text{BHA} > 5\text{-HNAP} > \text{BHT}$$

Pour mieux évaluer la capacité réductrice de fer de nos composés utilisant la méthode FRAP ; les résultats ont été exprimés en $A_{0.5}$. La valeur $A_{0.5}$ correspond à la concentration qui assure une absorbance de 0,5 est déterminée à partir des graphes de concentration des produits en fonction de la densité optique DO. Cette valeur nous a permis d'évaluer et comparer l'efficacité des différents dérivés, plus la valeur est petite, plus l'effet réducteur du fer est élevé. Les résultats sont exprimés sur l'histogramme illustré dans la figure IV 10.

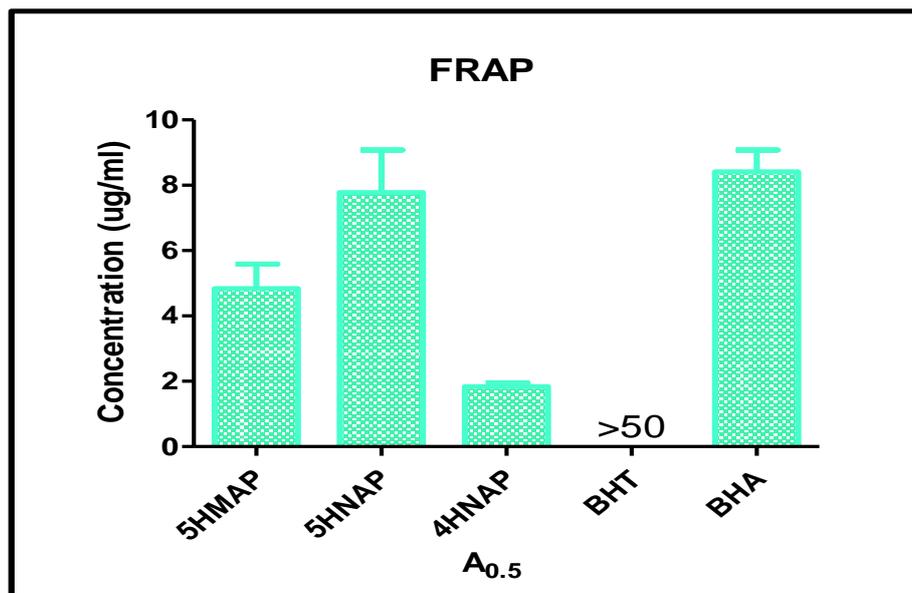


Figure IV 10 : Valeurs des absorbances $A_{0.5}$ des molécules 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP et des standards BHT et BHA déterminé par la méthode FRAP

L'effet réducteur des dérivés aminophosphonates présenté par la valeur de concentration à l'absorbance 0.5 nm ($A_{0.5}$) indique que les valeurs des concentrations $A_{0.5}$ sont inférieures à celles des standards BHT et BHA. Il est bien connu que plus la valeur de $A_{0.5}$, est faible, plus le composé est plus antioxydant. Selon ces résultats, on constate que le 4-HNAP présente un potentiel de réduction de fer, le plus intéressant avec une $A_{0.5}$ de 1.84 $\mu\text{g/mL}$ suivie du 5-HMAP avec une valeur $A_{0.5}$ de 4.84 $\mu\text{g/mL}$ et du 5-HNAP avec $A_{0.5}$ de 7.78 $\mu\text{g/mL}$, tandis que les standards BHT et BHA utilisés ont montré une faible capacité à réduire le fer par rapport à nos produits.

IV.2.2.3 Activité antioxydante basée sur l'effet de la phénanthroline

La méthode colorimétrique de phénanthroline a été utilisée pour le dosage du Fe(II). Cette méthode est basée sur la réduction de l'ion Fe^{3+} de ferre ferrique (FeCl_3) en fer ferreux (Fe^{2+}) en présence d'un composé antioxydant donneur d'électrons. L'ion Fe^{2+} formés réagi ensuite avec l'orthophénanthroline pour donner un complexe rouge-orangé, appelé complexe « ferroïne ». La phénanthroline est une base de LEWIS : ses électrons libres, portés par les 2 atomes d'azote, peuvent être partagés avec le Fe(II) qui se comporte comme un acide de Lewis. En présence de ces 2 espèces, il se forme un complexe stable rouge-orangé de Fe (II) coordonné par trois ligands de phénanthroline et il se prête bien à l'analyse colorimétrique à une longueur d'onde de 510 nm. L'activité phénanthroline des molécules α -

aminophosphonates synthétisées et des standards est déterminée selon la méthode de *SzydłowskaCzerniaka et al* [21]. Elle est plus précise et plus simple et elle a une bonne corrélation avec la méthode FRAP [22].

Les résultats de l'activité phénanthroline sont représentés par l'absorbance $A_{0.5}$ mesurée en fonction de la concentration des esters synthétisés et des standards BHT et BHA (Tableau IV 6).

Tableau IV 6: Pouvoir réducteur des molécules 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP, BHT et BHA sur le fer déterminé d'après la méthode FRAP

<i>Absorbances du test du Pouvoir réducteur de fer (phénanthroline)</i>					
<i>Concentration n µg/mL</i>	<i>5-HMAP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>4-HNAP</i>	<i>BHT</i>	<i>BHA</i>
<i>0.39</i>	<i>0.45±0.03</i>	<i>0.28±0.02</i>	<i>0.31±0.00</i>	<i>0.47±0.01</i>	<i>0.49±0.01</i>
<i>0.78</i>	<i>0.46±0.01</i>	<i>0.29±0.01</i>	<i>0.35±0.02</i>	<i>0.47±0.01</i>	<i>0.59±0.01</i>
<i>1.56</i>	<i>0.56±0.04</i>	<i>0.35±0.01</i>	<i>0.41±0.00</i>	<i>0.53±0.03</i>	<i>0.73±0.02</i>
<i>3.125</i>	<i>0.56±0.04</i>	<i>0.46±0.03</i>	<i>0.59±0.10</i>	<i>1.23±0.02</i>	<i>0.93±0.01</i>
<i>6.25</i>	<i>0.74±0.04</i>	<i>0.64±0.01</i>	<i>0.74±0.04</i>	<i>1.84±0.01</i>	<i>1.25±0.04</i>
<i>12.5</i>	<i>0.74±0.07</i>	<i>0.92±0.06</i>	<i>1.20±0.05</i>	<i>3.48±0.03</i>	<i>2.10±0.05</i>
<i>25</i>	<i>1.52±0.12</i>	<i>1.41±0.07</i>	<i>1.97±0.16</i>	<i>4.84±0.01</i>	<i>4.89±0.06</i>
<i>A_{0.50}(µg/mL)</i>	<i>1.09±0.21</i>	<i>3.90±0.18</i>	<i>2.49±0.57</i>	<i>2.24±0.17</i>	<i>0.93±0.07</i>

Les résultats obtenus montrent que les différents composés étudiés ainsi que les standards interfèrent d'une manière dose dépendante avec la formation du complexe (Fe^{2+} - phénanthroline). L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique l'augmentation du pouvoir réducteur de l'antioxydant (figure IV 11).

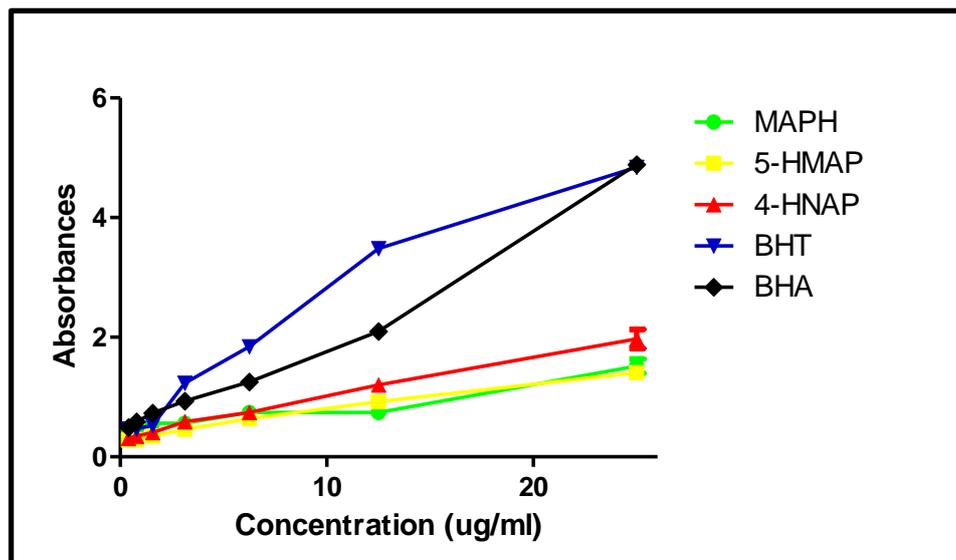


Figure IV 11 : Capacité des molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et des standards BHT et BHA à réduire le fer selon la méthode de phénanthroline

Le changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au rouge-orangé, indique la formation des complexes ferroïne, ceci et donc un autre résultat qui confirme la capacité de nos produits à donner des électrons pour réduire le fer ferrique. Suivant les indications de la figure 5 de l'annexe 4, les esters α -aminophosphonates ont montré une bonne activité réductrice.

A une concentration de 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$, le 4-HNAP à manifester une meilleure activité avec une absorbance maximale de l'ordre de 1.97nm. Le dérivé 5-HNAP exerce une activité réductrice inférieure à celle du dérivé 5-HMAP avec une absorbance maximale de 1.41nm et 1.52nm respectivement à la même concentration. L'efficacité réductrice des trois esters α -aminophosphonates et des standards à la même concentration diminuée dans l'ordre :

$$\text{BHA (4.89)} > \text{BHT (4.84)} > \text{4-HNAP (1.97)} > \text{5-HMAP (1.52)} > \text{5-HNAP (1.41)}$$

En outre, les valeurs $A_{0.5}$ des composés et des standards ont également été calculées (figure IV 12). Nous rappelons que la concentration effectrice $A_{0.5}$ est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5.

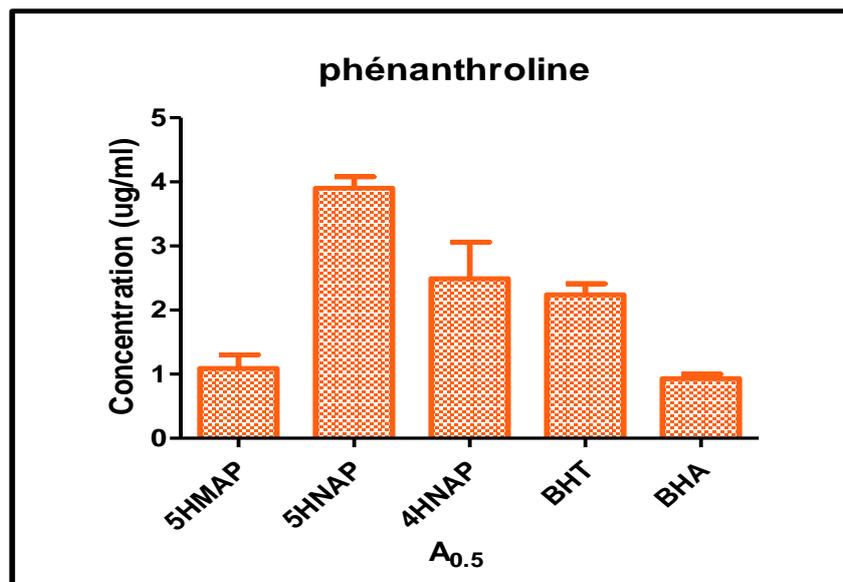


Figure IV 12 : Valeurs des absorbances $A_{0.5}$ des molécules 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP, BHT et BHA déterminées en fonction de la concentration par la méthode phénanthroline

D'après les résultats représentés par l'histogramme illustré au-dessus, on constate que 5-HMAP révèle une capacité antioxydante plus élevée que celle des autres esters avec $A_{0.5}$ 1.09 $\mu\text{g/ml}$ cette valeur est inférieure à celle de BHT 2.24 $\mu\text{g/ml}$ et très proche à celle de BHA 0.93 $\mu\text{g/ml}$. Pour le 4-HNAP l' $A_{0.5}$ est de l'ordre de 2.49 $\mu\text{g/ml}$. Cette valeur est plus proche à celle de BHT. Le 5-HNAP présente l'activité antioxydante la plus faible, leur $A_{0.5}$ est de 3.90 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats obtenus restent très comparables avec ceux affichés par les standards BHT et BHA ($A_{0.5}$ égale 2.24 et 0.93 $\mu\text{g/ml}$) respectivement.

D'une manière générale, la capacité antioxydante des molécules étudiées et des standards suit l'ordre croissant donné par la séquence :

$$\text{BHT} > 5\text{-HMAP} > \text{BHT} > 4\text{-HNAP} > 5\text{-HNAP}$$

En conclusion, les résultats de la capacité réductrice, obtenus par les tests de CUPRAC, FRAP et phénanthroline, démontrent que les produits synthétisés possèdent une activité antioxydante puissante dans des conditions *in vitro*, par la réduction des ions cuivriques (CUPRAC) et ferriques (FRAP et la PHENANTHROLINE), et que le dérivé 4-HNAP présente une meilleure activité antioxydante.

IV.2.3 Activités inhibitrices de peroxydation des lipides (le blanchiment de b-carotène)

Pour compléter l'étude antioxydante, la détermination de l'activité antioxydante d'un produit contre la peroxydation lipidique en milieu micellaire, donc lipophile, a été testée. Développée pour connaître l'activité d'un produit pour la protection des membranes biologiques, des cellules et des tissus contre l'oxydation [23,24]. C'est la raison pour laquelle beaucoup de chercheurs de l'activité antioxydante choisissent le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplé à celle du β -carotène comme modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques [25,26].

Cette méthode est basée sur la réaction de peroxydation d'un autre antioxydant lipophile le β -carotène qui est un composé physiologique important [27–29], de la famille des caroténoïdes est connue pour protéger les acides gras. En outre, le β -carotène est employé comme agent de coloration dans les boissons, et sa décoloration réduirait nettement la qualité de ces produits. Il présente un pic d'absorbance caractéristique à 470 nm, apparaissant orange.

Des micelles sont créées en réalisant une émulsion d'acide linoléique et de Tween dans l'eau. A l'intérieur de ces micelles se trouvent des molécules de β -carotène natif. L'ajout d'eau saturée en oxygène et la chaleur (50 °C) entraîne l'oxydation de l'acide linoléique et par conséquent, du β -carotène qui se dégrade en rétinol. Puisque le rétinol, qui a perdu une partie de la forme conjuguée du β -carotène n'absorbe pas à 470 nm, l'extinction de l'absorbance du mélange est suivie par spectrophotométrie à 470 nm. La présence d'un antioxydant dans le mélange réactionnel inhibe l'oxydation du β -carotène et entraîne un maintien de l'absorbance.

Pour se renseigner sur la puissance des produits synthétisés à ralentir la vitesse de l'oxydation des lipides, nous avons réalisé un suivi de la réaction de l'oxydation de l'acide linoléique par mesure de l'abaissement de l'absorbance au temps 0 puis au bout de deux heures.

Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique et le blanchiment de b-carotène des esters α -aminophosphonates synthétisés et les molécules de références BHT et BHA sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV 7: Pourcentage d'inhibition des molécules α -aminophosphonates synthétisés 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et standards BHT et BHA, par peroxydation, du β -carotène

<i>% Inhibition, dans le test de blanchissement acide linoléique/β-carotène</i>					
<i>C ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>5-HMAP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>4-HNAP</i>	<i>BHT</i>	<i>BHA</i>
<i>3.125</i>	32.32 \pm 2.67	-	-	81.14 \pm 0.84	84.23 \pm 1.14
<i>6.25</i>	56.26 \pm 0.76	-	-	86.09 \pm 1.04	90.11 \pm 0.68
<i>12.5</i>	86.62 \pm 0,48	24.96 \pm 0.13	38.28 \pm 0.45	87.52 \pm 4.24	94.59 \pm 0.77
<i>25</i>	87.64 \pm 0,49	26.32 \pm 1.25	54.35 \pm 1.05	91.67 \pm 0.52	96.09 \pm 0.02
<i>50</i>	88.30 \pm 1,86	29.12 \pm 0.30	64.10 \pm 0.75	94.11 \pm 0.42	97.35 \pm 1.08
<i>100</i>	sat	41.58 \pm 0.89	74.17 \pm 0.34	94.41 \pm 0.32	99.59 \pm 0.14
<i>200</i>	sat	54.10 \pm 0.78	81.73 \pm 2.94	95.28 \pm 3.25	99.76 \pm
<i>400</i>	-	61.98 \pm 0.48	94.11 \pm 4.77	-	-
<i>800</i>	-	72.55 \pm 0.87	sat	-	-
<i>IC₅₀ $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>5.43\pm0.12</i>	<i>169.05\pm3.02</i>	<i>25.69\pm0.02</i>	<i>0.91\pm0.01</i>	<i>1.05\pm0.03</i>

- : Non Mesuré ; *sat* : saturé

Les résultats obtenus, permettent de tracer les courbes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des molécules synthétisées ainsi que celle des standards BHT et BHA, $I\% = f(C)$, (figures IV 13).

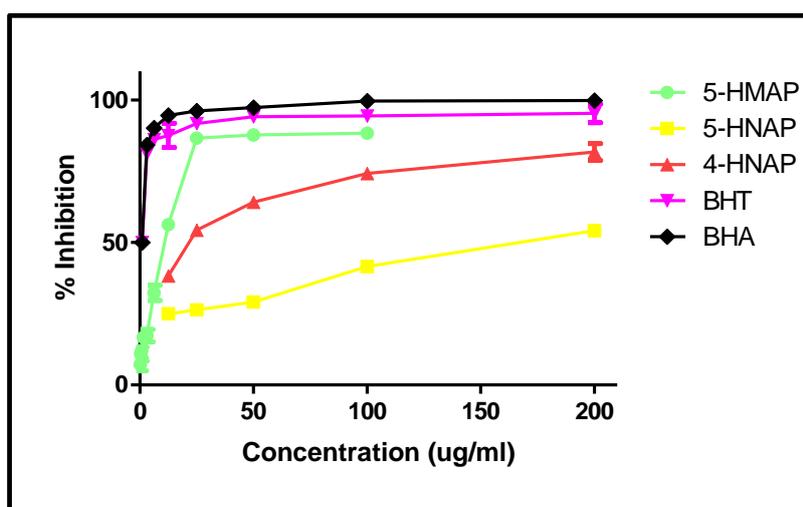


Figure IV 13 : Inhibition ($I\% = f(C)$) de blanchiment β -carotène par les dérivés 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et des standards BHT et BHA

Les résultats montrent que l'addition des aminophosphonates synthétisés au mélange acide linoléique/ β -carotène empêche le blanchiment de ce dernier, ce qui témoigne leurs fortes activités antioxydantes. L'activité antioxydante augmente avec l'augmentation de la concentration et tend à se stabiliser pour des concentrations supérieures à 12.5 $\mu\text{g/ml}$ pour la molécule 5-HMAH.

Nous remarquons clairement que le produit 5-HMAP présente une très bonne activité protectrice contre l'oxydation du β -carotène par les radicaux peroxydes par rapport à celle du 4-HMAP et 5-HNAP.

Tous les produits testés inhibent le blanchissement du β -carotène à différentes valeurs par le piégeage des radicaux libre. Le 5-HMAP présente l'activité inhibitrice la plus élevée de 88,30% et la plus proche des standards, BHT 91.67% et BHA 96.09 % suivie de celle de 4-HMAP avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 64.10 % et de 29.12% pour le 5-HNAP à la même concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$.

On peut donc résumer l'ordre décroissant du pouvoir inhibiteur de blanchiment des molécules synthétisées par la séquence suivante :



Pour comparer l'efficacité inhibitrice des produits synthétisés avec celle des standards (BHT et BHA), les IC_{50} sont calculés et représentés par la figure IV 14, signalons que plus la valeur est petite, plus l'activité antioxydante à piéger les radicaux libres formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique est élevée.

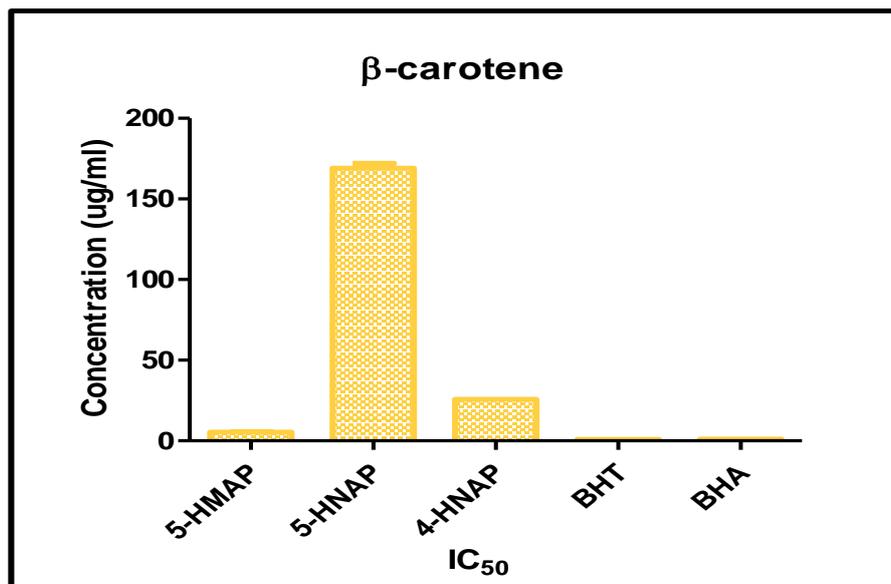


Figure IV 14 : Histogramme de la comparaison des concentrations inhibitrices IC₅₀ (µg/mL) des molécules synthétisées, déterminées par la méthode de blanchissement de β-carotène

Les résultats obtenus pour cette activité sont en accord avec les observations tirées de la lecture des plaques de dosage de l'activité inhibitrice de peroxydation des lipides (Figure 6 annexe 4).

On remarque que le 5-HMAP est le meilleur piègeur des radicaux libres comparé à ses homologues 4-HNAP et 5-HNAP. Sa concentration IC₅₀ égale à 5.43 µg/ml suivi par le 4-HNAP (25.69 µg/ml). Concernant le 5-HNAP, l'IC₅₀ obtenue est de l'ordre de 169.05 µg/ml. Cette activité reste toujours inférieure aux 5-HMAP et 4-HNAP, il présente alors une activité lipidique faible dans la cinétique de blanchissement de β-carotène, ceci probablement expliqué par la grande spécificité de ce test pour les composés apolaires donc lipophiles [30].

Des études récentes ont mis en évidence que la polarité des agents antioxydants est l'un des facteurs importants dans les systèmes de biomembranes [31]. On peut donc expliquer l'activité de nos produits par le paradoxe des phénomènes polaires comme il est décrit par *Frankel et ses collaborateurs* [32].

Etant donné que le test de blanchissement du β-carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, *Frankel et Meyer* [33], ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et

l'oxydation du β -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

IV.3 Activité anti-enzymatiques

IV.3.1 Activité anticholinestérase

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative du système nerveux central qui se développe progressivement, la mort des neurones au cours de la progression de cette maladie affecte généralement les niveaux de neurotransmetteurs du cerveau (l'ACh, le glutamate et la sérotonine) [34].

Actuellement, le seul traitement pour cette maladie est l'usage des inhibiteurs de cholinestérase (ChE) (l'acétyl-butyrylcholinestérase) [35], la majorité de ces inhibiteurs présentent une efficacité limitée, des problèmes de biodisponibilité et certains effets secondaires (troubles gastro-intestinaux, nausées, vomissements et diarrhées) [36].

De plus, plusieurs études démontrent que le stress oxydatif est intimement impliqué dans les maladies neurodégénératives liées à l'âge. En effet ces études ont examiné les avantages des antioxydants pour réduire ou bloquer la mort des neurones survenant dans la physiopathologie de ces troubles.

Etant donné que nos dérivés α -aminophosphonates ont des effets inhibiteurs prometteurs de stress oxydant et basant sur des recherches antérieures menées sur les α -aminophosphonates qui ont montré une forte inhibition de l'AChE et BChE [37–39], le 5-HMAP, le 5-HNAP et le 4-HNAP ont été évalués pour leur capacité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE). La galanthamine a été utilisée comme contrôle positif

La *galantamine* est largement utilisée comme une substance de référence dans les tests in vitro du fait de son fort pouvoir inhibiteur de l'AChE [40]. Aujourd'hui, elle est autorisée dans plusieurs pays Européens comme un des traitements de la MA à des stades avancés [41].

Dans cette étude, L'activité enzymatique est déterminée par la couleur jaune formée après réaction de la thiocoline avec l'ion dithiobisnitrobenzoat [42]. La diminution de la couleur jaune indique la capacité de l'échantillon testé à devenir un inhibiteur de l'acétyl- et de la butyrylcholinestérase (figure 7 annexe 4).

Les résultats du pouvoir anti-Alzheimer des produits testés sont représentés par les pourcentages d'inhibitions de l'AChE et le BChE pour chaque concentration pour les trois produits et les standards (BHT et BHA) sont regroupés dans les Tableaux IV (8,9).

Tableau IV 8 : Pourcentage d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP ainsi que le standard Galantamine

<i>Le pourcentage d'inhibition de l'Acétylcholinestérase</i>				
<i>C µg/mL</i>	<i>5-HMAP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>4-HNAP</i>	<i>Galant</i>
200	-	59.14±2.96	48.60±0.35	94.77±0.34
100	67.22±0.14	33.77±5.57	39.03±0.04	91.80±0.20
50	38.54±2.44	18.52±4.36	24.54±5.62	85.78±1.63
25	36.97±0.54	8.45±2.65	21.16±2.34	80.69±0.41
12.5	27.93±3.59	NA	16.35±1.96	68.50±0.31
6.25	4.66±1.65	NA	11.51±0.92	43.77±0.00
3.125	NA	NA	8.9±2.27	35.93±2.28
<i>IC₅₀ µg/mL</i>	<i>64.00±1.80</i>	<i>164.73±2.59</i>	<i>200.58±3.92</i>	<i>6.27±1.15</i>

- : Non Mesuré NA : Non Absorbé

Tableau IV 9 : Pourcentage d'inhibition de la butyrylcholinesterase par les molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et le standard Galantamine

<i>Le pourcentage d'inhibition de butylcholinesterase</i>				
<i>C µg/mL</i>	<i>5-HMAP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>4-HNAP</i>	<i>Galant</i>
200	-	64.77±0.56	Sat	78.95±0.58
100	sat	44.65±1.54	91.77±2.42	73.57±0.77
50	90,2±32,78	26.30±0.42	55.88±1.85	63.87±2.85
25	86,89±0,57	18.55±2.10	35.39±2.28	45.13±2.60
12.5	83.93±1.15	2.79±3.90	16.62±1.68	24.03±2.94
6.25	70.85±0.29	NA	2.96±1.68	3.99±5.85
3.125	60.25± 1.14	NA	NA	3.26±0.62
1.52	51.47±3.73	-	-	-
0.78	43.93±2.42	-	-	-
0.39	31.76±1.17	-	-	-
<i>IC₅₀ µg/mL</i>	<i>1.52±0.32</i>	<i>135.80±074</i>	<i>43.60±1.66</i>	<i>34.75±1.99</i>

NA : Non Absorbé ; - : non mesuré ; **galant** : galantamine

Les résultats obtenus, permettent de tracer les courbes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des molécules synthétisés ainsi que celle de galantamine $I\% = f(C)$

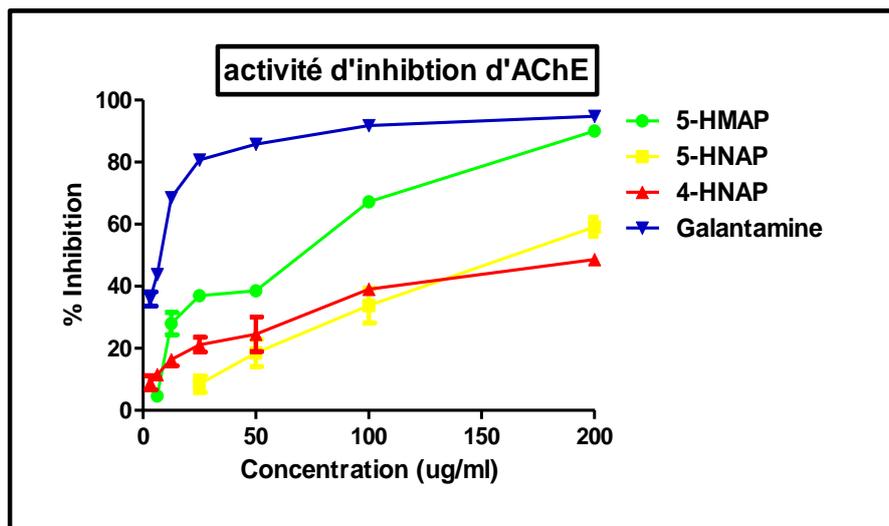


Figure IV 15 : Pourcentages d'inhibition de l'activité d'acétylcholinestérase par les α -aminophosphonates synthétisés 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et le standard Galantamine

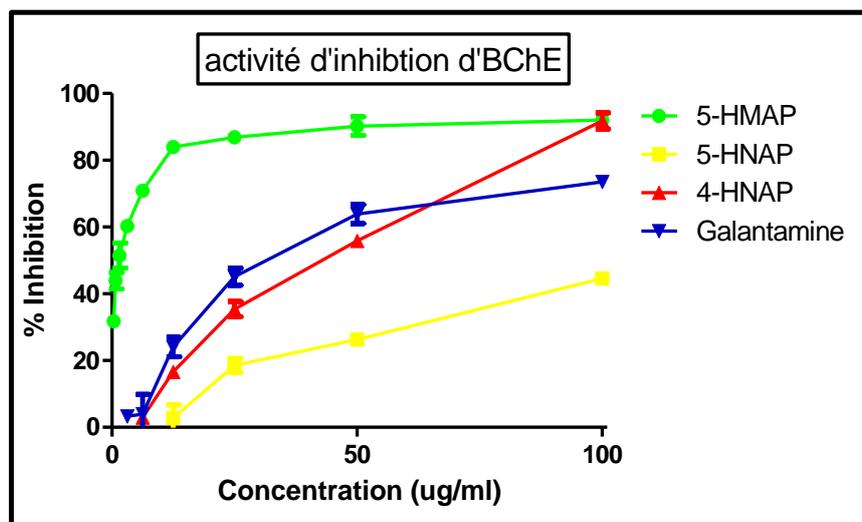


Figure IV 16 : Pourcentages d'inhibition de l'activité de butyrylcholinestérase par les α -aminophosphonates synthétisés 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et le standard Galantamine

Tous les échantillons testés montrent une certaine activité inhibitrice vis à vis de l'acétylcholinestérase (figure IV 15) et de la butyrylcholinestérase (figure IV 16) de manière dose-dépendante.

Vinutha et ses collaborateurs [43], classent l'efficacité de l'inhibition de l'AChE % par les molécules testées comme suit:

- Puissant : le produit provoque une inhibition plus de 50 %.
- Modérée : le produit provoque une inhibition de 30 à 50 %.
- Faible : le produit provoque une inhibition moins de 30%.

Selon cette classification nous remarquons que le 5-HMAP et la Galantamine ont une activité puissante à la concentration 100 µg/mL alors que le 5-HNAP et le 4-HNAP ont une activité inhibitrice modérée de l'AChE à la même concentration. Nous remarquons également le même résultat pour le BChE à cette concentration, où le 5-HMAP et la Galantamine ont une activité puissante, tandis que le 5-HNAP et le 4-HNAP ont une activité modérée.

La meilleure activité inhibitrice de l'AChE a été obtenue avec la molécule 5-HMAP, qui présentait une IC_{50} = 64.00 µg/mL étant 2.5 fois plus importante que celle de 5-HNAP avec une IC_{50} de 164.73 µg/mL. Le 4-HNAP s'est révélé l'échantillon le moins actif avec une IC_{50} de 200.58 µg/mL.

Parmi tous les composés testés, l'activité la plus importante de BChE a été enregistrée pour le 5-HMAP qui a montré une activité anti-BChE d' IC_{50} = 1.52 µg/mL, elle est 22.5 fois plus importante que celle du médicament standard, la *Galantamine*, avec une valeur IC_{50} de l'ordre de 34.75 µg/mL, suivi par le 4-HNAP qui présente une activité anti-BChE comparable à celle du Galantamine. L'activité inhibitrice BChE est observée pour la molécule 5-HNAP avec une IC_{50} de l'ordre de 135.80 µg/mL.

5-HMAP a montré des meilleures activités que les autres molécules. La présence d'une molécule électrodonneur CH_3 représente une meilleure activité AChE et BChE que celle d'électroattracteur comme dans notre cas le NO_2 .

Le groupement CH_3 en position méta sur le noyau phénol des α -aminophosphonates pourrait être le motif responsable de l'activité anticholinestérase élevée du produit 5-HMAP par rapport à ses analogues 5-HNAP et 4-HNAP.

IV.3.2 L'activité antidiabétique (anti-amylase)

L'amylase de mammifère, sécrétée par la glande pancréatique et de la salive comme étant une enzyme glycolytique à travers le suc pancréatique dans l'intestin, est l'enzyme clé qui catalyse la première étape du processus digestif des hydrates de carbone (glucides).

L'inhibition de cette enzyme conduit à la diminution de la quantité du glucose libéré et par conséquent la diminution de la quantité absorbée ce qui empêche l'augmentation de la

glycémie [44]. L'inhibition de l' α -amylase est un des moyens utilisés dans le traitement du diabète du type 2.

Nous avons choisi l'amidon comme substrat, essentiellement en raison de sa disponibilité, son faible coût, et la commodité de réaliser le dosage par les méthodes photométriques.

L'inhibition de l' α -amylase par les α -aminophosphonates synthétisés et le standard *Acarbose* est évaluée et les résultats sont regroupés dans le tableau IV 10 et la figure IV 17.

Tableau IV 10 : L'inhibition de α -amylase (activité antidiabétique) par les α -aminophosphonates synthétisés 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et le standard acarbose

	<i>Le pourcentage d'inhibition de α-amylase</i>			
<i>Concentration</i> <i>$\mu\text{g/ml}$</i>	<i>5-HMAP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>4-HNAP</i>	<i>acarbose</i>
400	Sat	73.53 \pm 3.01	-	53.05 \pm 1.59
200	Sat	30.49 \pm 0.86	50.73 \pm 0.00	37.21 \pm 3.54
100	82.17 \pm 0.00	27.18 \pm 0.00	38.14 \pm 2.36	31.81 \pm 2.89
50	69.60 \pm 2.83	26.27 \pm 0.00	30.73 \pm 0.00	10.70 \pm 0.96
25	49.08 \pm 0.00	25.86 \pm 0.00	30.57 \pm 0.00	9.46 \pm 0.11
12.5	48.44 \pm 0.11	25.61 \pm 0.00	29.99 \pm 0.00	8.08 \pm 0.30
6.25	44.79 \pm 0.17	22.47 \pm 0.00	29.33 \pm 0.00	7.76 \pm 0.17
<i>IC₅₀ $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>19.71\pm0.41</i>	<i>272.19\pm8.26</i>	<i>193.21\pm4.01</i>	<i>365.09\pm1.07</i>

Sat : saturé ; - : non mesuré

L'ensemble des résultats obtenus montrent que les esters α -aminophosphonates synthétisés exercent un fort effet inhibiteur sur l'activité de l' α -amylase. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition qui varie d'un produit à un autre en fonction de sa concentration. On remarque que chaque produit présente des pourcentages progressifs qui augmentent en fonction de l'augmentation de concentration dans le milieu réactionnel. (Figure IV 17).

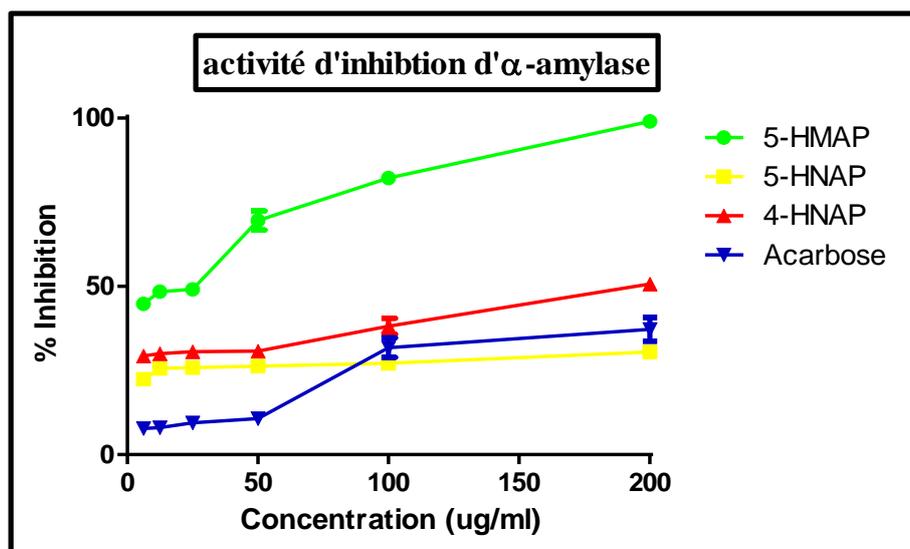


Figure IV 17 : L'inhibition de α -amylase (activité antidiabétique) par les aminophosphonates 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP synthétisés et le standard acarbose.

Ces résultats montrent que la molécule 5-HMAP présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé, environ 82.17%, à la concentration (100 $\mu\text{g/mL}$), ce taux d'inhibition est meilleur que celui du standard « acarbose », 31.81%, en même temps on constate que l'activité des molécules 5-HNAP 27.18% et 4-HNAP 38.14% est excellente et comparable à celle de médicament standard.

De plus, la concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique (IC_{50}) est calculée et mentionnée dans la figure IV 18.

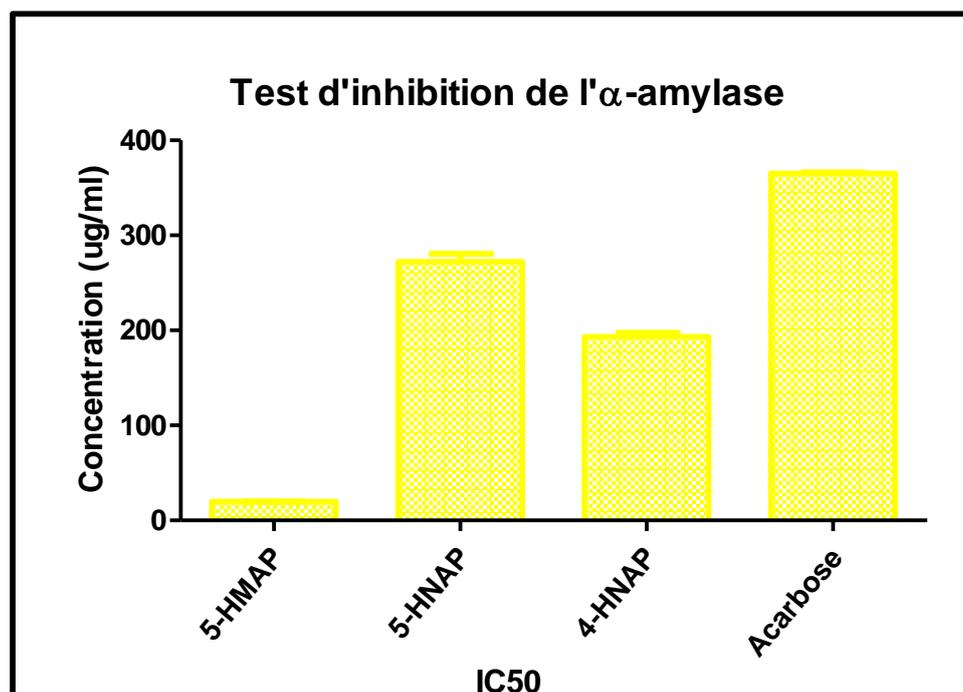


Figure IV 18 : Taux d'inhibition de l'enzyme α -amylase IC_{50} par les molécules 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP et le standard Acarbose exprimé en concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Les résultats trouvés, montrent une forte activité inhibitrice pour les produits synthétisés (5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP) avec une faible valeur IC_{50} ($19.71\mu\text{g/ml}$, $272.19\mu\text{g/ml}$ et $193.21\mu\text{g/ml}$, respectivement) comparé avec celle du standard utilisé, l'acarbose ($IC_{50} = 365.93 \mu\text{g/ml}$).

IV.3.3 Evaluation de l'activité anti-uréase

L'infection chronique par *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) est directement responsable des maladies gastro-intestinales, en particulier la gastrite, l'ulcère duodéal et peptique, et le cancer de l'estomac. *H. pyloi* produit l'uréase qui est une enzyme très active capable d'hydrolyser l'urée normalement présente dans l'estomac en libérant de l'ammoniaque qui neutralise le microenvironnement de la bactérie, ce qui rendra le milieu plus accueillant à cette bactérie [45,46]. À cet égard, les dérivés α -aminophosphonates synthétisés ont été examinés contre l'activité uréase. Les résultats de l'activité inhibitrice de l'uréase par les esters α -aminophosphonates synthétisés et par le standard *Thiourea* sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV 11 : L'inhibition d'uréase par les α - aminophosphonates 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP synthétisés et le standard acarbose

<i>Le pourcentage d'inhibition de l'uréase</i>				
<i>Concentration $\mu\text{g/mL}$</i>	<i>5-HMAP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>4-HNAP</i>	<i>Thiourea</i>
200	5,76 \pm 1,63	6,92 \pm 0,80	25,12 \pm 0,00	98,90 \pm 0,05
100	3,26 \pm 3,07	4,85 \pm 1,58	21,02 \pm 2,52	98,49 \pm 0,41
50	3,22 \pm 3,38	4,60 \pm 0,57	19,91 \pm 2,83	98,42 \pm 0,19
25	3,13 \pm 1,46	NA	16,89 \pm 7,31	94,17 \pm 0,15
12.5	NA	NA	12,36 \pm 4,15	55,64 \pm 4,24
6.25	-	NA	-	19,85 \pm 2,74
3.125	-	-	-	4,49 \pm 0,78
IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	ND	ND	ND	11.57\pm0.68

NA : Non Absorbé ; - : Non Mesuré ; ND : Non Défini

Nous remarquons d'après ces résultats, que les produits synthétisés ainsi que le standard Thiourea présentent une activité anti-uréase dose dépendante, c'est-à-dire que plus la dose des échantillons augmente plus l'activité inhibitrice de l'uréase augmente.

Le pourcentage d'inhibition était maximal à une concentration de 200 $\mu\text{g/mL}$ avec le tau suivant le 5-HMAP 5,76%, le 5-HNAP 6,92 % et le 4-HNAP 25,12%. Une activité inhibitrice minimale de 3,13% pour le 5-HMAP a été notée à la concentration minimale absorbée de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ et 4.60 % pour le produit 5-HNAP à la concentration minimale absorbée de 100 $\mu\text{g/mL}$. Ces valeurs sont clairement inférieures à celles du standard Thiourea qu'atteint une activité inhibitrice presque totale à une concentration 200 $\mu\text{g/mL}$ (98,90%). De ces résultats on peut observer que les esters α -aminophosphonates ont une très faible capacité inhibitrice contre l'enzyme uréase (voire la figure 8 annexe 4), et très inférieures à celle de médicament standard Thiourea.

IV.4 Inhibition de la dénaturation des protéines

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire, cela se produit généralement lorsque les protéines sont exposées à un stress externe comme un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou une chaleur [47], et par conséquent perdent leurs fonctions biologiques. Il est bien connu que la dénaturation des protéines tissulaires est l'une des causes de l'inflammation [48,49].

En effet, il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibent la dénaturation des protéines, ainsi, tout produit qui empêche la dénaturation des protéines peut être un anti inflammatoire. Pour cette raison, l'effet anti-inflammatoire de nos produits a été évalué par la méthode de dénaturation de la BSA et les résultats ont été comparés à ceux de l'ibuprofène comme médicament standard (Tableau IV 12).

Tableau IV 12: *Activité anti-inflammatoire des molécules 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP et de l'ibuprofène exprimée en pourcentage (%)*

<i>Molécule</i>	<i>Activité anti-inflammatoire (%) à 72°C</i>			
	<i>1000</i>	<i>500</i>	<i>250</i>	<i>125</i>
<i>C (µg/mL)</i>				
<i>5-HMAP</i>	96.11±2.67	74.81±1.37	56.78±0.71	14.68±2.48
<i>5-HNAP</i>	Très sat	sat	69.68±0.48	29.89±0.77
<i>4-HMAP</i>	4.07±0.20	Na	na	na
<i>ibuprofène</i>	100±0.3	100±0.1	92±0.2	61±0.2

sat : saturé, NA : non absorbé

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine est calculé en utilisant la formule

$$I \% = \frac{T_{\text{test}} - T_{\text{contrôle}}}{T_{\text{test}}} \times 100 \quad [IV.2]$$

L'effet inhibiteur des molécules synthétisées et de l'ibuprofène sur la dénaturation des protéines, a été exprimé en pourcentage et présenté graphiquement sur la figure IV 19.

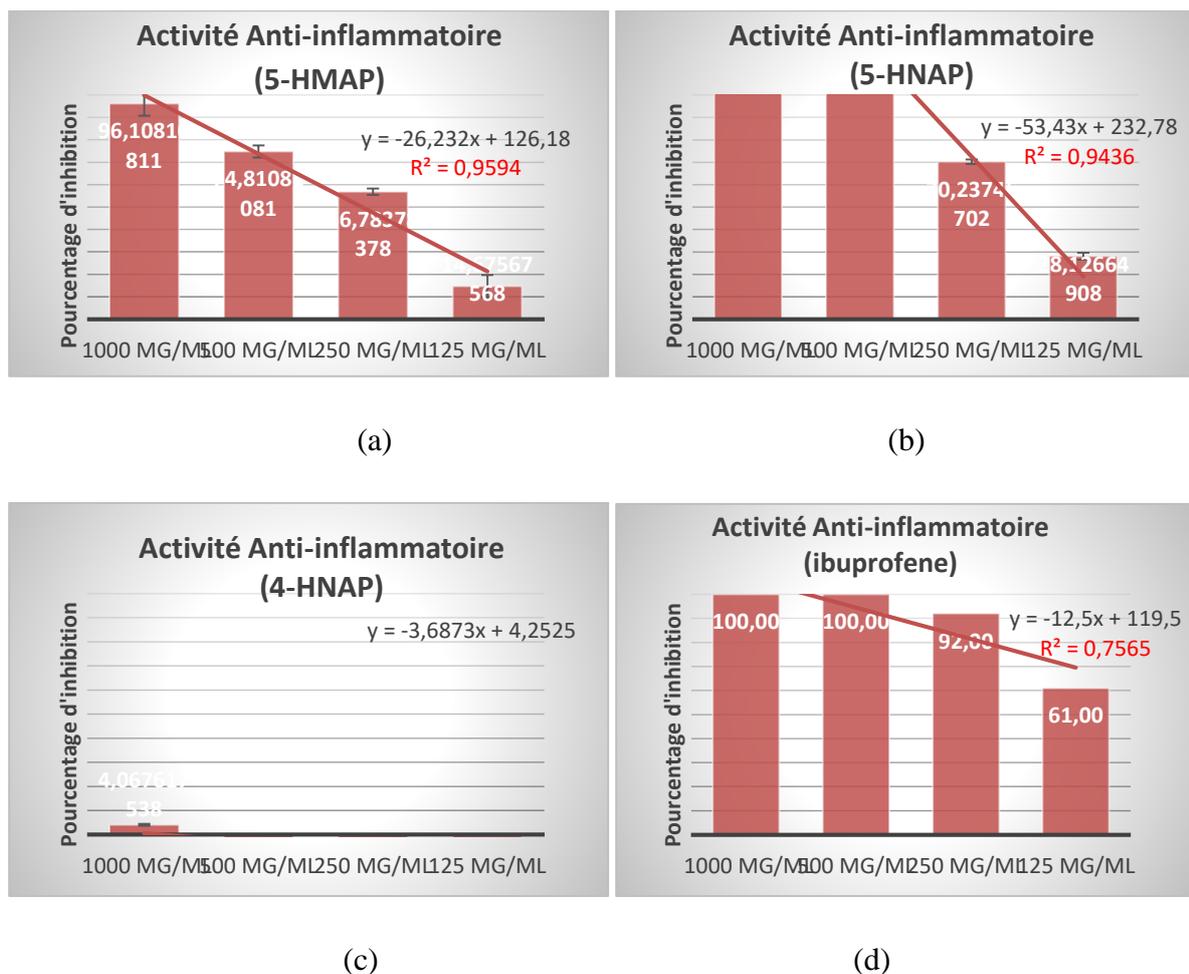


Figure IV 19 : Histogrammes du pourcentage de l'activité anti-inflammatoire de: (a) 5-HMAP, (b) 5-HNAP, (c) 4-HNAP et (d) ibuprofène en fonction de la concentration C à $T = 72^{\circ}\text{C}$

Toutes les molécules synthétisées et le médicament standard empêchent la dénaturation de l'albumine de sérum bovin d'une manière dose-dépendante, à part le 4-HNAP qui présente une activité inhibitrice très faible sur la dénaturation des protéines. L'ibuprofène en tant que médicament anti-inflammatoire standard atteint son inhibition maximale (100 %) à la concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$. Dans les mêmes conditions, le pourcentage maximal d'effet inhibiteur des molécules synthétisées, est observé pour la molécule 5-HNAP (très saturée), suivi par la molécule 5-HMAP (96.11%) alors que le taux d'inhibition de la molécule 4-HNAP est de l'ordre de (4.07%).

Nous constatons que la molécule 5-HNAP a une activité anti-inflammatoire nettement plus élevée que celle du médicament standard. Ces résultats reflètent le rôle crucial du substituant

NO₂ en position *méta*-aminophénol sur le noyau phénol des aminophosphonates dans le renforcement de l'activité antiinflammatoire.

Les molécules α -aminophosphonates substituées en position *méta*, le 5-HNAP et le 5-HMAP soit par le groupement électroattracteur NO₂ ou le groupement électrodonneur CH₃, possèdent une activité meilleure que celle de la molécule substituée en position para 4-HNAP par NO₂, ceci peut être expliqué par la possibilité de formation de liaisons hydrogènes sur les structures substituées en position *méta*, notons que le groupement NO₂ favorise nettement l'activité antiinflammatoire de la structure *méta*-nitroaminophénol par rapport à la structure *méta*-methylaminophénol.

A la lumière de ces résultats, l'ordre décroissant du pouvoir inhibiteur de la dénaturation protéique des molécules testées peut être présenté par la séquence :



Plusieurs chercheurs ont montré que les agents pouvant empêcher la dénaturation des protéines, seront de bons candidats pour le développement de nouvelles molécules antiinflammatoires [50,51]. D'après les résultats de l'activité antiinflammatoire, on peut supposer que les molécules 5-HNAP et 5-HMAP ont pu contrôler la production d'auto-antigènes en inhibant la dénaturation des protéines.

IV.5 Essai de l'activité hémolytique *in-vitro* des α -aminophosphonates

L'administration prolongée des molécules bioactives à des doses élevées ou faibles, provoque des effets nocifs ou toxiques, pour cela la toxicité des molécules bioactives doit être évaluée pour déterminer la dose létale 50 (DL50) avant tout usage. Ainsi l'utilisation des médicaments pourrait affecter les membranes des cellules, spécialement les érythrocytes, induisant l'anémie hémolytique, ce qui nécessite une évaluation de leur activité hémolytique avant leur administration. Et même si des effets toxiques ou hémolytiques sont détectés ceci indique la probabilité de ces médicaments à exprimer des propriétés cytotoxiques et lytiques.

Afin d'étudier la cytotoxicité des molécules synthétisées sur des érythrocytes humains (*globule rouge humains O+ ou GRH*), nous avons réalisé un test de cytotoxicité *in vitro* selon le protocole expérimental décrit dans les travaux de *Malagoli* [52], dans lequel on a passé par deux étapes, dans la première étape on a mis les GRH en contact avec les esters α -aminophosphonates synthétisés 5-HMAP, 5-HMAP et 4-HNAP à différentes concentrations

(0.25 mg/ml, 0.50 mg/ml, 1 mg/ml et 2 mg/ml), comparés à un contrôle positif et à un contrôle négatif qui contiennent respectivement de (globules rouges+ H₂O) et (NaCl 0.9%+ globules rouges) pendant 30 min dans un milieu isotonique (NaCl 9%), en mesurant le pourcentage d'hémolyse à partir des absorbances obtenues par spectrophotomètre.

Les résultats obtenus pour cette étape sont présentés dans figures IV 20. Ensuite, le taux d'hémolyse induite par les trois molécules est calculé en utilisant la formule [IV.3] :

$$\% \text{ hémolysé} = \frac{A_t}{A_{cp}} \times 100 \quad [IV.3]$$

Tableau IV 13 : Évolution du taux d'hémolyse mesurée en fonction de la concentration des esters α -aminophosphonates synthétisés

<i>Produit</i>	<i>hémolyse (%)</i>				
<i>C (µg/mL)</i>	<i>0.0625</i>	<i>0.125</i>	<i>0.25</i>	<i>0.5</i>	<i>1</i>
<i>5-HMAP</i>	2.49±0.00	2.81±0,16	2.90±0,06	2.97±0.12	3.25±0.27
<i>5-HNAP</i>	2.57±0.03	4.03±0.91	4.29±0.85	4.97±0.19	9.52±0.78
<i>4-HNAP</i>	2.94±0.36	4.07±0.12	5.03±0.32	6.54±0.31	8.81±2.53
<i>H₂O</i>	<i>100</i>				

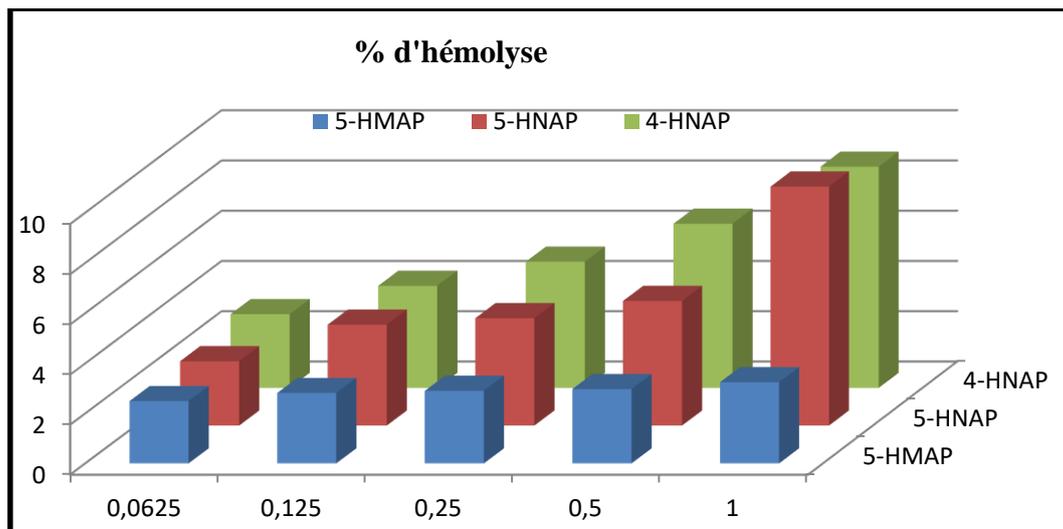


Figure IV 20 : Évolution du taux d'hémolyse dans des tubes contient une suspension érythrocytaire en présence des esters α -aminophosphonates synthétisés.

D'après la figure IV 20, nous pouvons constater que l'activité hémolytique des molécules synthétisées augmente de la manière dose-dépendante, mais toutes les molécules ont un effet hémolytique faible sur les globules rouges humains. Pour toutes les concentrations testées, les pourcentages d'hémolyse sont compris entre 9.52% et 3.25%.

L'effet hémolytique des différentes molécules testées, après 30 minutes de contact avec les érythrocytes humains à la concentration de 1 mg/ml, peut classer selon la séquence :

$$5\text{-HNAP} > 4\text{-HNAP} > 5\text{-HMAP}$$

D'après nos résultats, il apparaît que les dérivés α -aminophosphonate à base des aminophenols ont un effet hémolytique très faible face à des érythrocytes humains isolés, avec un taux d'hémolyse qui ne dépasse pas 09 % à une concentration de 1 mg/ml. Cette absence de l'effet hémolytique observé au niveau de nos produits est probablement liée à la nature des composés apolaires. *Takebayashi et al*, est déjà signalée l'intervention des molécules apolaires dans la protection des globules rouges [53].

Malakyanet et al ont réalisé une étude de l'activité antihémolytique par un dommage oxydatif des membranes des érythrocytes [54], ils ont montré que lorsque ces dérivés sont capables de piéger des radicaux libres, ils peuvent stopper ou empêcher l'hémolyse des érythrocytes en neutralisant les espèces réactives d'oxygène provenant des irradiations X et du peroxyde d'hydrogène, et de ce fait, ces molécules peuvent être des puissants agents radioprotecteurs.

En conclusion, on peut constater que ces molécules ne présentent presque aucun risque de cytotoxicité et par conséquent, elles peuvent trouver des applications dans le domaine pharmacologique et biologique.

IV.6 L'activité de protection solaire SPF

L'exposition aux rayons du soleil peut entraîner des dommages cutanés, notamment les coups de soleil, le cancer de la peau, les dommages oxydatifs des cellules de la peau et la photo-vieillesse. Le facteur de protection solaire (SPF) est une mesure quantitative reflète principalement la protection contre les UVB [55,56]. Cela aide à évaluer la capacité probable d'un écran solaire à bloquer le rayonnement UVB.

Celui-ci est mesuré au laboratoire et déterminé par des tests standardisés. Cet indice représente la protection effective de la peau contre l'érythème solaire :

FPS = dose capable de provoquer un érythème sur la peau protégée/dose capable de provoquer un érythème sur la peau non protégée.

L'érythème solaire est une inflammation de la peau provoquée notamment par les UVB ; et peu par les UVA.

Différentes méthodes ont été élaborées mais la méthode COLIPA (le Comité de Liaison de la Parfumerie) proposée par l'industrie cosmétique européenne, en 1994, offre une meilleure standardisation de la source lumineuse et de la technique d'application de la crème solaire. La crème est utilisée à la dose de 2 mg/cm². Par exemple, un produit de FPS 15 implique que l'on peut s'exposer au soleil sans brûler 15 fois plus longtemps que sans protection. Ainsi, plus l'indice est élevé, meilleure est la protection.

Le FPS est généralement divisé en quatre catégories : une faible protection (la valeur du FPS entre 2 et 15), une moyenne protection (la valeur du FPS entre 15 et 30), haute protection (la valeur du FPS entre 30 et 50) et très haute protection (la valeur du FPS est plus de 50) [57].

Dans notre étude, le FPS des molécules synthétisés 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP a été évalué *in vitro* par spectrophotométrie UV en appliquant l'équation mathématique de Mansur et al [58].

$$\text{SPF spectrophotometric} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad [\text{IV.4}]$$

Les valeurs du facteur de protection UV des 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP sont regroupées dans le tableau IV 14.

Tableau IV 14 : Les valeurs du facteur de protection solaire des dérivés 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP

<i>Produit</i>	<i>Référence 1</i>	<i>5-HMAP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>4-HNAP</i>
<i>SPF</i>	<i>44.22±0.35</i>	<i>46.88±0.48</i>	<i>47.50±0.00</i>	<i>47.50±0.00</i>

Les résultats de l'étude du facteur de protection solaire indiquent que les molécules α -aminophosphonates synthétisées, sont des bons protecteurs contre les rayonnements solaires, ils appartenant à la catégorie des produits de haute protection solaire vu que la valeur du FPS est comprise entre 30 et 50), et ils ont une protection meilleure que celle de la référence utilisée, Tableau IV 15.

De plus, il est à noter qu'il existe une relation inversement proportionnelle entre le % d'UV non arrêtés et le FPS (Tableau IV.15).

Tableau IV 15: la relation entre la % d'UV non arrêtés et le FPS

<i>Valeur de l'indice FPS</i>	<i>% d'UV non arrêtés</i>	<i>% d'UV arrêtés</i>
<i>6</i>	<i>1/6 soit 16%</i>	<i>83%</i>
<i>10</i>	<i>1/10 soit 10%</i>	<i>90%</i>
<i>15</i>	<i>1/15 soit 6%</i>	<i>94%</i>
<i>20</i>	<i>1/20 soit 5%</i>	<i>95%</i>
<i>25</i>	<i>1/25 soit 4%</i>	<i>96%</i>
<i>30</i>	<i>1/30 soit 3%</i>	<i>97%</i>
<i>50</i>	<i>1/50 soit 2%</i>	<i>98%</i>
<i>50+</i>	<i>1/50+ soit + 2%</i>	<i>+ 98%</i>

La comparaison des valeurs FPS des produits synthétisés avec celles indiquées dans le tableau IV 15, montre que les α -aminophosphonates synthétisés peuvent bloquer plus de 97% des

rayonnements UV. Cette haute protection peut être due aux hétéroatomes P, N et O et le cycle phénolique de la structure des trois molécules. En plus, la propriété antioxydante de nos molécules potentialise encore la protection UV en modulant la réponse cellulaire et en piégeant les espèces radicalaires oxygénées.

Ces résultats montrent que ces produits peuvent être utilisés dans les formulations de la protection solaire.

Il convient de souligner que l'étude de l'activité anti-UV des composés α -aminophosphonates n'a été précédée par aucun chercheur, c'est la première qu'a été menée sur cette activité, ce qui ouvre des perspectives prometteuses dans des applications médicales, fortement demandées dans la protection contre les rayonnements solaires et le traitement de différents types de brûlures.

IV.7 Evaluation des propriétés antimicrobiennes

IV.7.1 Antibiogramme

Pour surmonter le problème de résistance des microorganismes vis-à-vis des antibiotiques, la plupart des travaux sont orientés actuellement vers d'autres agents antimicrobiens possédant un mode d'action tout à fait spécifique.

Les composés α -aminophosphonates et leurs acides α -aminophosphoniques ont été l'objet de ces études biologiques, en raison de leurs propriétés pharmacologiques intéressantes [59,60].

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée dans un premier temps par la technique de diffusion en puits sur milieu Mueller-Hinton gélosé contre des bactéries de référence Gram-positives et Gram-négatives (antibiogramme). C'est une technique qualitative, utilisée pour le criblage des activités antimicrobiennes des produits testés, il nous permet de sélectionner pour chaque souche le produit qui a présenté le plus d'activité antimicrobienne par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des puits.

Le test de sensibilité antibiogramme est avant tout un outil de décision thérapeutique en classant les bactéries : sensibles, intermédiaires ou résistantes [61]. Les résultats ont été comparés avec le DMSO utilisés comme contrôle négatif et l'antibiotique standard (gentamicines) (GEN 10 μ g) qui a été utilisés comme contrôle positif, ce choix est dû à la sensibilité des souches choisies pour cet antibiotique et en raison de leur spectre d'action

assez large et de leur utilisation fréquente en milieu hospitalier pour le traitement des infections causées par la plupart des germes de notre étude, et selon aussi leur disponibilité.

D'après *Ponce et al* [62] et *Moreira et al* [63], le diamètre de la zone d'inhibition renseigne sur la sensibilité d'une bactérie donnée :

- Résistante : DZI < 8mm.
- Sensible : DZI = 9-14 mm.
- Très sensible : DZI = 15-19 mm.
- Extrêmement sensible : DZI > 20 mm.

L'interprétation de nos résultats est basée sur la comparaison entre les résultats des tests effectués avec ceux donnés par l'échelle, considérée comme témoin comparatif.

Les diamètres des zones d'inhibitions des esters α -aminophosphonates testés vis-à-vis des souches bactériennes (*Gram+* et *Gram-*) sont regroupés dans le tableau IV 16, et présentés graphiquement sous forme d'histogramme, figure IV 21.

Tableau IV 16 : Diamètres de zones d'inhibition (mm) de 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP pour une concentration de 100mg/ml et du contrôle positif gent 10 μ g

Souches Microbiennes	Zones d'inhibition (mm)				
	5-HMAP	5-HNAP	4-HNAP	Gent10	Control(-)
<i>Pseudomonas</i> <i>aéruiginosa</i> (N° ATCC 27853) G-	15.00±0.71	R	10.00±0.00	12	R
<i>Escherichia coli</i> (N°ATCC 8739) G-	24.00±0.00	7.00±0.00	16.50±0.71	22	R
<i>Bacillus subtilis</i> (N° ATCC 6633) G+	19.50±0.71	7.00±0.00	9.00±1.41	22	R
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (N°ATCC 6538) G+	14.00±0.00	R	R	32	R

G+ : Gram Positif ; G- : Gram Négatif ; R : résistant

A la lumière des résultats obtenus, il est clair que les esters α -aminophosphonates présentent une inhibition de la croissance bactérienne contre au moins deux souches. Ces résultats montrent une grande hétérogénéité du comportement des souches bactériennes qui, en effet réagissent différemment vis-à-vis les produits testés, ce qui rend l'interprétation difficile. Néanmoins, toutes les souches ont présenté une certaine sensibilité aux molécules synthétisées avec des diamètres compris entre 07 et 24 mm.

Le DMSO n'a eu aucun effet sur les bactéries dans les concentrations étudiées. Alor que toutes les molécules ont réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées ce qui confirme que les molécules synthétisées sont douées de propriétés antimicrobiennes.

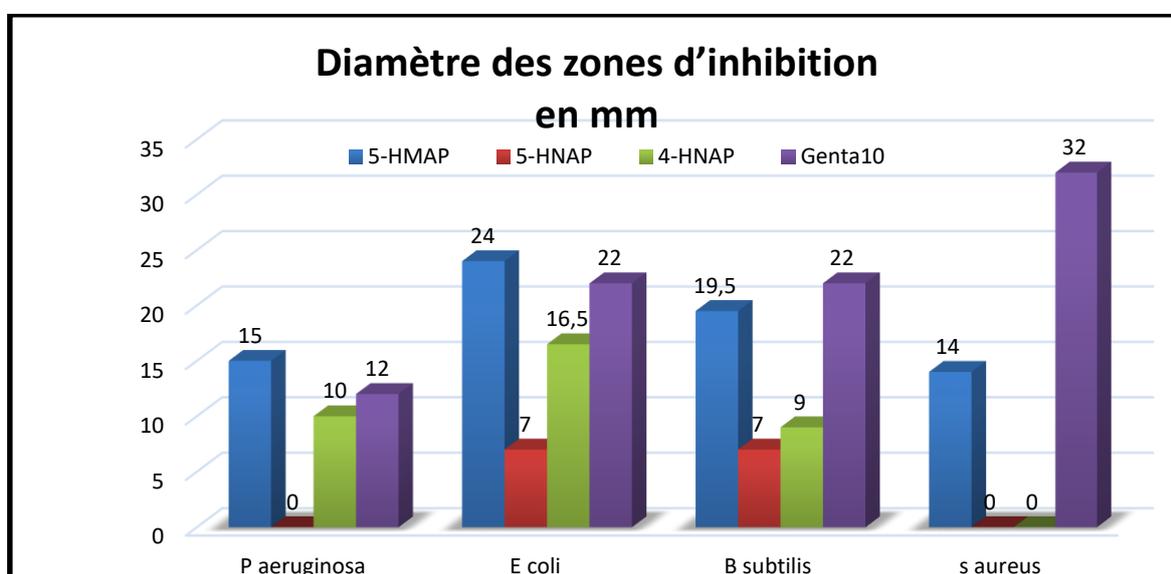


Figure IV 21: Histogrammes de comparaison des zones d'inhibition avec une concentration de 100 mg/ml en composés 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP

- Le 5-HMAP donne le meilleur résultat sur *Escherichia coli* avec un diamètre élevé de la zone d'inhibition (24mm) à 100mg/ml. Il exerce une action inhibitrice élevée sur *Bacillus subtilis* (19.50mm) par rapport à celle constatée sur *Pseudomonas aëruginosa* (15mm) et *Staphylococcus aureus* (14mm) pour la même concentration. Par conséquent Il possède un large spectre d'inhibition puisque son effet inhibiteur couvre les bactéries Gram positif et Gram négatif.

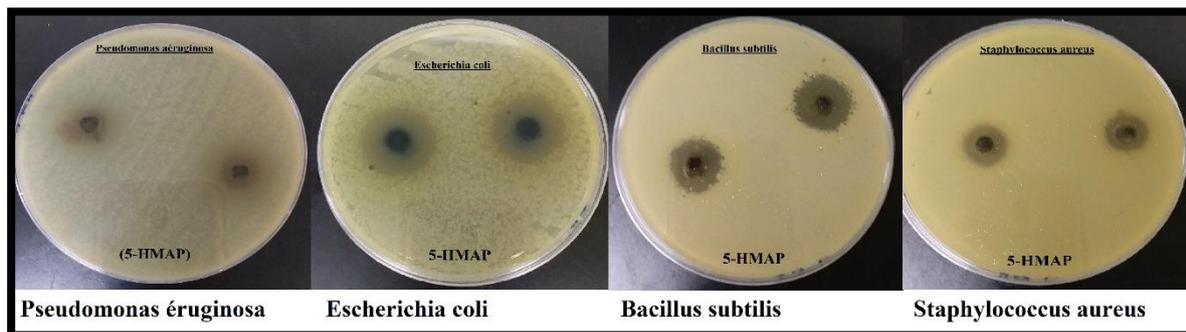


Figure IV 22 : Photos montrant les zones d'inhibitions de la molécule 5-HMAP contre les souches testées (aromatogramme de 5-HMAP)

- Le 4-HNAP agit différemment sur les souches testées. Son action est variable ; elle est nulle sur *Staphylococcus aureus* pour la concentration testée (100mg/ml), faible sur *Pseudomonas aéruginosa* 10.00 et *Bacillus subtilis* 09.00 et intéressante sur *Escherichia coli* également à 100mg/ml (16.50).

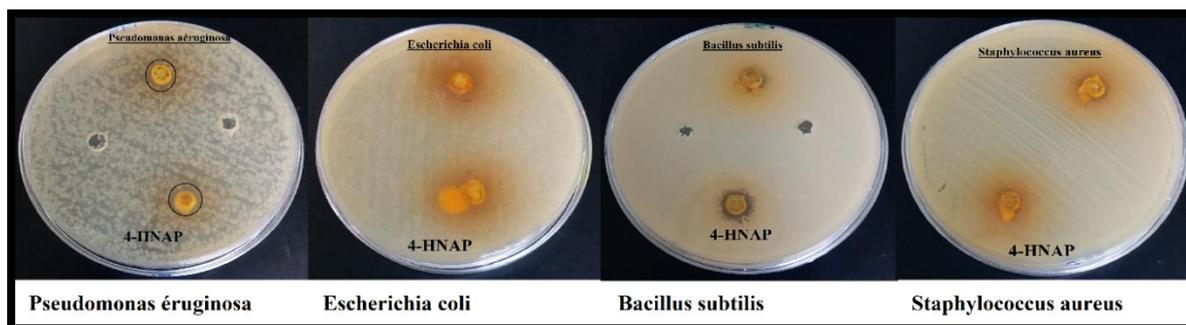


Figure IV 23 : Photos montrant les zones d'inhibitions de la molécule 4-HNAP contre les souches testées (aromatogramme de 4-HNAP)

- Le 5-HNAP est le moins efficace sur les bactéries Gram positifs et Gram négatifs contrairement aux 5-HMAP. Il n'exerce aucune action inhibitrice sur *Pseudomonas aéruginosa* et faible action sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (7.00) et *Bacillus subtilis* (7.00) pour une concentration de 100mg/ml.

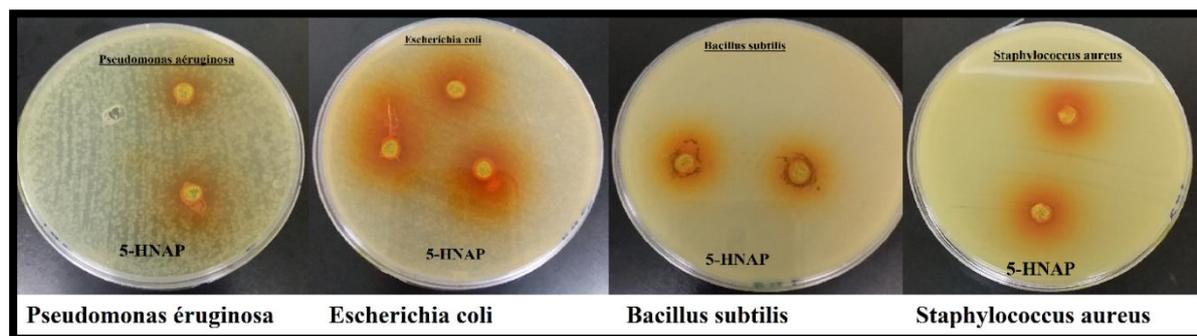


Figure IV 24 : Photos des zones d'inhibitions de la molécule 4-HNAP contre les souches testées (aromatogramme de 4-HNAP)

La souche *Staphylococcus aureus* est la souche qui résiste plus aux molécules 5-HNAP et 4-HNAP, aucune zone d'inhibition produite autour des puits à la présence de ces molécules.

Les résultats des tests expérimentaux montrent que les dérivés α -aminophosphonates inhibent les bactéries Gram négatifs mieux que les Gram positifs. On note que la structure chimique des produits synthétisés influe significativement leur activité biologique qui dépende également des membranes plasmiques des bactéries étudiées.

Le screening des propriétés antibactériennes de gentamicine révèle que cette molécule possède une activité antibactérienne vis-à-vis de l'ensemble des souches testées avec une légère différence de sensibilité entre les bactéries gram+ et gram-. Toutes les souches se sont révélées sensible avec des diamètres variables, le plus grand a été enregistré sur la souche de *Staphylococcus aureus* avec une zone de 32 mm, et le plus petit est de 12 mm enregistré sur celle de *Pseudomonas aeruginosa*.

On peut conclure que la substitution hydrophobe CH_3 favorise considérablement l'activité antibactérienne cependant le groupement hydrophile NO_2 diminue l'action inhibitrice de molécules.

IV.7.2 Paramètres de l'activité antibactérienne

Afin de compléter notre travail, nous avons procédé à la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ainsi que des concentrations minimales bactéricides (CMB) de dérivés α -aminophosphonates synthétisés, ces concentrations sont utilisés dans le but de définir les frontières de l'acceptabilité sensorielle et de l'efficacité antibactérienne de ces molécules [64].

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la concentration la plus petite du produit qui inhibe la croissance des bactéries après l'incubation à 37°C pendant 18 heures [65]. La concentration minimale inhibitrice (CMI) des produits chimiques actifs est obtenue par la méthode de microdilution en série 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32 de la solution mère 100 mg/mL sur les quatre bactériens exemplaires. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues sont regroupées dans le tableau IV 17.

Tableau IV 17 : Les concentrations minimales inhibitrices CMI et bactéricide (CMB) de 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP

<i>Produit</i>	<i>Paramètre de d'activité</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
5-HMAP	CMI	25	0.195	3.125	1.562
	CMB	100	0.195	100	3.125
	CMB /CMI	4	1	4	2
5-HNAP	CMI	-	100	100	-
	CMB	-	100	100	-
	CMB /CMI	-	1	1	-
4-HNAP	CMI	100	25	50	-
	CMB	100	100	100	-
	CMB /CMI	1	4	2	-

Les valeurs de CMI concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition. Lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est grand, la concentration minimale inhibitrice est petite et l'inverse.

Pour les composés synthétisés, les valeurs des CMI se situaient entre 0.195 et 100 mg/ml contre Gram-positives et Gram-négatives, et les MBC, entre 0.195 et 100 mg/ml. En règle générale, les valeurs CMB sont généralement plus élevées que ceux du CMI, suggérant ainsi une meilleure inhibition, l'activité est considérée donc comme bactéricide.

L'activité antibactérienne de 5-HMAP, 4-HNAP et 5-HNAP contre ces bactéries exprimées en CMI indique que les produits synthétisés sont plus efficaces contre les bactéries Gram-négatives à une concentration plus petite que celle utilisée contre les bactéries Gram-positives.

La forte activité antibactérienne de 5-HMAP est confirmée par les plus faibles valeurs de CMI et CMB, observées contre tous les microorganismes testés.

Nous remarquons que le 4-HNAP a montré une forte activité antibactérienne avec une CMI de 25 à 100mg/mL et les valeurs CMB de 100mg/ml. En ce qui concerne le 5-HNAP, les souches *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* ont montré de faibles activité même pour les CMI et les CMB supérieures à 100mg/mL.

Afin d'évaluer l'activité bactéricide ou bactériostatique de nos produits, la concentration minimale bactéricide (CMB) a été déterminée successivement à une CMI, par sous-culture de la suspension bactérienne sur milieu gélosé. L'absence de colonie après 24h d'incubation à 37°C témoigne de l'effet bactéricide du produit ($CMB/CMI \leq 4$). Dans le cas contraire, la molécule possède une activité bactériostatique. La CMB correspond donc à la concentration minimale capable de tuer la totalité des bactéries présentes.

L'activité bactéricide de chaque ester a été testée au moins dans deux expériences distinctes. Les résultats des effets bactéricide et bactériostatique sont donnés dans le Tableau IV 17, selon les valeurs établies, les molécules, 5-HMAP et 4-HNAP sont caractérisées par le rapport $MBC/MIC \leq 4$, ce qui suggère que ces composés agissent comme des agents bactéricides sur les souches.

Références bibliographiques

- [1] J. Tabart, C. Kevers, J. Pincemail, J.-O. Defraigne, J. Dommès, Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests, *Food Chemistry*. 113 (2009) 1226–1233.
- [2] N. Saint-Cricq de Gaulejac, C. Provost, N. Vivas, Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (1999) 425–431.
- [3] H. Li, X. Wang, P. Li, Y. Li, H. Wang, Comparative study of antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) seed powder assessed by different methods, *Journal of Food and Drug Analysis*. 16 (2008) 67–73.
- [4] B. Chawki, Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes du genre *Sedum*, (2017).
- [5] K. Renugadevi, C.V. Nachiyar, P. Sowmiya, S. Sunkar, Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp TRV57, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 16 (2018) 237–242.
- [6] H. Manouze, O. Bouchatta, A.C. Gadhi, M. Bennis, Z. Sokar, S. Ba-M'hamed, Anti-inflammatory, antinociceptive, and antioxidant activities of methanol and aqueous extracts of *Anacyclus pyrethrum* roots, *Frontiers in Pharmacology*. 8 (2017) 598.
- [7] N. Dasgupta, B. De, Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study, *Food Chemistry*. 101 (2007) 471–474.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.003>.
- [8] P. Maisuthisakul, R. Pongsawatmanit, M.H. Gordon, Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw (*Cratoxylum formosum* Dyer), *Food Chemistry*. 100 (2007) 1620–1629.
- [9] L.P. Leong, G. Shui, An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets, *Food Chemistry*. 76 (2002) 69–75.
- [10] I. Gülçin, Antioxidant activity of food constituents: an overview, *Archives of Toxicology*. 86 (2012) 345–391.
- [11] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (1999) 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

- [12] H. Shi, N. Noguchi, E. Niki, Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity, in: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 2001: pp. 157–166.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)35240-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)35240-0).
- [13] S.H. Benabadji, R. Wen, J.B. Zheng, X.C. Dong, S.G. Yuan, Anticarcinogenic and antioxidant activity of diindolylmethane derivatives, *Acta Pharmacologica Sinica*. 25 (2004) 666–671.
- [14] I.C. Ferreira, M.-J.R. Queiroz, M. Vilas-Boas, L.M. Estevinho, A. Begouin, G. Kirsch, Evaluation of the antioxidant properties of diarylamines in the benzo [b] thiophene series by free radical scavenging activity and reducing power, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 16 (2006) 1384–1387.
- [15] S. Arabshahi-Delouee, A. Urooj, Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves, *Food Chemistry*. 102 (2007) 1233–1240.
- [16] C. Sarikurkcu, G. Zengin, M. Oskay, S. Uysal, R. Ceylan, A. Aktumsek, Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils, *Industrial Crops and Products*. 70 (2015) 178–184.
- [17] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S.E. Karademir, Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>.
- [18] M. Özyürek, K. Güçlü, E. Tütem, K.S. Başkan, E. Erçağ, S.E. Çelik, S. Baki, L. Yıldız, Ş. Karaman, R. Apak, A comprehensive review of CUPRAC methodology, *Analytical Methods*. 3 (2011) 2439–2453.
- [19] M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak, The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 30 (2011) 652–664.
- [20] M. Oyaizu, Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 44 (1986) 307–315.
- [21] A. Szydłowska-Czerniak, C. Dianoczki, K. Recseg, G. Karlovits, E. Szlyk, Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods, *Talanta*. 76 (2008) 899–905.

- [22] H. Suyani, H. Aziz, M. Efdi, Comparison of Iron Reduction Methods on The Determination of Antioxidants Content In Vegetables Sample, *Oriental Journal of Chemistry*. 34 (2018) 2418.
- [23] C. Mylonas, D. Kouretas, Lipid peroxidation and tissue damage., *In Vivo* (Athens, Greece). 13 (1999) 295–309.
- [24] M. Costa, S. Losada-Barreiro, F. Paiva-Martins, C. Bravo-Díaz, Polyphenolic Antioxidants in Lipid Emulsions: Partitioning Effects and Interfacial Phenomena, *Foods*. 10 (2021) 539. <https://doi.org/10.3390/foods10030539>.
- [25] H. Tsuchihashi, M. Kigoshi, M. Iwatsuki, E. Niki, Action of β -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 323 (1995) 137–147.
- [26] B. ŞAHİN, Sunflower Honey Produced in Turkey Scavenges Singlet Oxygen and Inhibits Lipid Peroxidation via Antiradical Activity, *Journal of Ongoing Chemical Research*. 6 (n.d.) 1–5.
- [27] G.J. Marco, A rapid method for evaluation of antioxidants, *J Am Oil Chem Soc*. 45 (1968) 594–598. <https://doi.org/10.1007/BF02668958>.
- [28] H.E. Miller, A simplified method for the evaluation of antioxidants, *J Am Oil Chem Soc*. 48 (1971) 91–91. <https://doi.org/10.1007/BF02635693>.
- [29] M.S. Taga, E.E. Miller, D.E. Pratt, Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants, *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 61 (1984) 928–931.
- [30] L. Gachkar, D. Yadegari, M.B. Rezaei, M. Taghizadeh, S.A. Astaneh, I. Rasooli, Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils, *Food Chemistry*. 102 (2007) 898–904.
- [31] N. Kartal, M. Sokmen, B. Tepe, D. Daferera, M. Polissiou, A. Sokmen, Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure, *Food Chemistry*. 100 (2007) 584–589.
- [32] S.-W. Huang, E.N. Frankel, J.B. German, Antioxidant activity of α - and γ -tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42 (1994) 2108–2114.
- [33] E.N. Frankel, A.S. Meyer, The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80 (2000) 1925–1941.

- [34] C. Reitz, R. Mayeux, Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers, *Biochemical Pharmacology*. 88 (2014) 640–651.
- [35] F. Zemek, L. Drtinova, E. Nepovimova, V. Sepsova, J. Korabecny, J. Klimes, K. Kuca, Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine, *Expert Opinion on Drug Safety*. 13 (2014) 759–774.
- [36] M.B. Colovic, D.Z. Krstic, T.D. Lazarevic-Pasti, A.M. Bondzic, V.M. Vasic, Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology, *Current Neuropharmacology*. 11 (2013) 315–335.
- [37] K. Gholivand, F. Ghaziani, R. Yaghoubi, Z. Hosseini, Z. Shariatinia, Design, synthesis and anticholinesterase activity of some new α -aminobisphosphonates, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 25 (2010) 827–835.
- [38] S. Shaikh, P. Dhavan, M.M.V. Ramana, B.L. Jadhav, Design, synthesis and evaluation of new chromone-derived aminophosphonates as potential acetylcholinesterase inhibitor, *Molecular Diversity*. 25 (2021) 811–825.
- [39] S. Shaikh, P. Dhavan, P. Singh, J. Uparkar, S.P. Vaidya, B.L. Jadhav, M.V. Ramana, Synthesis of carbazole based α -aminophosphonate derivatives: design, molecular docking and in vitro cholinesterase activity, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. (2020) 1–23.
- [40] S. López, J. Bastida, F. Viladomat, C. Codina, Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts, *Life Sciences*. 71 (2002) 2521–2529.
- [41] J.J. Sramek, E.J. Frackiewicz, N.R. Cutler, Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine, *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 9 (2000) 2393–2402.
- [42] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*. 7 (1961) 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- [43] B. Vinutha, D. Prashanth, K. Salma, S.L. Sreeja, D. Pratiti, R. Padmaja, S. Radhika, A. Amit, K. Venkateshwarlu, M. Deepak, Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity, *Journal of Ethnopharmacology*. 109 (2007) 359–363.
- [44] P. Taslimi, İ. Gulçin, Antidiabetic potential: In vitro inhibition effects of some natural phenolic compounds on α -glycosidase and α -amylase enzymes, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 31 (2017) e21956.

- [45] J. Fauchère, A. Rosenau, *Campylobacter et Helicobacter en pathologie digestive humaine*, *Med Sci (Paris)*. 7 (1991) 138. <https://doi.org/10.4267/10608/4322>.
- [46] S. Suerbaum, J.-M. Thiberge, I. Kansau, R.L. Ferrero, A. Labigne, *Helicobacter pylori hspA-hspB heat-shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity*, *Molecular Microbiology*. 14 (1994) 959–974.
- [47] B. Kar, R.S. Kumar, I. Karmakar, N. Dola, A. Bala, U.K. Mazumder, P.K. Hadar, *Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of Mimosa elengi leaves*, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2 (2012) S976–S980.
- [48] G. Leelaprakash, S.M. Dass, *In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of Enicostemma axillare*, *International Journal of Drug Development and Research*. 3 (2011) 189–196.
- [49] N. Duganath, S.R. Kumar, R. Kumanan, K.N. Jayaveera, *Activity of traditionally used medicinal plants*, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 1 (2010) 2.
- [50] S. Chandra, P. Chatterjee, P. Dey, S. Bhattacharya, *Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein*, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2 (2012) S178–S180.
- [51] G. Sangeetha, R. Vidhya, *In vitro anti-inflammatory activity of different parts of Pedalium murex (L.)*, *Inflammation*. 4 (2016) 31–36.
- [52] D. Malagoli, *A full-length protocol to test hemolytic activity of palytoxin on human erythrocytes*, *Invertebrate Survival Journal*. 4 (2007) 92–94.
- [53] J. Takebayashi, J. Chen, A. Tai, *A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis*, in: *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*, Springer, 2010: pp. 287–296.
- [54] M.G. Malakyan, S.A. Badzhinyan, L.A. Vardevanyan, D.S. Grigoryan, D.E. Egiazaryan, A.A. Avetisyan, I.L. Aleksanyan, L.P. Ambartsumyan, K.S. Sargsyan, *Studies of the antioxidant and antihemolytic activity of quinoline derivatives in a model of oxidative damage to erythrocyte membranes*, *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 43 (2009) 7–10.
- [55] L. Mbanga, P.T. Mpiana, M. Mbala, L. Ilinga, B. Ngoy, K. Mvingu, M. Mulenga, *Comparative in vitro Sun Protection Factor (SPF) values of some herbal extracts found in Kinhasa by Ultraviolet Spectrophotometry*, *J. of Physical and Chemical Sciences*. 2 (2015) 1–6.
- [56] T.Y. Ho, *Sunscreens: Is looking at sun protection factor enough*, *Hong Kong Dermatol. & Venereol. Bull.*, 2001; 9 (3): 107. 111 (2001).

- [57] S. Schalka, V.M.S. dos Reis, Sun protection factor: meaning and controversies, *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 86 (2011) 507–515.
- [58] J. de S. Mansur, M.N.R. Breder, M.C. d'Ascensão Mansur, R.D. Azulay, Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria, *An. Bras. Dermatol.* (1986) 121–4.
- [59] S. Bhagat, A.K. Chakraborti, An Extremely Efficient Three-Component Reaction of Aldehydes/Ketones, Amines, and Phosphites (Kabachnik–Fields Reaction) for the Synthesis of α -Aminophosphonates Catalyzed by Magnesium Perchlorate, *J. Org. Chem.* 72 (2007) 1263–1270. <https://doi.org/10.1021/jo062140i>.
- [60] B. Litim, Z. Cheraiet, S. Meliani, A. Djahoudi, A. Boukhari, Synthesis and potent antimicrobial activity of novel coumarylthiazole α -aminophosphonates derivatives, *Mol Divers.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10242-2>.
- [61] F. Caron, Antimicrobial susceptibility testing: a four facets tool for the clinician, *Journal Des Anti-Infectieux*. 14 (2012) 168–174.
- [62] A.G. Ponce, R. Fritz, C. del Valle, S.I. Roura, Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, *LWT - Food Science and Technology*. 36 (2003) 679–684. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4).
- [63] M.R. Moreira, A.G. Ponce, C.E. Del Valle, S.I. Roura, Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen, *LWT-Food Science and Technology*. 38 (2005) 565–570.
- [64] M. Elshikh, S. Ahmed, S. Funston, P. Dunlop, M. McGaw, R. Marchant, I.M. Banat, Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants, *Biotechnology Letters*. 38 (2016) 1015–1019.
- [65] J.E. Ross, R.N. Jones, Initial quality control ranges for CEM-102 (Fusidic Acid) using the CLSI multi-laboratory M23-A3 study design, *Abstr. D-1435. 49th ICAAC.* (2009).

CHAPITRE V

MODELISATION MOLECULAIRE DES DERIVES SYNTHETISES.

V.1 Introduction

La chimoinformatique, et plus spécifiquement la modélisation moléculaire, met en œuvre une puissance de calcul dans l'espace chimique et biologique combiné, afin de rationaliser la conception, le développement et l'optimisation des médicaments [1]. Ils sont des techniques permettant de comparer les propriétés physico-chimiques associées aux molécules chimiques, et d'analyser les interactions supramoléculaires responsables d'un phénotype biologique, points clés pour la conception de nouveaux ligands.

Plusieurs modèles mathématiques sont disponibles pour définir les conformations associées à chaque structure, des méthodes de mécanique quantique aux méthodes de mécanique moléculaire en considérant notamment la complexité de la molécule et les propriétés que l'on souhaite modéliser [2,3].

Dans notre travail la modélisation moléculaire a été faite par trois méthodes :

- ✓ Mécanique quantique, en utilisant la méthode de DFT (*Density Functional Theory*) pour déterminer certaines propriétés moléculaires importantes comme les propriétés électroniques, la stabilité et la réactivité, qui sont liées à la structure moléculaire ;
- ✓ La modélisation semi-empirique QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) a comme objectif la prédiction des effets d'une variation de la structure moléculaire sur l'activité biologique ;
- ✓ La modélisation empirique par la méthode d'arrimage moléculaire (plus souvent connu sous le terme "*docking*") à fin d'estimer l'affinité entre (l'AChE, BChE et l' α -amylase) et les molécules testées et pour analyser les interactions intermoléculaires impliquées.

V.2 Calculs de chimie quantique par la méthode DFT

Les calculs de chimie quantique sont largement utilisés comme un appui pour l'interprétation des résultats expérimentaux, et aussi pour la conception de nouveaux produits possédant des propriétés souhaitables. Dans cette partie, les calculs de chimie quantique ont été réalisés pour déterminer la corrélation entre la structure moléculaire des molécules synthétisées et certaines propriétés moléculaires importantes comme les propriétés électroniques, la stabilité et la réactivité.

Dans ce contexte, tous les calculs de la chimie quantique ont été implémentés avec des optimisations géométriques totales en utilisant le logiciel *Gaussian 09W* [4] et les

résultats obtenus ont été visualisés au moyen du logiciel *GaussView 5.0.8* [5]. L'optimisation de la géométrie a été réalisée par la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT) avec la base 6-31G (d,p) à l'état gazeux, au niveau de B3LYP (*Becke-3-paramètres-Lee-Yang-Parr*) [6,7].

Les calculs des fréquences vibrationnelles à la géométrie optimisée ont été effectués pour confirmer les structures optimisées pour être à un minimum d'énergie et d'obtenir les spectres de vibration théoriques. La réactivité et la stabilité chimique des molécules sont influencées par les propriétés chimiques telles que : le potentiel d'ionisation (I) lié directement à l'énergie de l'HOMO (*Highest Occupeid Molecular Orbital*), l'affinité électronique (A) liée directement à l'énergie de la LUMO (*Lawest Unocpeid Molecular Orbital*), le potentiel chimique (μ), la dureté globale (σ), la mollesse globale (η), l'électronégativité (χ), l'indice globale d'électrophilie (ω), le moment dipolaire et les charges atomiques. Ces paramètres sont très importants pour comprendre les activités chimiques et biologiques des composés synthétisés. Ils sont calculés directement par les énergies des orbitales HOMO et LUMO, selon les relations suivantes [8] :

$$\text{Energy gap: } \Delta E_{GAP} = E_{HOMO} - E_{LUMO} \quad (V.1)$$

$$\text{Energie d'ionisation: } I = -E_{HOMO} \quad (V.2)$$

$$\text{Affinité électronique: } A = -E_{LUMO} \quad (V.3)$$

$$\text{Electronégativité: } \chi = (I + A)/2 \quad (V.4)$$

$$\text{Potentiel chimique: } \mu = -\chi \quad (V.5)$$

$$\text{Dureté moléculaire: } \eta = (E_{LUMO} - E_{HOMO})/2 \quad (V.6)$$

$$\text{mollesse moléculaire: } S = 1/\eta \quad (V.7)$$

$$\text{Indice d'électrophilie: } \omega = \mu^2/2\eta \quad (V.8)$$

V.2.1 Résultats des calculs de chimie quantique

Les molécules visées par ce travail ont été analysées avec la méthode DFT. Les géométries optimisées, les charges atomiques les paramètres de chimie quantique et thermodynamiques ont été calculées et discutés.

V.2.1.1 Propriétés structurales et électroniques

Les structures moléculaires optimisées de 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP sont illustrées par la figure V 1.

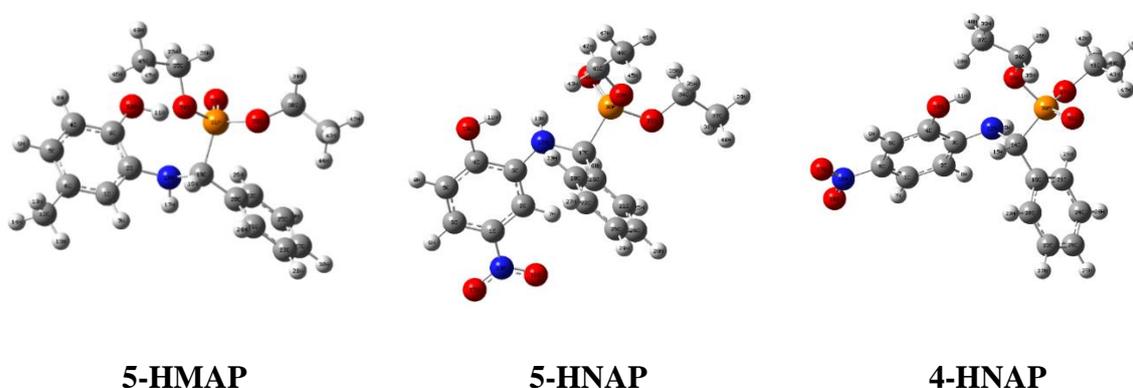


Figure V 1 : Structures moléculaires optimisées de 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP

V.2.1.2 Analyse des orbitales moléculaires frontières (FMO)

La figure V 2 représente la distribution des sites donneurs d'électrons de l'orbitale moléculaire occupée la plus élevée (HOMO) et des sites accepteurs d'électrons de l'orbitale moléculaire inoccupée la plus basse (LUMO). Les régions vertes et rouges représentent les orbitales moléculaires avec des phases totalement opposées. La phase positive de la molécule est représentée en couleur rouge et la phase négative en couleur verte. Généralement, les densités HOMO et LUMO montrent la distribution des charges autour des différents types de liaisons donneurs et accepteurs présentées dans la molécule. L'HOMO en tant que donneur d'électrons représente la capacité de donner un électron, tandis que le LUMO en tant qu'accepteur d'électrons représente la capacité de recevoir un électron [9].

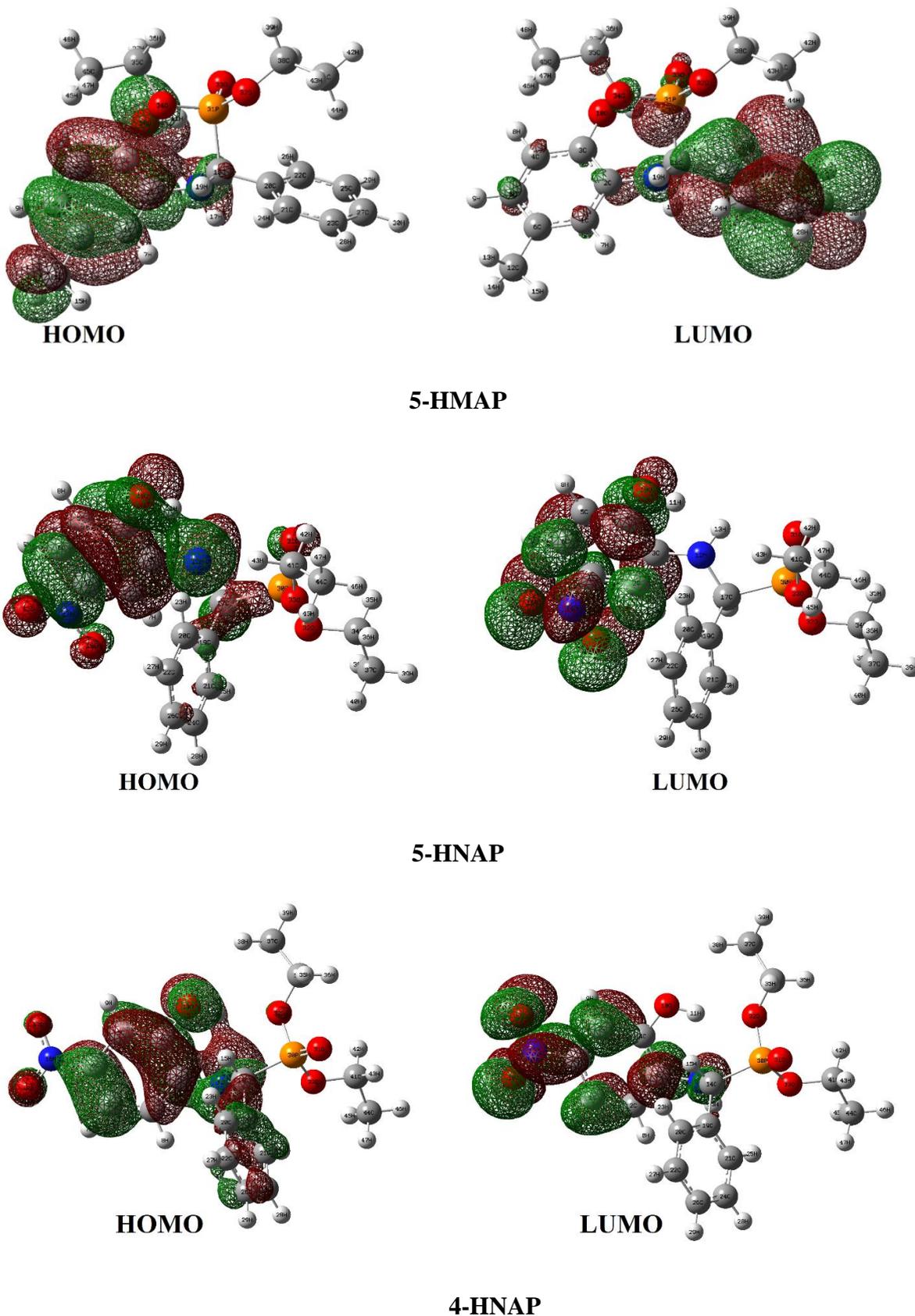


Figure V 2 : *Distribution de la densité électronique totale des orbitales moléculaires frontières des molécules 5HMAP, 5HNAP et 4HNAP*

L'analyse des FMO de 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP a révélé que les surfaces des isodensités dans l'HOMO pour les trois composés, sont principalement concentrées sur les fragments aromatiques du groupe aminophénol, tandis que l'isodensité dans le LUMO, se concentre principalement autour du cycle aromatique de l'aldéhyde pour 5-HMAP mais il est situé sur le cycle phényle de la fraction aminophénol pour le 5-HNAP et le 4-HNAP.

Les valeurs des énergies de LUMO et HOMO et leur écart énergétique reflètent la réactivité chimique de la molécule (tableau V 1).

Le 5-HMAP représente la valeur d' E_{HOMO} la plus élevée, ce qui est une indication de la plus grande facilité de donner des électrons de 5-HMAP à l'orbitale inoccupée du récepteur. Le 4-HNAP avec une faible valeur d' E_{LUMO} représente la plus petite habilité à accepter les électrons.

Une faible valeur du gap énergétique est généralement associée à une réactivité chimique élevée ou à une stabilité moindre [10], explique l'éventuelle interaction de transfert de charge au sein de la molécule, qui est responsable des propriétés bioactives [11]. En conséquence, la tendance de l'écart ΔE des composés devient : 4-HNAP > 5-HNAP > 5-HMAP.

Les énergies des FMO (LUMO et HOMO) ont été utilisées pour étudier les descripteurs de réactivité globale tels que la dureté (η), le potentiel chimique (μ), la mollesse (S), l'électronégativité (χ), l'indice d'électrophilicité (ω) et l'énergie d'ionisation qui est un descripteur important de réactivité chimique.

Le tableau V 1 récapitule les valeurs obtenues des descripteurs de réactivité chimique des composés étudiés déterminés par des calculs DFT.

Tableau V 1 : La réactivité chimique globale des molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP, calculée par B3LYP / 6-31G (d, p)

<i>Paramètres quantiques</i>	<i>5-HMAP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>4-HNAP</i>
<i>E_{LUMO} (a.u)</i>	-0.03135	-0.09333	-0.09671
<i>E_{HOMO} (a.u)</i>	-0.21007	-0.24264	-0.24013
<i>ΔE_{GAP} (a.u)</i>	0.17872	0.14931	0.14342
<i>Energie d'ionisation (I)</i>	0.21007	0.24264	0.24013
<i>Affinité électronique (A)</i>	0.03135	0.09333	0.09671
<i>Dureté moléculaire (η)</i>	0.08936	0.074655	0.07171
<i>Mollesse moléculaire (S)</i>	5.59534467	6.69747505	6.97252824
<i>Potentiel chimique (μ)</i>	-0.12071	-0.167985	-0.16842
<i>Indice d'électrophilicité (ω)</i>	0.08152923	0.18899578	0.19777783
<i>Electronégativité (χ)</i>	0.12071	0.167985	0.16842

Une énergie d'ionisation élevée ou une affinité électronique désigne une stabilité élevée et une réactivité chimique moindre et une faible énergie d'ionisation spécifie une réactivité élevée des molécules [12]. Parmi les trois molécules α -aminophosphonates synthétisés, le 5-HNAP présente la valeur d'I la plus élevée 0.24264 suivi par le 4-HNAP 0.24013 et en fin la plus basse valeur d'I est observée dans la molécule 5-HMAP avec une valeur de 0.21007 (Tableau V 1). La valeur élevée d'I implique qu'il est difficile d'éliminer l'électron de 5-HNAP et 4-HNAP qui sera plus chimiquement inerte. Et que le 5-HMAP possède la réactivité la plus élevée.

L'électroaffinité (A) pour les molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP est 0,03135 a.u, 0,09333 a.u et 0.09671 a.u, respectivement. Ces valeurs indiquent que le 5-HMAP possède la plus faible affinité électronique que les autres molécules (Tableau V 1).

La dureté chimique (η) est associée à la stabilité et la réactivité d'un système chimique, elle mesure la résistance d'une molécule, au changement dans le transfert ou la distribution de la charge électronique. Plus la dureté de la molécule est importante, plus la molécule est stable et donc moins réactive [13].

L'inverse de la dureté est défini comme mollesse (S) de la molécule, ce paramètre peut servir comme critère de la stabilité thermodynamique des composés et peut être utilisé

pour la prédiction de la réactivité. La molécule la plus molle, peut subir un réarrangement plus facile pour la densité de charge et donc elle pourrait être prédite à être plus réactifs [14,15].

L'analyse des résultats portés dans le tableau V 1, montre que la molécule 4-HNAP est la plus molle, moins stable et plus réactif.

L'indice d'électrophilicité (ω) est un autre outil puissant des descripteurs de réactivité globale pour l'étude de la réactivité des molécules organiques participant aux réactions polaires. L'indice d'électrophilicité (ω) décrit la capacité d'acceptation d'électrons des systèmes assez similaire à la dureté et au potentiel chimique. Des valeurs élevées de l'indice d'électrophilicité augmentent les capacités d'acceptation d'électrons des molécules. Ce résultat indique que le 4-HNAP est un meilleur électrophile.

Physiquement, le potentiel chimique (μ) décrit la tendance à s'échapper des électrons d'un système à l'équilibre. Lorsque le potentiel chimique est plus petit, le composé devient plus stable ou moins réactif [16]. D'après le tableau V 1, le potentiel chimique (en valeur absolue) du 4-HNAP (0.16842 a.u) est supérieur à celui du 5-HMAP (0,12071 a.u) et du 5-HNAP (0,167985 a.u). Ce résultat indique que 4-HNAP est la molécule la moins stable et la plus réactive. Ce résultat confirme que 4-HNAP est la molécule la plus réactive.

Le potentiel chimique d'une molécule est défini comme la valeur négative de son électronégativité. Le Tableau V 1 montre que le 5-HMAP a une valeur d'électronégativité inférieure à celle du 5-HNAP et 4-HNAP, donc c'est le meilleur électrodonneur.

V.2.1.3 Le moment dipolaire

Le moment dipolaire dans une molécule est une propriété électronique importante qui résulte de la répartition non uniforme des charges sur les différentes atomes dans une molécule, Il est principalement utilisé pour étudier les interactions intermoléculaires impliquant des forces dipôle-dipôle de type van der Waals, etc., parce que plus le moment dipolaire est important, plus les interactions intermoléculaires seront fortes [17].

Dans le tableau V 2, le moment dipolaire électronique $\{\mu_i (i = x, y, z)\}$ et le moment dipolaire total μ_{tot} pour les composés α -aminophosphonates synthétisés sont répertoriés. Le moment dipolaire total peut être calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\mu_{\text{tot}} = (\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2)^{1/2} \quad (\text{V.9})$$

La polarité d'une liaison ou d'une molécule est due à la différence d'électronégativité entre les éléments chimiques qui la composent. Plus les charges sont réparties de façon asymétrique, plus une liaison ou molécule sera polaire, et au contraire, si les charges sont réparties de façon totalement symétrique, elle sera apolaire, c'est-à-dire non polaire.

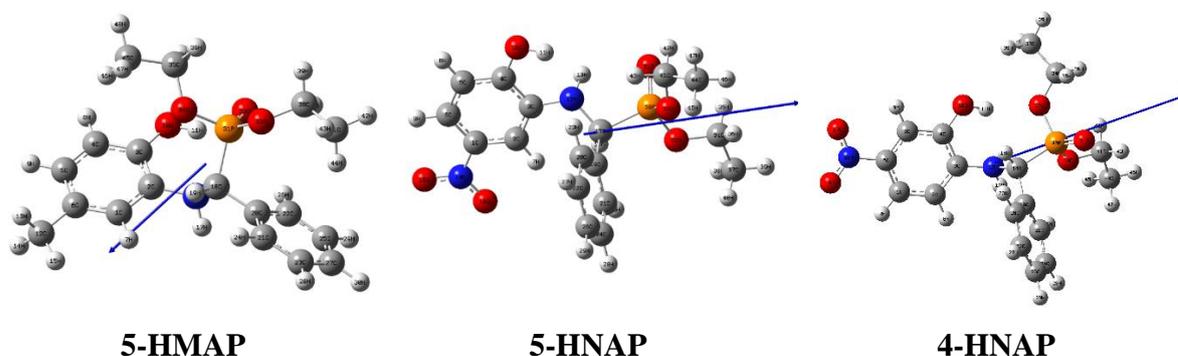


Figure V 3 : Orientation et intensité du moment dipolaire des molécules synthétisées

Le tableau V 2 montre que la valeur calculée du moment dipolaire dans le cas de 4-HNAP (7.9166 Debye) s'avère être bien supérieure à 5-HNAP (7.3495 Debye) et 5-HMAP (4.1062 Debye). La valeur la plus élevée du moment dipolaire est observée pour le composant μ_x . Dans ce sens, cette valeur est égale à 2.5226 Debye, 7.2684 Debye et 7.3992 Debye pour 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP, respectivement.

Tableau V 2 : Moments dipolaires électriques (en Debye) de 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP calculés par B3LYP/6-31G (d,p)

<i>Parameters</i>	<i>5-HMAP</i>	<i>5-HNAP</i>	<i>4-HNAP</i>
μ_x	2.5226	7.2684	7.3992
μ_y	-2.9344	0.0118	-2.4803
μ_z	-1.3734	-1.0883	-1.3313
μ_{tot}	4.1062	7.3495	7.9166

Il est bien observé que le moment dipolaire est plus important dans le cas des molécules contenant le groupe NO₂ par rapport à celui de méthyl (CH₃), cela est expliqué par la différence d'électronégativité provoqué par le groupement NO₂. La molécule 4-

HNAP possède le moment dipolaire le plus élevé et donc représente la molécule la plus polaire.

On sait que plus le moment dipolaire est grand plus la molécule est polaire donc l'ordre de polarité dans les α -aminophosphonates étudiés est le suivant :



V.2.1.4 Charges atomiques des molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP

Le calcul des charges atomiques de *Mulliken* joue un rôle important dans l'application des calculs de chimie quantique des systèmes moléculaires, elles affectent le moment dipolaire, la polarisabilité moléculaire, la structure électronique, et beaucoup de propriétés des systèmes moléculaires. La répartition de charge, au cours des atomes suggère la formation de donneur et accepteur impliquant le transfert de charge dans la molécule et dans une réaction chimique [18].

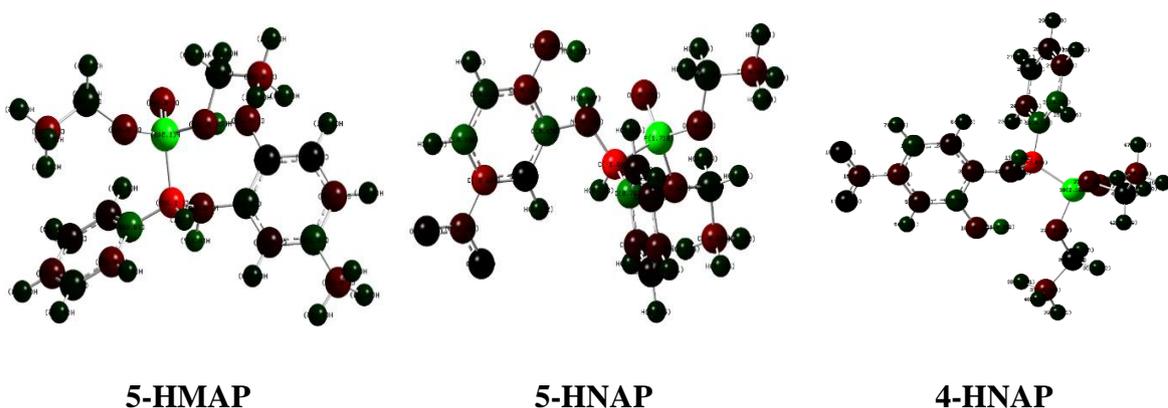


Figure V 4 : La distribution des charges Mulliken sur les molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP calculées par la méthode B3LYP/6-31G (d,p)

La distribution des charges atomiques Mulliken pour les trois molécules sont calculées par la méthode B3LYP/6-31G (d, p) et présentées dans le tableau V 3.

Tableau V 3: Charges atomiques des molécules 5HMAP, 5HNAP et 4HNAP calculées par B3LYP / 6-31G (d, p)

5HMAP		5HNAP		4HNAP	
Atome	Charge	Atome	charge	Atom	Charge
C1	0.151449	C1	0.854410	C1	0.234932
C2	0.084366	C2	0.006252	C2	-0.121979
C3	0.009742	C3	0.449625	C3	-0.259895
C4	-0.010785	C4	-0.551401	C4	0.263704
C5	-0.344055	C5	0.212982	C5	-0.191614
C6	0.235835	C6	0.499361	C6	-0.442003
H7	0.083028	H7	0.172327	H7	0.203233
H8	0.160966	H8	0.154525	H8	0.117790
H9	0.100909	H9	0.205156	H9	0.210866
O10	-0.435563	O10	-0.437918	O10	-0.453053
H11	0.472938	H11	0.391916	H11	0.562185
C12	-0.470467	N12	-0.338413	N12	-0.148629
H13	0.169825	H13	0.447375	H13	0.432311
H14	0.158990	N14	-0.310721	C14	-2.018110
H15	0.164610	O15	-0.028621	H15	0.192440
N16	-0.368063	O16	-0.003385	N16	-0.280517
H17	0.377442	C17	-1.609050	O17	-0.018603
C18	-1.283079	H18	0.238361	O18	-0.030912
H19	0.201116	C19	0.781328	C19	0.534058
C20	0.479938	C20	-0.087548	C20	-0.334413
C21	-0.456126	C21	-0.241766	C21	0.529340
C22	-0.109812	C22	-0.111958	C22	0.057320
C23	0.079181	H23	0.125524	H23	0.114535
H24	0.140859	C24	-0.039675	C24	-0.339501
C25	-0.058456	H25	0.128308	H25	0.165983
H26	0.189698	C26	-0.300443	C26	-0.139966
C27	-0.314021	H27	0.133011	H27	0.130532

H28	0.134847	H28	0.134967	H28	0.123009
H29	0.140246	H29	0.110619	H29	0.109596
H30	0.123767	P30	1.717790	P30	2.148796
P31	1.547880	O31	-0.678545	O31	-0.677340
O32	-0.490651	O32	-0.469088	O32	-0.578732
O33	-0.643845	O33	-0.441888	O33	-0.498523
O34	-0.449822	C34	0.080935	C34	0.014014
C35	0.070778	H35	0.168714	H35	0.176245
H36	0.149962	H36	0.163577	H36	0.162324
H37	0.175364	C37	-0.636966	C37	-0.627715
C38	0.091639	H38	0.175100	H38	0.190686
H39	0.165549	H39	0.149730	H39	0.145433
H40	0.177015	H40	0.174386	H40	0.161936
C41	-0.649758	C41	0.102959	C41	0.026764
H42	0.145458	H42	0.174731	H42	0.139213
H43	0.159429	H43	0.143390	H43	0.179307
H44	0.193638	C44	-0.606595	C44	-0.659629
C45	-0.657796	H45	0.179667	H45	0.168079
H46	0.203273	H46	0.170434	H46	0.149771
H47	0.161464	H47	0.148569	H47	0.176731
H48	0.143997				

D'après ces résultats, on peut observer que tous les atomes d'azote et d'oxygène accumulent une charge négative avec des charges atomiques allant de -0.338413 à -0.148629 pour les N et de -0.678545 à -0.435563 pour les O. Cependant, tous les atomes d'hydrogène dans les trois dérivés sont électropositifs avec des charges atomiques dans la gamme de 0.083028 à 0.562185. En plus l'atome de phosphore dans les trois dérivés (5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP) présente une charge électropositive avec des charges atomiques de 1.717790, 2.148796 et 1.547880, respectivement. Nous observons clairement que la charge négative la plus élevée se trouve sur les O10 (-0.435563), O32 (-0.490651), O33 (-0.643845) et O34 (-0.449822) pour 5-HMAP et O10 (-0.437918), O15 (-0.028621), O16 (-0.003385), O31 (-0.678545), O32 (-0.469088) et O33 (-0.441888) pour le 5-HNAP ainsi que pour le 4-HNAP, O10 (-0.453053), O17 (-0.018603), O18 (-0.030912), O31 (-

0.677340), O32 (-0.578732) et O33 (-0.498523). D'autre part, les atomes de carbone lient aux atomes de phosphore des trois molécules C18 (-1.283079) de 5-HMAP, C17 (-1.609050) de 5-HNAP et C14 (-2.018110) de 4-HNAP montrent la charge la plus négative par conséquent la charge positive la plus élevée se trouve sur les atomes de phosphore P30 (1.547880) de 5-HMAP, P31 (1.717790) de 5-HNAP et P31 (2.148796) de 4-HNAP. Ces résultats ont clairement indiqué que ces atomes sont les sites les plus réactifs. La partie positive du récepteur interagit plus probablement avec les sites atomiques chargés négativement des composés étudiés (O et N), tandis que la partie négative du récepteur interagira plus facilement avec les atomes les plus positivement chargés (P et H) [19].

La présence d'une grande charge négative sur l'atome d'O et d'une charge positive nette sur l'atome d'H peut suggérer la formation d'interactions intermoléculaires sous des formes solides.

En fin, on peut conclure que ces interactions jouent peut-être un rôle essentiel dans la bioactivité des molécules étudiées [19].

V.3 Etude qualitative de la relation structure-activité QSAR

V.3.1 Introduction

Le principe des méthodes QSAR est de mettre en place une relation mathématique reliant de manière quantitative la structure moléculaire, codée par des propriétés moléculaires appelées descripteurs, avec une activité en utilisant des méthodes d'analyse de données.

La découverte d'une telle relation permet de prédire les propriétés physiques et chimiques et l'activité biologique des composés, de développer de nouvelles théories ou de comprendre les phénomènes observés. Elle permet également de guider les synthèses de nouvelles molécules, sans avoir à les réaliser, ou à analyser des familles entières de composés [20,21].

V.3.2 Les descripteurs moléculaires utilisés dans l'analyse QSAR

V.3.2.1 Le poids moléculaire

Noté MW (appelé aussi le poids de formule), mesuré en daltons (Da). C'est la somme des poids atomiques des différents atomes constituant la molécule. Il est utilisé dans l'étude de transport dont la diffusion et le mode de fonctionnement des médicaments [22,23].

V.3.2.2 Coefficient de partage (octanol-water) log P

Le coefficient de partage d'une substance chimique entre deux phases non miscibles est le rapport des concentrations à l'équilibre du composé dans la phase organique apolaire et la phase aqueuse. Le solvant organique couramment utilisé pour mesurer expérimentalement le coefficient de partage des molécules médicamenteuses est l'octanol. Le coefficient de partage P se calcule de la manière suivante [24]:

$$P = \frac{C_{oct}}{C_{eau}} \times 100 \quad (V.10)$$

Où : C_{oct} est la concentration de composé en solution dans l'octanol

C_{eau} est la concentration du composé en solution dans l'eau

Donc le logarithme du coefficient de partage octanol-eau (log P), permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule.

Si : $\log P > 0$: le soluté est dit lipophile (hydrophobe).

$\log P < 0$: le soluté est dit hydrophile.

Le partage d'une molécule entre une phase aqueuse et une phase lipidique conditionne en partie ses propriétés biologiques telles que le transport, le passage à travers les membranes, la biodisponibilité (distribution et accumulation), l'affinité pour un récepteur et la fixation par une protéine, l'activité pharmacologique ou encore la toxicité.

V.3.2.3 Superficie topologique de la surface polaire (TPSA)

La superficie topologique de la surface polaire (TPSA : topological polar surface area) est définie comme la somme des surfaces des atomes polaires, généralement l'oxygène, l'azote, le soufre, le chlore y compris également leurs atomes d'hydrogène attachés dans une molécule. Ce paramètre a été représenté pour une meilleure corrélation d'absorption intestinale dans le corps humain, la perméabilité, et la pénétration de barrière hémato-encéphalique [25].

V.3.2.4 Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène (HBD)

Il s'agit du nombre d'atomes possédant une case quantique vide et contenant un hydrogène acide, c'est-à-dire un atome d'hydrogène lié à un hétéroatome (comme dans les amines, alcools, thiols...).

V.3.2.5 Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène (HBA)

Il s'agit du nombre d'atomes possédant des doublets non liants (N, O ou F) capable de se lier par liaisons hydrogène à d'autres molécules.

V.3.2.6 Nrotb

Ce paramètre topologique simple est considéré comme un bon descripteur de la biodisponibilité orale des médicaments, il mesure la flexibilité moléculaire [26]. La liaison rotative est définie comme une liaison d'un composé non cyclique, associée à un atome non lourd. Les liaisons C-N (amide) ne sont pas considérées en raison de leur barrière d'énergie de rotation élevée.

V.3.2.7 Volume

Le volume moléculaire est une fonction de MW et de structure et tient compte de toutes les conformations accessibles disponibles à la molécule dans des conditions physiologiques. Il détermine donc les caractéristiques de transport d'une molécule, le volume est défini par la relation :

$$MV = \frac{MW}{d} \quad (V.11)$$

Où : MW est le poids moléculaire et d la densité.

V.3.3 Les propriétés « drug-like »

Chaque médicament éventuel doit se conformer à plusieurs critères de base, tels son faible coût de production, être soluble, stable mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité.

Au fil des ans, des ensembles de règles ou de filtres ont été codifiés afin d'aider à définir l'espèce chimique de la ressemblance avec les médicaments. La règle la plus connue rapportant les constitutions chimiques à leurs activités biologiques est la règle de *Lipinski* [27], il s'appelle la « règle de cinq ». Néanmoins, d'autres approches ont été proposées par d'autres auteurs, notamment par *Veber* et *Ghose* [28,29].

Pour prédire le meilleur équilibre des propriétés moléculaires de nos molécules, nous appliquons des règles de base, les plus couramment utilisés, qu'ils sont : les règles de *Lipinski*, *Veber* et *Ghose*.

V.3.3.1 La règle de Lipinski

Cette règle est la plus utilisée pour l'identification des composés drug-like. D'après cette règle, les composés ne validant pas au moins deux des critères suivants ont de très fortes chances d'avoir des problèmes d'absorption ou de perméabilité :

- Le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (Da) ;
- Le coefficient de partition (logP) doit être ≤ 5 (avec un optimum entre 0 et 3) ;
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogènes doit être ≤ 5 ;
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogènes doit être ≤ 10 .

Ce n'est donc pas une méthode pour distinguer les composés étant potentiellement des médicaments de ceux n'en étant pas, mais plutôt une méthode pour identifier les composés ayant une faible absorption ou une faible perméabilité.

Les composés dont les propriétés physico-chimiques ne satisfont pas au moins deux des règles sont fortement susceptibles de présenter des problèmes d'absorption ou de perméabilité [27].

V.3.3.2 La règles de Veber

Veber a introduit deux critères supplémentaires d'après l'étude de 1100 composés candidats médicaments. La réduction de la flexibilité moléculaire (mesurée par la faible surface polaire qui doit être inférieure à 140 \AA^2) et le nombre de liaisons rotatives qui doit être inférieure à 10. Ces critères sont des prédicateurs importants de la bonne biodisponibilité orale [29].

V.3.3.3 Règle de Ghose

Cette approche est basée sur les connaissances dans la conception de bibliothèques de chimie combinatoire ou médicinale pour la découverte des médicaments : Ghose a suggéré une plage de qualification et quantification qui pourrait être utilisée dans le développement des bibliothèques chimiques de Drug-Like et a recommandé les contraintes suivantes [28,29]:

Une caractérisation quantitative basée sur des profils de propriétés physico-chimiques calculés tels que :

- Poids moléculaire entre 160 et 480 Dalton ;
- Log P calculé entre -0,4 et 5,6 ;

- Réfractivité molaire entre 40 et 130 ;
- Nombre total d'atomes entre 20 et 70.

Ainsi qu'une caractérisation qualitative basée sur l'occurrence de groupes fonctionnels et de sous-structures importantes.

V.3.4 Propriétés ADME–Tox (d'absorption, distribution, métabolisme, excrétion, et de toxicité)

Les filtres de type *ADME-Tox* sont rapidement devenus populaires. Ils reposent sur plusieurs critères déterminant les propriétés pharmacocinétiques potentielles des molécules, cette abréviation *ADME-Tox* représente les concepts pharmacocinétiques suivants : Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination et Toxicité. Ce sont des critères qui décrivent la disposition d'une molécule bioactive dans un organisme [30].

V.3.5 Logiciels de calcul des descripteurs moléculaires

Plusieurs logiciels sont disponibles pour faire les calculs des descripteurs, parmi ceux, que nous avons utilisé dans notre travail, on trouve :

V.3.5.1 Molinspiration

Molinspiration est un logiciel qui permet de calculer quelques propriétés physico-chimiques des molécules pour la conception des médicaments et de connaître la relation quantitative structure et activité (QSAR), y compris le LogP, la superficie topologique de la surface polaire (TPSA), Nrotb et HBA/HBD. Ce logiciel offre également des outils pour calculer les propriétés de drug-likeness, le poids moléculaire, le volume moléculaire et le nombre de violations. D'autres propriétés bioactives peuvent être calculées : la réception des ligands couplés à la protéine G (GPCRL), la modulation des canaux ioniques (ICM), l'inhibition de l'enzyme Kinase (KI), la réception des ligands nucléaires (NRL), l'inhibition des enzymes Protéases (PI) et l'inhibition des enzymes (EI) [31,32].

V.3.5.2 Molsoft

Molsoft est un logiciel établi par « *California Based Software Company* », qui est une source principale de nouvelle technologie percée. Molsoft calcule les propriétés chimiques comme formule moléculaire, poids moléculaire, nombre de liaisons hydrogènes accepteurs (HBA/HBD), logP (octanol /coefficient de partage de l'eau) [33].

V.3.5.3 OSIRIS

Osiris est une partie intégrante de l'enregistrement des substances en interne d'Actelion system [34]. Il permet de dessiner des structures chimiques et calcule sur la volée différents propriétés pertinentes des médicaments à chaque fois une structure est valide. Les risques de toxicité (mutagénicité, tumorigénicité, irritabilité et les effets sur la reproduction) sont aussi générés par ce logiciel [35].

De plus, les propriétés avec des risques élevés et des effets indésirables comme l'effet mutagénique ou la mauvaise absorption intestinale sont évalués et codées par une couleur rouge, alors que la couleur verte indique le comportement adéquat de la substance. Osiris permet de calculer les indices Log P, Log S, le poids moléculaire, Drug-likeness et Drug-score [22].

V.3.5.4 SwissADME

C'est un outil Web, il est librement accessible sur <http://www.swissadme.ch>, il est permis de prédire l'absorption gastro-intestinale humaine d'une molécule ainsi que sa capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique. Il permet également de savoir le pouvoir d'un composé d'inhiber les isoenzymes CYP [36].

V.3.6 Résultats de la modélisation des dérivés synthétisés par QSAR

Pour explorer l'importance de nos composés, nous avons utilisé les médicaments de références utilisés dans la valorisation *in vitro* des activités biologiques comme des références positives, l'*Acarbose*, la *Galantamine*, la *Gentamicine* et l'*Ibuprofène* pour comparer leurs propriétés QSAR avec les produits α -aminophosphonates testés.

V.3.6.1 Préviation des propriétés physicochimiques (drug-likeness)

Des descripteurs moléculaires et des propriétés Drug-likeness basé sur la règle de *Lipinski* (Règles de cinq), Vaber et Ghose sont analysés, en utilisant l'outil serveur Molinspiration, Molsoft et SwissADME.

- *Application de la règle de cinq (règle de Lipinski) :*

Tableau V 4: Résultats d'application de la Règle de Lipinski pour les composés α -aminophosphonates et les références calculés par Molinspiration

Composé	MW	Log P	HBD	HBA	NV	Vol
5-HMAP	349.37	3.57	2	5	0	322.30
4-HNAP	380.34	3.08	2	8	0	329
5-HNAP	380.34	3.08	2	8	0	329
ACAR	645.61	-5.51	14	19	3	544.93
GALANT	293.41	1.49	1	4	0	286.86
GENT	477.60	-4.21	11	12	2	450.66
IBUP	206.28	3.46	1	2	0	211.19

ACAR. acarbose; **GALANT.** Galantamine; **GENT.** Gentamycine ; **IBUP.**Ibuprofène ;

Vol. Volume ; **HBD.** Nombre de donneurs de liaisons hydrogène ; **HBA.** Nombre d'accepteurs de liaison hydrogène ; **Log P.** Logarithme de la partition composée ; **MW.**

Masse moléculaire ; **NV.** Nombre de violation.

De ce tableau, on note que :

- Toutes nos molécules ont un faible poids moléculaire (compris entre 349.37 et 380.34 (< 500)). Ils sont donc facilement transportés, diffusés et absorbés par rapport aux deux molécules de références *acarbose* et *gentamycine* puisque les composés avec des poids plus élevés sont moins susceptibles d'être absorbés et donc ne peuvent jamais atteindre le site d'action [37].
- Le coefficient de partage LogP de tous les composés est calculé et jugé dans une fourchette acceptable selon la règle de cinq de *Lipinski* (3.08-3.57). La valeur de LogP reflète le taux de lipophilie qui joue un rôle essentiel dans la distribution du médicament dans l'organisme après son absorption [38]. Tous les composés présentent un coefficient de partage supérieur à celle de médicaments de références « *acarbose, galantamine et gentamycine* ». Par conséquent, nos composés offrent une bonne absorption, pénétration et diffusion à travers les biomembranes.
- Les deux composés 4-HNAP et 5-HNAP contiennent deux sites accepteurs de proton et huit sites donneurs de proton, cependant le composé 5-HMAP possède 5 sites accepteurs de proton et deux sites donneurs de proton, tous nos composés ont

un nombre accepteur d'hydrogène inférieur et égal à 10 et un nombre donneur d'hydrogène inférieur à 5 ce qui conduit à une meilleure perméabilité. Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène et le nombre de donneurs de liaisons hydrogène dans les composés testés ont été jugés conformes à la limite de règles de Lipinski, comprise entre 2 et 5 et moins que 5 et 10 respectivement. Alors que, les deux références la *gentamicine* et l'*acarbose* possèdent un nombre accepteur d'hydrogène supérieure à 10 et un nombre donneur d'hydrogène supérieure à 5 ; un grand nombre d'accepteurs d'hydrogène conduit à une faible perméabilité à travers une membrane bicouche.

- Tous nos composés ont une violation nulle alors que les deux produits de références la *gentamicine* avec 3 violations et l'*acarbose* avec 2 violations, car ils ne réalisent pas 3 et 2 conditions de *Lipinski* respectivement.

- **Application de la Règle de Veber :**

Il est bien connu qu'une biodisponibilité orale élevée est un facteur important pour le développement de molécules bioactives en tant que agents thérapeutiques. La réduction de la flexibilité moléculaire (mesurée par le nombre de liaisons rotatives) et la faible surface polaire sont des prédicateurs importants de la bonne biodisponibilité orale [29].

Le Tableau V 5 présente les résultats des propriétés concernant la règle de *Veber*. Ces résultats sont calculés et obtenus en utilisant le logiciel Molinspiration.

Tableau V 5: Résultats de l'application de la règle Veber

<i>Composé</i>	<i>TPSA</i>	<i>Nrotb</i>
<i>5-HMAP</i>	67.79	8
<i>4-HNAP</i>	113.62	9
<i>5-HNAP</i>	113.62	9
<i>ACAR</i>	321.16	9
<i>GALANT</i>	41.93	1
<i>GENT</i>	199.74	7
<i>IBUP</i>	37.03	4

ACAR. acarbose; **GALANT.** Galantamine; **GENT.** Gentamicine ; **IBUP.** Ibuprofène ;

TPSA. Surface polaire topologique ; **nrotb.** Nombre de liaisons rotatives.

- Les résultats regroupés dans ce tableau montrent que la TPSA de tous les composés testés se situe dans la limite de 67.79-113.62 Å. Sachant que, la surface topologique polaire (TPSA) est un paramètre très utile pour la prédiction des propriétés de transport des médicaments. Ce paramètre a été représenté pour une meilleure corrélation d'absorption intestinale dans le corps humain, la perméabilité CaCo monocouches, et la pénétration barrière hémato-encéphalique. Ces valeurs sont en accord avec les règles *Veber*. Il convient alors de dire qu'ils ont une bonne biodisponibilité par voie orale.

- Tous nos composés ont 8 à 9 liaisons rotatives supérieures aux ligands de références (1 à 9). Un faible nombre des liaisons rotatives implique une flexibilité réduite pour la majorité des composés de références ce qui indique que ces ligands lors de la liaison à une protéine ne changent que légèrement leur conformation, en concluant donc que nos molécules sont flexibles et par conséquent ils ont une bonne biodisponibilité orale.

- Les trois ligands α -aminophosphonates s'inscrivent parfaitement dans la marge des critères imposés par la règle de *veber*. Cela montre que ces ligands sont capables de présenter une activité biologique sans avoir des problèmes d'absorption par voie orale [28,39].

- ***Application de la Règle de Ghose***

En plus des deux règles précédentes, le logiciel SwissADME nous donne également la possibilité d'évaluer les paramètres de la règle de *Ghose*. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau V 6.

Tableau V 6: Résultats d'application de la Règle de Ghose et du score de biodisponibilité

<i>Composé</i>	<i>MW</i>	<i>WLOGP</i>	<i>RM.</i> <i>m³/mol</i>	<i>Nombre</i> <i>d'atomes</i>	<i>Score de</i> <i>biodisponibilité</i>
5-HMAP	349.36	4.56	97.29	48	0.55
4-HNAP	380.34	4.16	101.14	47	0.55
5-HNAP	380.34	4.16	101.14	47	0.55
ACAR	645.61	-8.53	136.69	77	0.17
GALANT	287.35	1.32	84.05	42	0.55
GENT	477.60	-3.33	118.31	76	0.17
IBUP	206.28	3.07	62.18	33	0.85

ACAR. acarbose; **GALANT.** Galantamine; **GENT.** Gentamycine ; **IBUP.** Ibuprofène ; **RM.** éfractivité molaire ; **WLOGP.** Logarithme de la partition composée calculé par la méthode atomistique cité par Wildman et Crippen [40] ; **N.atom.** le nombre d'atome.

De ce tableau, il est intéressant de noter que :

- Toutes les valeurs de masse moléculaire de nos composés sont comprises dans l'intervalle $160 \leq \text{masse} \leq 480$. Cependant la masse de médicament antidiabétique *acarbose* est supérieure 480.
- Les valeurs de log P de nos composés allant de 4.16 à 4.55 qui sont toutes comprises dans l'intervalle des normes $-0.4 \leq \log P \leq 5.6$ pour la règle de Ghose, tandis que la valeur de log P pour l'*acarbose* et la *gentamycine* est inférieur à -0.4 (-8.53 et -3.33, respectivement), il est a noté que le filtre de Ghose est la méthode détaillée dans la publication originale cité par *Wildman et Crippen* [41], où le log atomique P est calculé avec *WLOGP*.
- La réfractivité molaire (RM) des composés synthétisés (5-HMAP, 4-HNAP et 5-HNAP) est jugée dans la plage des normes de la règle de *Ghose* $40 \leq \text{réfractivité} \leq 130$. Alors que, l'*acarbose* possède une valeur de réfractivité plus de 130.
- Les molécules α -aminophosphonates synthétisées sont en accord avec la règle de *Ghose* pour les valeurs du nombre d'atome des composés qui allant de 47 à 48 atomes qu'il comprit dans l'intervalle de règle de *ghose* $20 \leq \text{nombre d'atomes} \leq 70$. Alors que la *gentamycine* et l'*acarbose* dépassent cet intervalle avec un nombre d'atome de 76 et 77, respectivement.

- Le score de biodisponibilité de nos produits est égal à 0.55 qui est supérieur à celle de l'*acarbose* et la *gentamycine*, ce qui montre que ces produits ayant une bonne biodisponibilité par rapport aux ces deux références. Cependant l'*ibuprofène* qui a un score égal à 0.85 possède une biodisponibilité très élevée par rapport aux nos molécules.

D'après les résultats précédents, nous pouvons dire que tous les composés possèdent une bonne absorption orale qui entraîne une bonne biodisponibilité.

Enfin, on peut constater que les composés 5-HMAP, 4-HNAP, 5-HNAP, galentamine et ibuprofène valident et répondent aux règles de *Ghose* avec aucune violation, alors que les médicaments *acarbose* avec 4 violation et *gentamycine* avec 2 violations ne répondent pas à cette règle sans aucune violation. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus par les trois règles de drug-likeness.

Tableau V 7: Les résultats obtenus par les trois règles de drug-likeness

<i>Composé</i>	<i>Lipinski</i>	<i>Veber</i>	<i>Ghose</i>
5-HMAP	Oui	Oui	Oui
4-HNAP	Oui	Oui	Oui
5-HNAP	Oui	Oui	Oui
ACAR	Non (3 violation, MW> 500, HBD>5, HBA>10)	Non (1 violation, TPCA>140)	Non (4 violation, MW> 480, WLOGP≤-0.4, n.atoms>70)
GALANT	Oui	Oui	Oui
GENT	Non (2 violation, HBD>5, HBA>10)	Non (1 violation, TPCA>140)	Non (2 violation, WLOGP≤ -0.4, n.atoms>70)
IBUP	Oui	Oui	Oui

ACAR. acarbose ; **GALANT.** Galantamine ; **GENT.** Gentamycine ; **IBUP.** Ibuprofène ;

MW. Masse moléculaire ; **HBD.** Nombre de donneurs de liaisons hydrogène ; **HBA.**

Nombre d'accepteurs de liaison hydrogène ; **TPCA.** Surface polaire topologique ;

WLOGP. Logarithme de la partition composée calculé par la méthode atomistique cité par

Wildman et Crippen [40] ; **n. atoms.** Nombre des atomes.

Les résultats de calcul montrent que tous les composés synthétisés sont en accord avec les règles de drug-likeness de *Lipinski et Ghose* ; ce qui suggère que ces composés

théoriquement n'auraient pas des problèmes avec la biodisponibilité orale, de plus ces dérivés s'inscrivent parfaitement dans la marge des critères imposés par la règle de *Veber*. Ce qui montre qu'ils sont capables de présenter une activité biologique sans avoir des problèmes d'absorption par voie orale.

V.3.6.2 Score de bioactivité

Les résultats précédents montrent que tous les composés testés ont des propriétés physicochimiques dans les critères acceptables. Ainsi, ces paramètres servent de guide pour un criblage plus approfondi des diester α -aminophosphonates synthétisés comme : [Ligand des récepteurs couplés à la protéine G (GPCRL) ; Modulateur des canaux ioniques (ICM) ; Inhibiteur de kinase (KI) ; Ligand des récepteurs nucléaires (NRL) ; Inhibiteur de protéase (PI)].

Les scores de bioactivité prédites de nos composés ainsi que leur comparaison avec les médicaments standards utilisés comme des standards positifs dans les tests des activités biologiques sont résumés dans le Tableau ci-dessous en utilisant le logiciel Molinspiration "test en ligne".

Tableau V 8: Score de bioactivité des composés prédits par Molinspiration.

<i>Composé</i>	<i>GPCR Ligand</i>	<i>ICM</i>	<i>KI</i>	<i>NRL</i>	<i>PI</i>	<i>EI</i>
<i>5-HMAP</i>	-0.44	-0.12	-0.39	-0.45	-0.08	-0.09
<i>4-HNAP</i>	-0.51	-0.09	-0.46	-0.51	-0.15	-0.14
<i>5-HNAP</i>	-0.52	-0.11	-0.46	-0.53	-0.16	-0.14
<i>ACAR</i>	-0.02	-0.49	-0.33	-0.29	0.21	0.21
<i>GALANT</i>	0.91	0.82	0.27	0.80	0.72	1.08
<i>GENT</i>	0.34	0.19	0.18	-0.06	0.66	0.46
<i>IBUP</i>	-0.17	-0.01	-0.72	0.05	-0.21	0.12

ACAR. Acarbose ; **GALANT.** Galantamine ; **GENT.** Gentamycine ; **IBUP.** Ibuprofène ; **GPCRL.** GPCR-ligand ; **ICM.** Modulateur de canal ionique ; **KI.** Inhibiteur de kinase ; **NRL.** Ligand du récepteur nucléaire ; **PI.** Inhibiteur de protéase ; **EI.** Inhibiteur d'enzyme.

Généralement, les scores de bioactivité compris entre 0.0 et 5.0 peuvent se référer à des activités biologiques significatives des composés, tandis que les scores de bioactivité

compris entre -5.0 et 0.0 sont référés aux composés modérément actifs. Enfin, si les scores de bioactivité sont < -5.0 , le composé est inactif [42,43].

Sur la base de ces observations, les résultats du tableau V 8 ont démontré que les dérivés α -aminophosphonates synthétisés peuvent être moins actifs que les standards (acarbose, galanthmine, gentamicyne et ibuprofene). Ainsi :

a) GPCR : tous nos composés se sont avérés modérément bioactifs avec des scores de bioactivité de -0.44, -0.51 et -0.51 pour les dérivés 5-HMAP, 4-HMAP et 5-HNAP, respectivement, en comparant aux standards (-0.17 à 0.91).

b) Canal ionique : tous nos composés se sont révélés être modérément actifs avec des scores de bioactivité de -0.11, -0.09 et -0.12 pour les dérivés 5-HMAP, 4-HNAP et 5-HNAP, respectivement, se comparant aux références qu'ils ont des activités biologiques considérables.

c) Protéine kinase : les scores de bioactivité pour les dérivés α -aminophosphonates étudiés sont -0,39, -0.46 et -0.46, qui sont comparables aux standards (-0.72 à 0.27).

d) Récepteur nucléaire : le 5-HMAP, le 5-HNAP et le 4-HNAP se sont révélés être modérément actives, ainsi leurs scores de bioactivité étaient de -0.45, -0.51 et -0.53 respectivement. De ces résultats les molécules sont présumées modérément actives.

e) Récepteurs activés par la protéase : tous nos composés se sont révélés modérément bioactifs avec des scores de bioactivité varies entre -0.08 et -0.16, de même pour les références qui ont des scores de bioactivité compris entre -0.21 et -0.72.

V.3.6.3 Propriétés ADME –TOX

Les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion (*ADME*) et de toxicité sont généralement appliqués aux ensembles de tests utilisés pour caractériser les composés selon leur absorption par les intestins, distribution dans l'organisme, métabolisme par le foie, excrétion par les reins et profil de toxicité [44,45].

L'étude des paramètres pharmacocinétiques (*ADME-Tox*) pour les trois composés est très importante afin de comprendre la capacité de ces composés à produire un effet thérapeutique comme souhaité et à éviter la survenue d'effets secondaires pouvant entraîner des résultats négatifs, d'un côté, et de déterminer plus facilement le meilleur

composé potentiel de tous les composés synthétisés ainsi de le comparer aux standards utilisés dans l'étude *in vitro* de l'activité biologique, d'un autre côté.

Ces propriétés ont été calculées par le logiciel SwissADME [36], et leurs valeurs sont présentées dans les deux tableaux V 9 et V 10.

V.3.6.3.1 Absorption et distribution

Tableau V 9 : Préviation des paramètres pharmacocinétiques des molécules α -aminophosphonates (GI; absorption gastrointestinale, BHE; barrière hémato-encéphalique ; Log-Kp ; Coefficient de perméabilité cutanée)

<i>Composé</i>	<i>GI</i>	<i>BHE</i>	<i>Log-Kp (Cm/S)</i>
5-HMAP	Elevé	non	-5.93 Cm/S
4-HNAP	Elevé	non	-6.50 Cm/S
5-HNAP	Elevé	non	-6.50 Cm/S
ACAR	Faible	non	-16.29 Cm/S
GALAN	Elevé	Oui	-7.18 Cm/S
GENT	Faible	non	-12.12 Cm/S
IBUPR	Elevé	Oui	-5.07 Cm/S

ACAR. Acarbose ; **GALANT.** Galanthamine ; **GENT.** Gentamicyne; **IBUP.** Ibuprofene

- Les trois molécules synthétisées et les deux standards la *galentamine* et l'*ibuprofene* ont une absorption intestinale élevée ce qui montre que ces composés peuvent être très absorbés par le tractus gastro-intestinal lors d'une administration orale. Tandis que les deux autres références l'*acarbose* et la *gentamycine* ont une absorption faible, donc ils ayant une mauvaise absorption par le tractus gastro-intestinal.

-Pour tous les composés la pénétration à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) est négative. Généralement, la BHE c'est une barrière plus sélective que la barrière intestinale. Elle se caractérise par la présence de jonctions serrées et de jonctions adhérentes et constitue une barrière physique contre le passage des xénobiotiques.

Les valeurs de log-kp de 5-HMAP, 4-HNAP et de 5-HNAP sont -5.93 Cm/S, -6.50 Cm/S et -6.50 Cm/S, respectivement. La valeur -5.93 Cm/S est la moins négative et elle correspond au composé 5-HMAP. Sachant que plus le log-Kp est négatif (avec Kp en cm /

s), moins la peau est perméante à la molécule [46], donc le 5-HMAP est plus perméant par la peau. Tandis que l'acarbose possède la valeur de $\log\text{-}k_p$ la plus négative (-16.29 Cm/S), indique que l'acarbose est moins perméante par la peau.

V.3.6.3.2 Métabolisme

La phase métabolique des trois composés est prédite par le serveur SwissADME (Tableau V 10). Une classe très importante d'enzymes responsables de nombreux problèmes *ADME-TOX* est celle des cytochromes (CYP450) [47,48], qui est impliqué dans le métabolisme des médicaments, des acides gras, des stéroïdes et des acides biliaires. Le métabolisme des médicaments via les isoenzymes CYP ou la production de métabolites non désirés est un déterminant important des interactions médicamenteuses qui peuvent conduire à des toxicités médicamenteuses et à une réduction de l'effet pharmacologique.

La P-gp est largement distribuée et exprimée dans l'épithélium intestinal, où elle renvoie les xénobiotiques tels que les médicaments dans la lumière intestinale, et dans les cellules endothéliales capillaires composant la barrière hémato-encéphalique, où elle les renvoie dans les capillaires. Les modèles renvoient "Oui" ou "Non" si la molécule étudiée a une probabilité plus élevée d'être un substrat ou un non-substrat de la P-gp ou un inhibiteur ou un non-inhibiteur d'un CYP donné.

Tableau V 10 : Résultats propriétés de métabolisme des ligands synthétisés et des ligands de références

<i>Composé</i>	<i>P-gp</i>	<i>CYP1A2</i> <i>inhibiteur</i>	<i>CYP2C19</i> <i>inhibiteur</i>	<i>CYP2C9</i> <i>inhibiteur</i>	<i>CYP2d6</i> <i>inhibiteur</i>	<i>CYP3A</i> <i>inhibiteur</i>
5-HMAP	oui	Non	inhibiteur	inhibiteur	inhibiteur	inhibiteur
4-HNAP	oui	Non	inhibiteur	inhibiteur	inhibiteur	inhibiteur
5-HNAP	oui	Non	inhibiteur	inhibiteur	inhibiteur	inhibiteur
ACARB	oui	Non	non	non	Non	non
GALAN	non	Non	non	non	Non	non
GENT	oui	Non	non	non	Non	non
IBUPR	non	Non	non	non	Non	non

ACAR. Acarbose ; **GALANT.** Galantamine ; **GENT.** Gentamycine ; **IBUP.** Ibuprofène ;
CYP. L'enzyme cytochrome P ; **P-gp.** P-glycoprotéine.

Les résultats présentés dans (le tableau V 10) indiquent que tous les composés sont des substrats de la P-gp ce qui signifie qu'ils auront une augmentation de la biodisponibilité. Tandis que les composés de références la *galentamine* et l'*ibuprofène* ne sont pas des substrats de la P-gp par conséquent, la réduction de la biodisponibilité de ces composés.

D'autre part, on peut noter que tous les composés inhibent les isoenzymes CYP2C19, CYP2C9, CYP2d6 et CYP3A par conséquent, les effets indésirables résultant des interactions médicamenteuses lors de l'administration orale de ces composés sont probables [47]. Maintenant, une expérience biologique sera nécessaire pour déterminer si les esters α -aminophosphonates sont activés ou désactivés par les CYP2C19, CYP2C9, CYP2d6 et CYP3A.

De plus, on note que tous les composés n'étaient pas des inhibiteurs du CYP1A2. Les résultats suggèrent que tous les produits testés pourraient être bien métabolisés par le CYP1A2, facilement éliminés du corps et causant ainsi peu de toxicité.

V.3.6.3.3 Risques de toxicité

Les risques de toxicité (mutagénicité, tumorigénicité, irritation, reproduction) et les propriétés physicochimiques (cLogP, solubilité, ressemblance et score du médicament) des composés synthétisés ainsi des références sont calculés par la méthodologie développée par Osiris [35,49] et illustrée dans le tableau V 11. Le prédicteur de risque de toxicité localise des fragments dans une molécule, indiquant un risque potentiel de toxicité. Ces alertes indiquent que la structure dessinée peut être nocive concernant la catégorie de risque spécifiée.

Tableau V 11 : Risques de toxicité et drug-score estimés par Osiris

Composé	Risque de toxicité				Calculs d'Osiris			
	MUT	TUMO	IRRI	REP	CLP	S	DL	DS
5-HMAP	■	■	■	■	3.26	-3.64	-34.3	0.39
4-HNAP	■	■	■	■	1.99	-3.75	-40.9	0.39
5-HNAP	■	■	■	■	1.99	-3.75	-39.8	0.39
ACAR	■	■	■	■	-7.18	0.59	-7.4	0.29
GALANT	■	■	■	■	0.9	-2.0	4.7	0.93
GENT	■	■	■	■	-4.21	-1.18	4.88	0.77
IBUP	■	■	■	■	3.0	-2.89	3.97	0.31

■ : non toxique; ■ : hautement toxique ; **MUT** : mutagénique ; **TUMO** : tumorigénique; **IRRI** : Irritant; **REP** : Reproduction efficace; **CLP** : cLogP; **S** : Solubility; **DL** : Drug-likeness; **DS** : Drug-Score ; **ACAR** : Acarbose ; **GALANT** : Galantamine ; **GENT** : Gentamycine ; **IBUP** : Ibuprofène.

Selon les données évaluées dans le tableau V 11, les trois composés 5-HMAP, 4-HNAP et 5-HNAP, ainsi que les molécules de références ont des structures supposées non mutagènes, non irritantes et sans effets sur la reproduction lors de l'exécution de l'étude de mutagénicité à l'exception du médicament antiinflammatoire l'*ibuprofène* qui présente un grand risque de tumorigénicité lors de la reproduction avec une structure mutagène.

De faibles hydrophilicités et de faibles valeurs de CLP (cLogP) peuvent entraîner une bonne absorption ou perméation. Il a été démontré que pour que les composés aient une probabilité raisonnable de bonne absorption, leur valeur CLP ne doit pas être

supérieure à 5,0. Sur cette base, tous les composés possèdent des valeurs cLogP bien inférieures à 5.

La solubilité est l'une des principales propriétés physico-chimiques. Cette valeur exprimée en Log S affecte de manière significative ses caractéristiques d'absorption et de distribution. Généralement, une faible solubilité va de pair avec une mauvaise absorption et l'objectif général est donc d'éviter les composés peu solubles. Plus de 80 % des médicaments sur le marché ont une valeur S (estimée) supérieure à (-4) [49–51]. D'après les résultats obtenus, nous constatons que : Les trois composés 5-HMAP, 4-HNAP et 5-HNAP ont une solubilité aqueuse acceptable, car, leurs valeurs du log S : (-3.64, -3.75 et -3.75), respectivement, sont des valeurs supérieures à la valeur optimale (-4), de même pour tous les molécules de référence, qui ils ont des valeurs de log S supérieures à -4.

En outre, le tableau V 11 montre la ressemblance avec les médicaments des composés « Drug-likeness » qui ne sont pas dans la zone de comparaison avec les médicaments standards utilisés.

De plus, le score de médicament combine le drug-likeness, le CLP, le log S, le poids moléculaire et les risques de toxicité en une seule valeur pratique qui peut être utilisée pour juger du potentiel global du composé à devenir un médicament. Cette valeur est calculée en multipliant les contributions des propriétés individuelles avec l'équation (V .12) [49]:

$$DS = \pi\left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2S_i}\right)\pi t_i \quad (\text{V .12})$$

$$S_i = 1/(1 + e^{api+b}) \quad (\text{V .13})$$

Où :

- DS est le score du médicament.
- S_i est la contribution calculée directement à partir de CLP, log S, poids moléculaire et DL.
- (π) via l'équation (V .13), qui décrit une courbe spline. Les paramètres a et b sont (1,5), (1,5), (0,0126) et (1,0) pour CLP, log S, poids moléculaire et drug-likeness, respectivement.

- t_i est la contribution des quatre types de risque de toxicité. Les valeurs de t_i sont 1,0, 0,8 et 0,6 pour les catégories suivantes aucun risque, risque moyen et risque élevé, respectivement [49].

Les composés α -aminophosphonates 5-HPAH, 5-HNAP et 4-HNAP ont montré un score médicamenteux bon par rapport aux médicaments standards acabrose et ibuprofene et modéré par rapport aux autres médicaments standards utilisés (tableau V 11).

V.4 Méthodes non quantiques (empirique) par l'amarrage moléculaire

V.4.1 Docking Moléculaire

Le docking (amarrage ou arrimage) moléculaire est une méthode empirique qui permet de prédire l'affinité entre deux molécules. Cet outil est actuellement très sollicité dans la recherche de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Il est utilisé pour faire des criblages très rapides et peu coûteux afin d'identifier une molécule pouvant avoir une forte activité sur une protéine cible ou au contraire d'identifier la cible d'une molécule ayant des activités biologiques intéressantes [52].

Il est généralement utilisé pour prédire l'affinité d'un ligand pour une protéine, entre autre, la position et l'orientation la plus favorable pour un ligand venant en interaction avec une protéine cible. D'autres parts, lorsque la structure tridimensionnelle d'une protéine cible est définie, le *docking* permet de mettre en évidence les régions et les résidus à explorer pour optimiser l'affinité d'un ligand avec cette cible. Ainsi, il est également utilisé pour optimiser la sélectivité d'une molécule entre deux ou plusieurs protéines, cette affinité est estimée à travers la valeur de l'énergie libre de liaison ($\Delta G_{binding}$) appelé score et donnée par l'équation suivante :

$$\Delta G_{binding} = G_{complexe} - (G_{cible} + G_{ligand}) \quad (V.12)$$

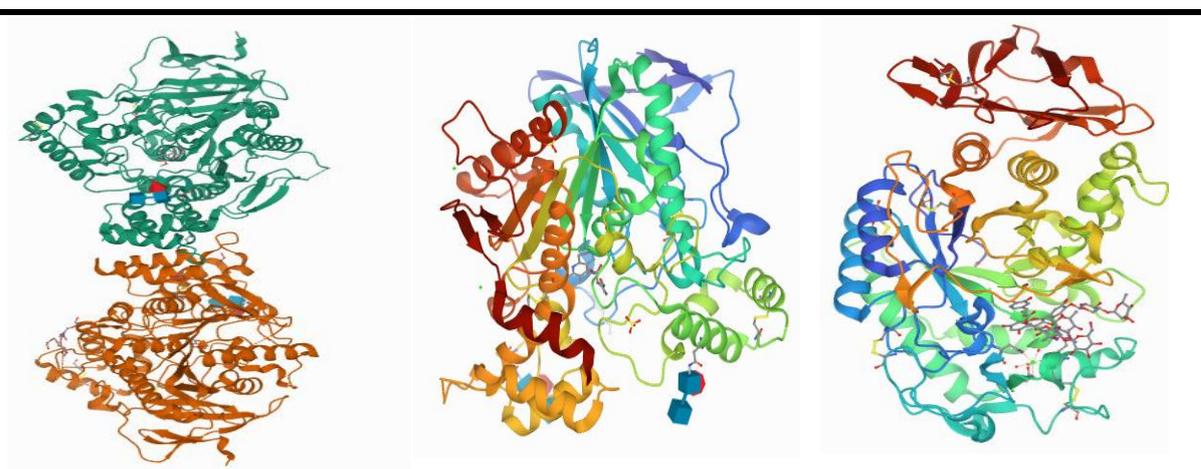
Plus elle est faible, plus le complexe protéine-ligand est stable [53].

V.4.2 Logiciel et protocole utilisés

Afin d'obtenir un aperçu fonctionnel et structurel du mécanisme d'interaction des composés α -aminophosphonates synthétisés avec les protéines ciblées, une simulation par *docking* moléculaire a été réalisée à l'aide du logiciel *Maestro version 11.1*.

Dans ce contexte, cette étude est réalisée pour évaluer les interactions et les différents liaisons formées entre les ligands synthétisés et les enzymes qui ont une activité inhibitrice *in vitro* à savoir, l'AChE, le BChE et l'alpha-amylase.

La sélection de l'AChE et BChE est due à leur importance dans le traitement d'Alzheimer, tandis que, la sélection d'alpha-amylase comme cible pour l'étude de docking est due à son rôle important dans le traitement de diabète de type 2. Les structures cristallines d'AChE, BChE et d'alpha-amylase ont été extraites de la base de données des protéines PDB avec les codes *4EY6*, *4BDS* et *4W93*, respectivement (figure V 5).



l'acétylcholinestérase

Butyrylcholinestérase

Alpha-amylase pancréatique

humaine en complexe avec la galantamine

humaine en complexe avec la tacrine

humaine en complexe avec la montbrétine

A

DOI: [10.2210/pdb4EY6/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb4EY6/pdb)

DOI: [10.2210/pdb4BDS/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb4BDS/pdb)

DOI: [10.2210/pdb4W93/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb4W93/pdb)

Figure V 5 : Structures cristallines des trois enzymes ciblées dans l'étude du docking moléculaire extraites de la base de données des protéines PDB

Le logiciel **Maestro version 11.1** a été utilisé pour exécuter le processus de docking moléculaire tout en éliminant l'eau et en optimisant les liaisons H. La minimisation de la molécule d'atome lourd à RMSD (0.30Å) en utilisant le champ de force OPLS ont été utilisés pour libérer le processus de minimisation. La protéine a été préparée en éliminant les molécules d'eau, les atomes inutiles, en supprimant les conformations alternatives et en ajoutant de l'hydrogène.

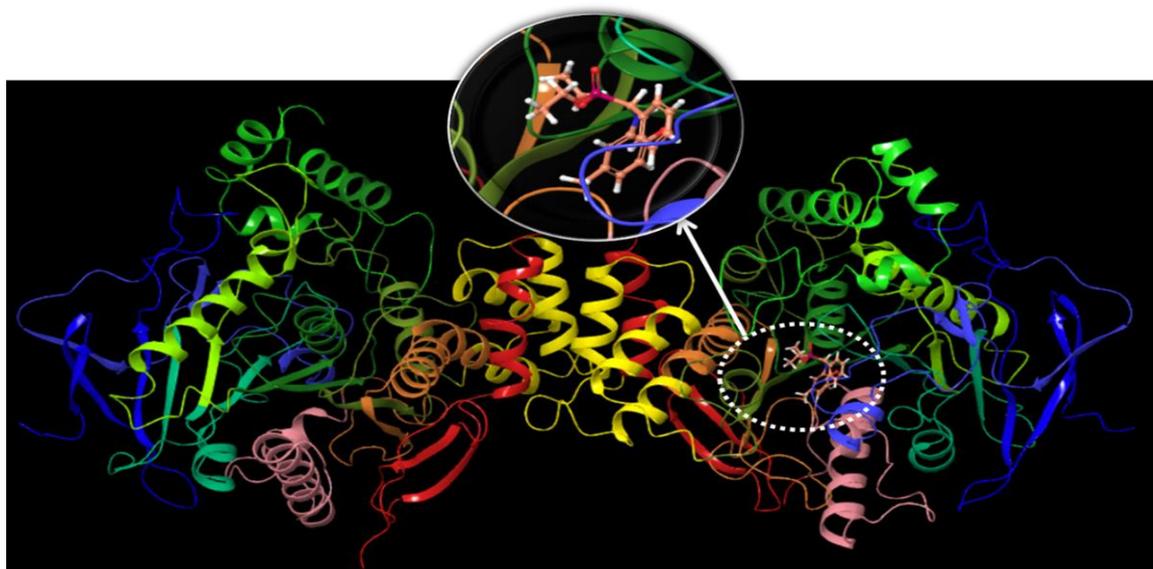
La génération de la grille décrit une région dans un récepteur où une interaction de liaison peut se produire. Pour les ligands 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP, nous avons appliqué les géométries optimisées obtenues en utilisant la méthode DFT au niveau B3LYP/6-31 G (d,p). [54].

Il y a fondamentalement quatre étapes impliquées dans les scores de docking qui comprennent HTVS (dépistage virtuel à haut débit), SP (précision standard), XP (précision supplémentaire) docking, et suivi par le calcul de l'énergie libre de liaison basé sur MM-GBSA pour les complexes ligand-protéine les mieux notés [8].

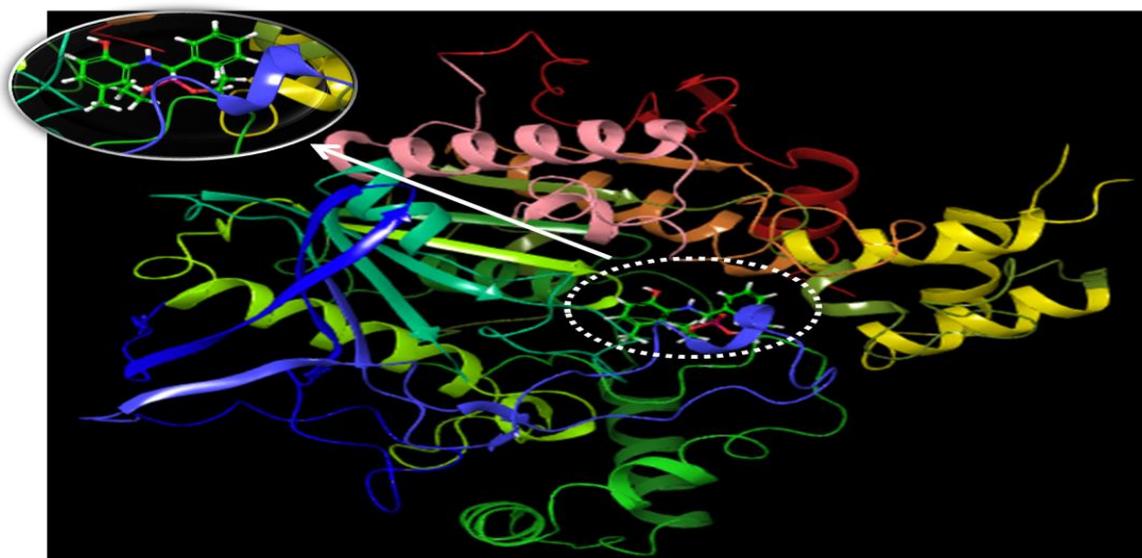
V.4.3 Les Résultats du docking moléculaire

V.4.3.1 Résultats du docking moléculaire avec l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase

Le docking moléculaire entre les ligands synthétisés et les récepteurs acétylcholinestérase (*4EY6*) et butyrylcholinestérase (*4BDS*) a été exécuté pour définir la conformation appropriée des diesters α -aminophosphonates synthétisés dans les récepteurs et les forces secondaires qui en résultent entre ces molécules et les acides aminés actifs des récepteurs. La figure V 6 représente les structures cristallines des meilleurs modes d'amarrage des complexes 5-HMAP-AChE et 5-HMAP-BChE. Nous pouvons observer sur les figures (V 6a) et (V 6b) que le ligand préfère se lier dans la poche interne des deux enzymes AChE et BChE.



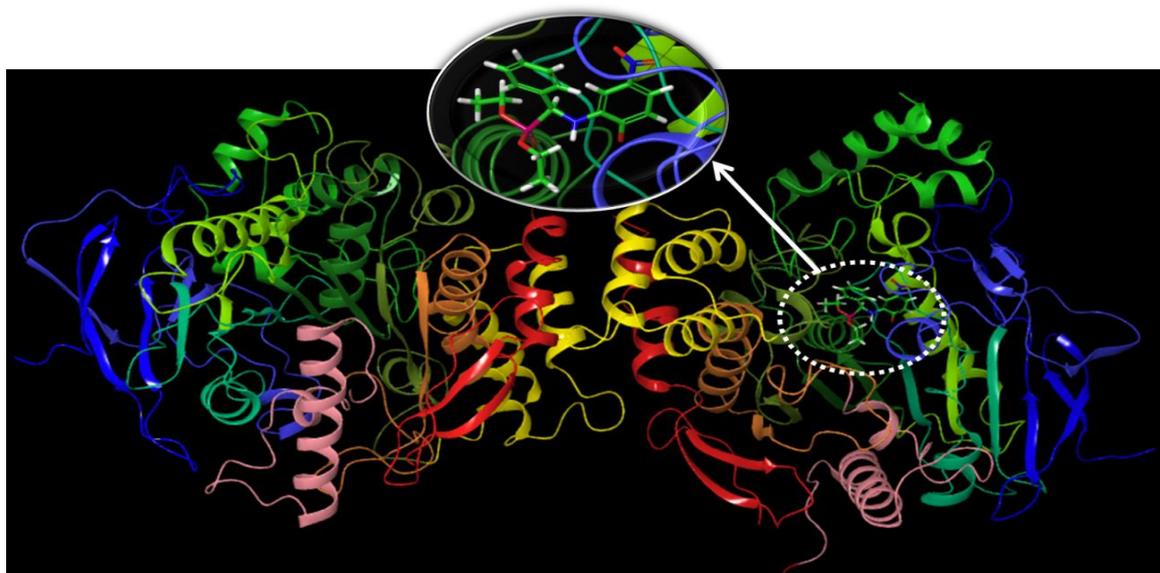
(a)



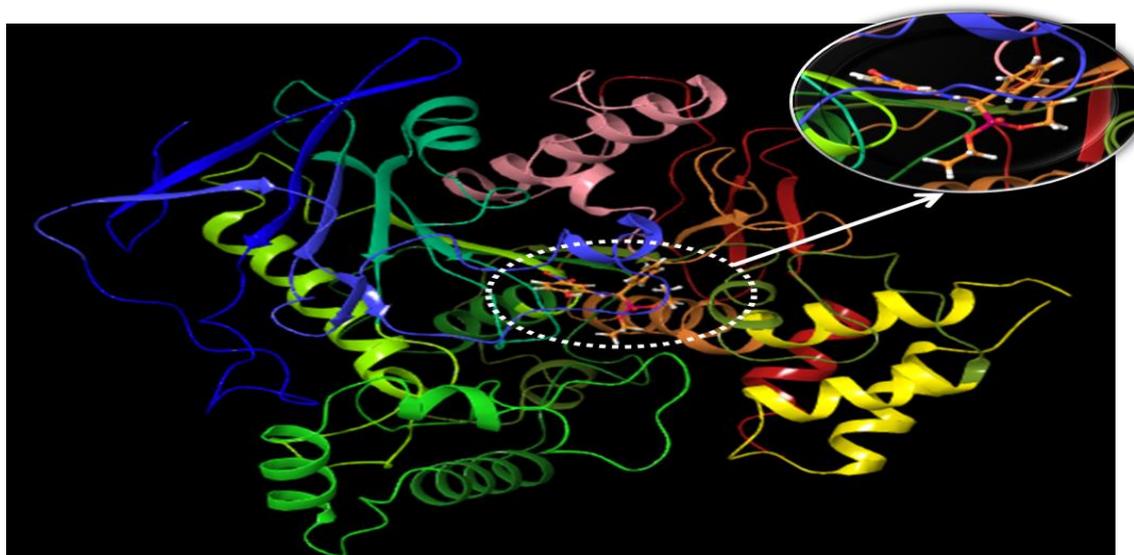
(b)

Figure V 6: Visualisation des meilleures poses de docking de 5-HMAP avec l'acétylcholinestérase (a) et la butyrylcholinestérase (b)

Pour le 5-HNAP Nous pouvons observer sur les figures V 7(a et b) que le ligand préfère se lier dans la poche interne des deux enzymes AChE et BChE.



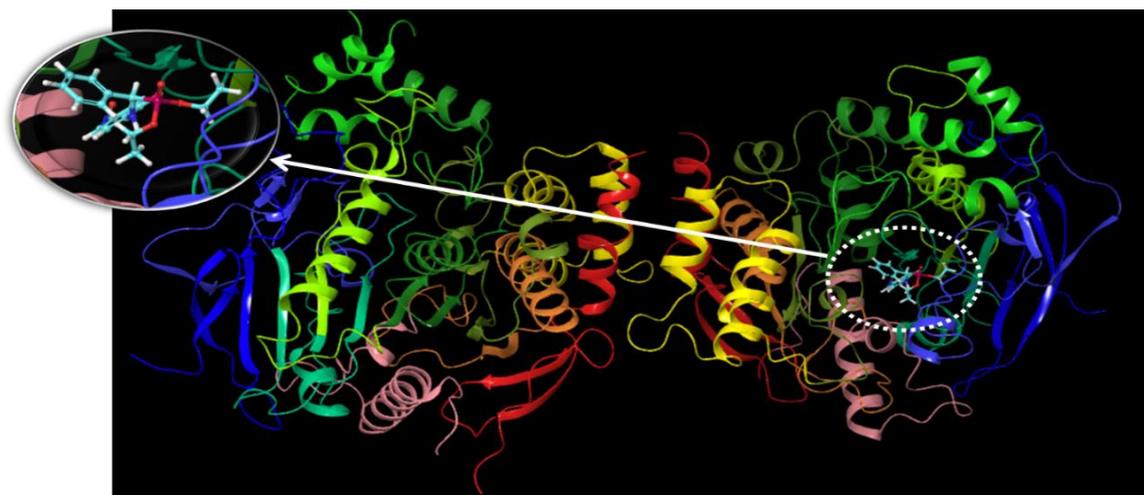
(a)



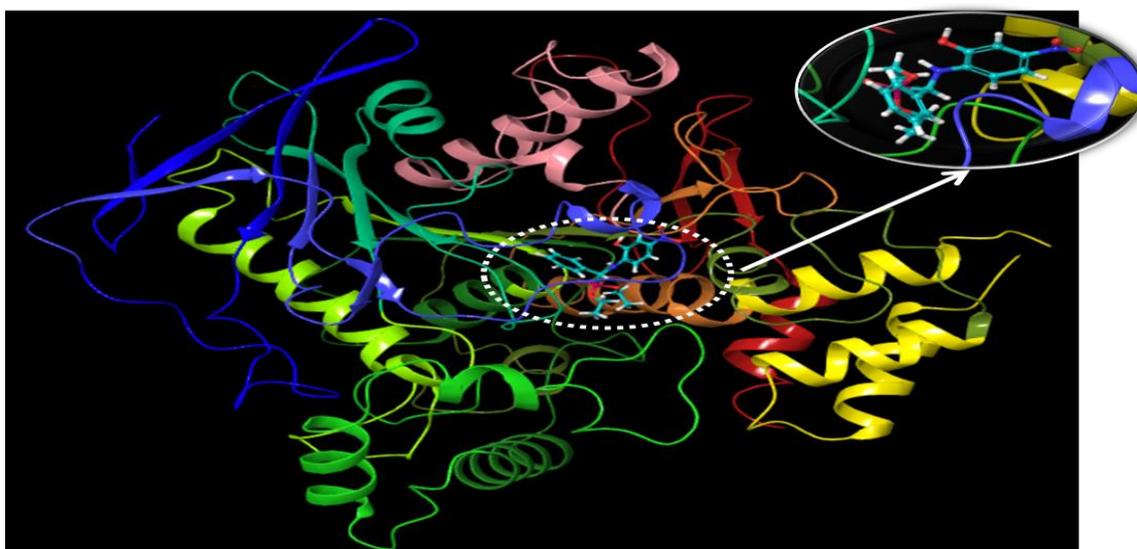
(b)

Figure V 7: Visualisation des meilleures poses de docking de 5-HNAP avec l'acétylcholinestérase (a) et la butyrylcholinestérase (b)

De plus, la vue de surface des conformations ancrées du dérivé 4-HNAP obtenue à partir de l'analyse d'amarrage a montré que ce ligand placé dans la poche interne des deux enzymes AChE et BChE (Figure V 8).



(a)



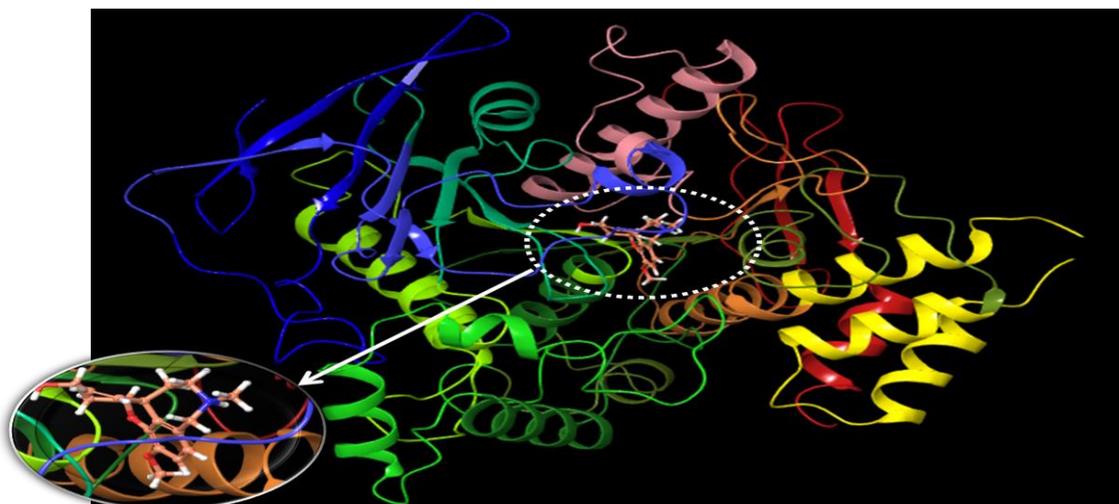
(b)

Figure V 8: Visualisation des meilleures poses de docking de 4-HNAP avec l'acétylcholinestérase (a) et la butyrylcholinestérase (b)

Enfin, Nous pouvons observer sur les figures V 9(a et b) que la galentamine préfère se lier dans la poche interne des deux enzymes AChE et BChE.



(a)



(b)

Figure V 9 : Visualisation des meilleures poses de docking de la galantamine avec l'acétylcholinestérase (a) et la butyrylcholinestérase (b)

Le paramètre le plus important parmi les paramètres obtenus à partir de l'interaction des molécules 5-HMAP, 5-HNAP, 4-HNAP et la Galantamine avec les enzymes est le score de docking, qui présente l'activité biologique la plus élevée de la molécule dont la valeur numérique est la plus négative.

Ce paramètre est utilisé pour expliquer les résultats des calculs de docking des molécules étudiées. Les autres paramètres obtenus sont expliqués par l'interaction des molécules avec les enzymes.

Les résultats du docking moléculaire des dérivés α -aminophosphonates synthétisés sont reportés dans le (Tableau V 12) qui présente les énergies d'interaction entre le ligand et l'enzyme ainsi que les valeurs d'IC₅₀ obtenues expérimentalement dans l'étude *in vitro* des molécules synthétisées (Voir chapitre IV).

Tableau V 12 : Résultats du docking moléculaire et d'IC₅₀ des inhibiteurs étudiés avec l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase

<i>enzyme</i>		5-HMAP	5-HNAP	4-HNAP	Galantamine
AChE	Docking Score	-8.28	-7.89	-7.77	-11.11
	Glide energy	-45.01	-48.67	-53.58	-49.82
	hydrogen bonding	-1.44	-0.70	-0.68	-0.96
	Glide ligand efficiency	-0.34	-0.30	-0.29	-0.52
	IC₅₀	64.00±1.8	164.73±2.59	200.58±3.92	6.27±1.15
BChE	Docking Score	-8.34	-7.70	-6.55	-7.73
	Glide energy	-45.46	-48.28	-47.55	-33.78
	hydrogen bonding	-0.70	-0.70	0.70	-1.11
	Glide ligand efficiency	-0.34	-0.29	-0.25	-0.36
	IC₅₀	1.52±0.32	135.80±074	43.60±1.66	34.75±1.99

Ces résultats montrent que nos ligands représentent, du point de vue énergétique, une bonne affinité avec les résidus du site actif ainsi qu' une bonne corrélation entre les résultats expérimentaux et théoriques. (Tableau V 12).

De plus, l'élément le plus important affectant les activités biologiques des molécules est les interactions des molécules avec les enzymes dans les calculs de docking moléculaire. Lorsque ces interactions augmentent, les valeurs d'activité biologique des molécules augmentent [56]. Ces interactions ont de nombreuses interactions telles que les liaisons hydrogène, les interactions hydrophiles et hydrophobes, les liaisons pi-pi et les liaisons halogènes. En général, les interactions hydrophiles incluent des liaisons H tandis que les interactions hydrophobes impliquent des forces de *van der Waals* [8].

Les résultats obtenus par amarrage moléculaire indiquent que tous les dérivés interagissent avec les deux enzymes par la formation de diverses interactions de *liaisons hydrogènes* et *Van der Waals*.

Tout d'abord, le 5-HMAP se lie à l'acétylcholinestérase par des liaisons H avec les acides aminés TRP82, HIS438 et SER198 alors qu'il se lie par une forces de van der Waals de l'ordre de -42.35 kcal/mol. Dans le cas debutyrylcholinestérase, le 5-HMAP interagit par des liaisons H avec les acides aminés TRP82, HIS438 et SER198et il se connecte par forces de van der Waals avec certains acides aminés avec une énergie de liaison de -42.35 kcal/mol (Tableau V 13).

Tableau V 13: Différentes *interactions entre l'inhibiteur 5-HMAP et l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase obtenus par docking moléculaire*

<i>enzyme</i>	<i>ligand</i>	<i>Forces de van der waals</i>	<i>Acides aminés</i>
<i>acétylcholinestérase</i>	<i>5-HMAP</i>	-42.35	<i>TRP82, HIS438, SER198</i>
	<i>5-HNAP</i>	-44.87	<i>SER198, TRP231, PHE329, TRP82</i>
	<i>4-HNAP</i>	-46.12	<i>TRP231, TRP82, PHE329</i>
	<i>Galantamine</i>	-27.99	<i>HIS438, TRP82, ASP70</i>
<i>butyrylcholinestérase</i>	<i>5-HMAP</i>	-42.35	<i>TRP82, HIS438, SER198</i>
	<i>5-HNAP</i>	-44.87	<i>SER198, TRP231, PHE329, TRP82</i>
	<i>4-HNAP</i>	-46.12	<i>TRP231, TRP82, PHE329</i>
	<i>Galantamine</i>	-23.18	<i>GLY115, TYR128, TRP82, HIS438, PHE329</i>

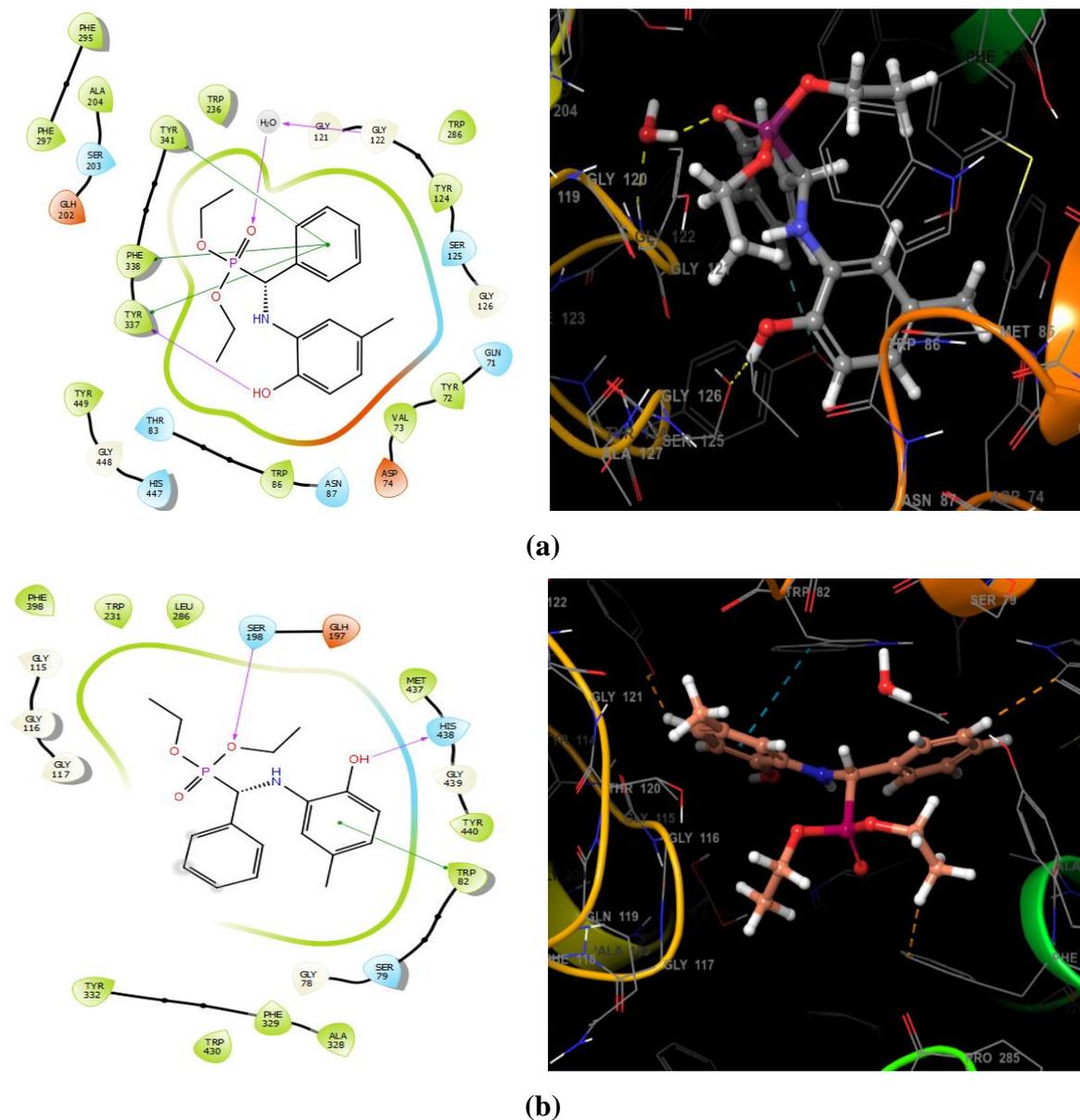


Figure V 10 : Diagrammes d'interaction en 2D et 3D de la molécule 5-HMAP avec l'acétylcholinestérase (a) et la butyrylcholinestérase (b)

Ensuite, la figure V 11 et le tableau V 13 illustrent la présentation détaillée des interactions du ligand 5-HNAP avec l'acétylcholinestérase et la Butyrylcholinestérase. En général, le 5-HNAP se lie à l'acétylcholinestérase par des liaisons H avec les acides aminés SER198, TRP231, PHE329 et TRP82 et par des forces de van der Waals avec certains acides aminés avec une énergie de 44.87 kcal/mol. En ce qui concerne la Butyrylcholinestérase le 5-HNAP interagit par des liaisons H avec les acides aminés SER198, TRP231, PHE329 et TRP82, tandis qu'il se connecte par des forces de van der Waals avec certains acides aminés (figure V 10) avec une énergie de -44.87 kcal/mol (Tableau V 13).

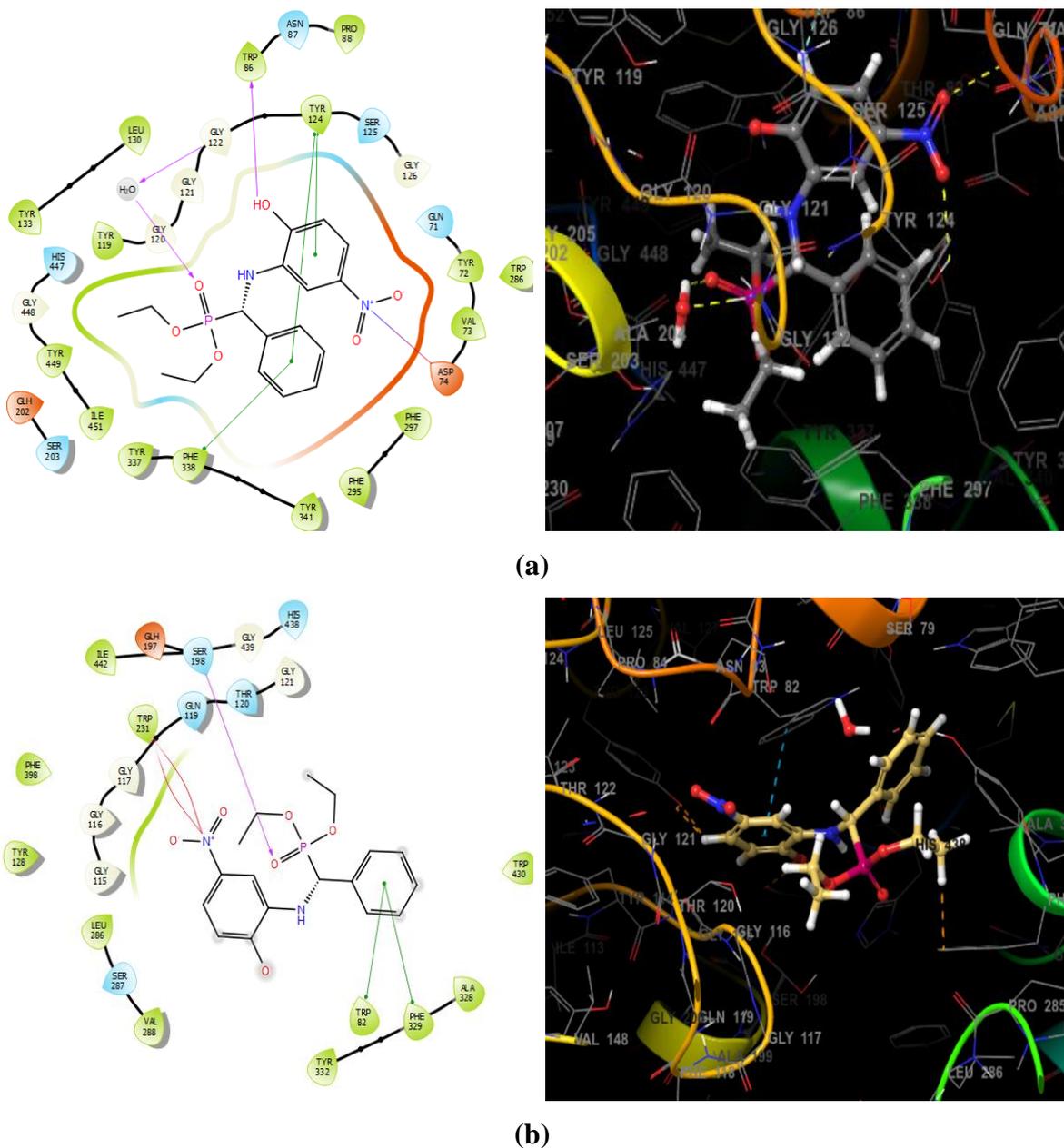


Figure V 11 : Diagrammes d'interaction en 2D et 3D de la molécule 5-HNAP avec l'acétylcholinestérase (a) et la butyrylcholinestérase (b)

De plus, l'analyse de docking moléculaire pour 4-HNAP a indiqué que les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes (forces de van der Waals) sont les deux principales interactions. Dans le cas d'acétylcholinestérase, nous pouvons voir sur la figure V.12(a) que le 4-HNAP interagit par des liaisons H avec les acides aminés TRP231, TRP82 et PHE329, tandis qu'il se connecte par des interactions hydrophobes avec une énergie de liaison de -46.12 kcal/mol. Dans le cas de butyrylcholinestérase, nous pouvons voir sur la figure V 12 (b) que le 4-HNAP interagit par des liaisons hydrogènes avec les acides aminés TRP231, TRP82 et PHE329. En ce qui concerne les forces de van der

Waals, le 4-HNAP se connecte avec une énergie de liaison de -46.12 kcal/mol (tableau V 13) et (figure V 12 (b)).

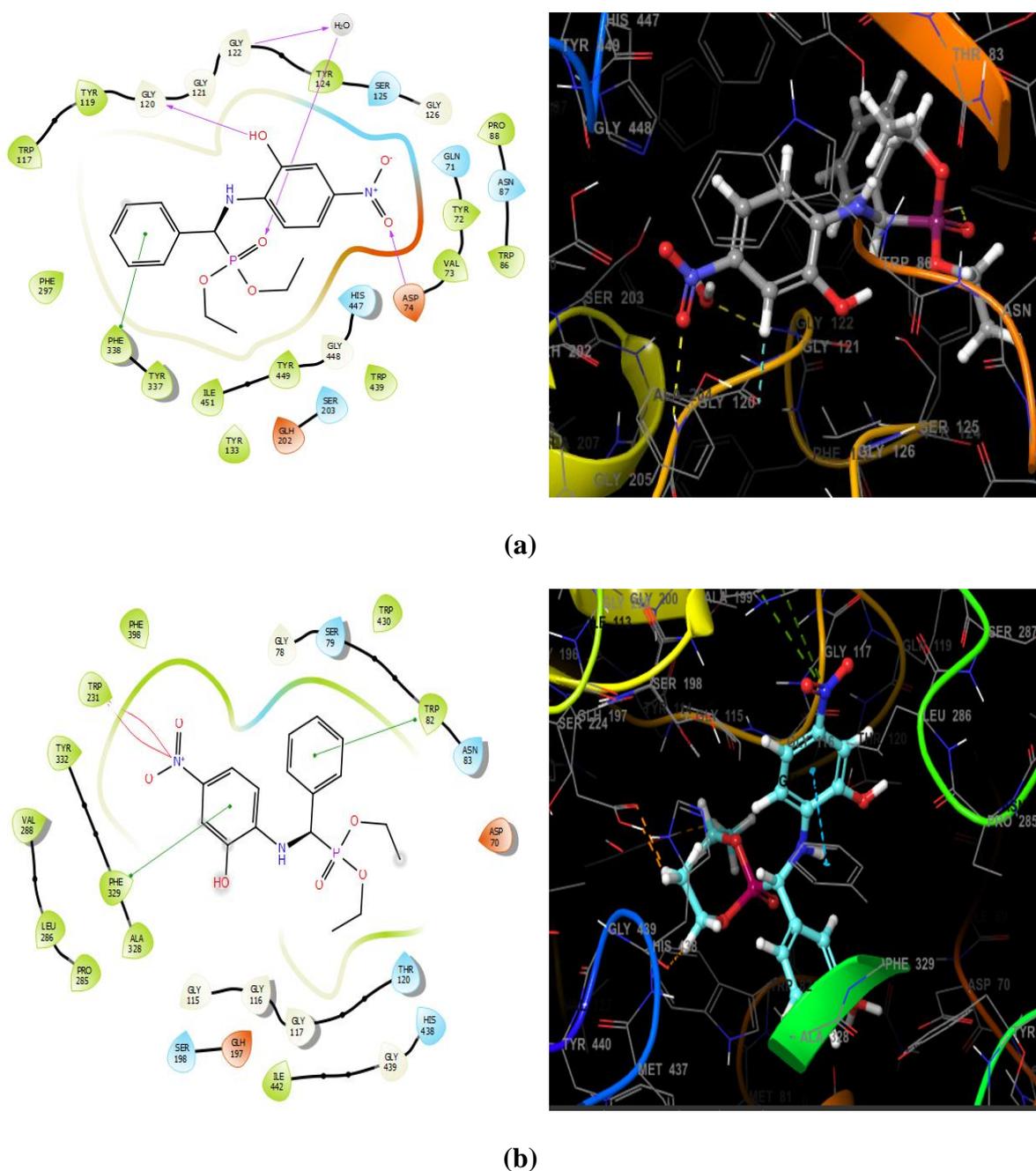


Figure V 12 : Diagrammes d'interaction en 2D et 3D de la molécule 4-HNAP avec l'acétylcholinestérase (a) et la butyrylcholinestérase (b)

Enfin, il apparaît que le standard (la galanthamine) s'adapte favorablement à l'ensemble de la poche de liaison de l'acétylcholinestérase en formant plusieurs interactions de van der Waals avec une énergie de liaison de -27.99 Kcal/mol, en ce qui concerne liaisons hydrogènes la galanthamine se connecte avec : *HIS438*, *TRP82*, *ASP70*. Dans le cas de

butyrylcholinestérase, le la galanthamine interagit par des liaisons H avec les acides aminés GLY115, TYR128, TRP82, HIS438 et PHE329 et il se connecte par forces de van der Waals avec certains acides aminés avec une énergie de liaison de -23.18 kcal/mol (Tableau V 13).

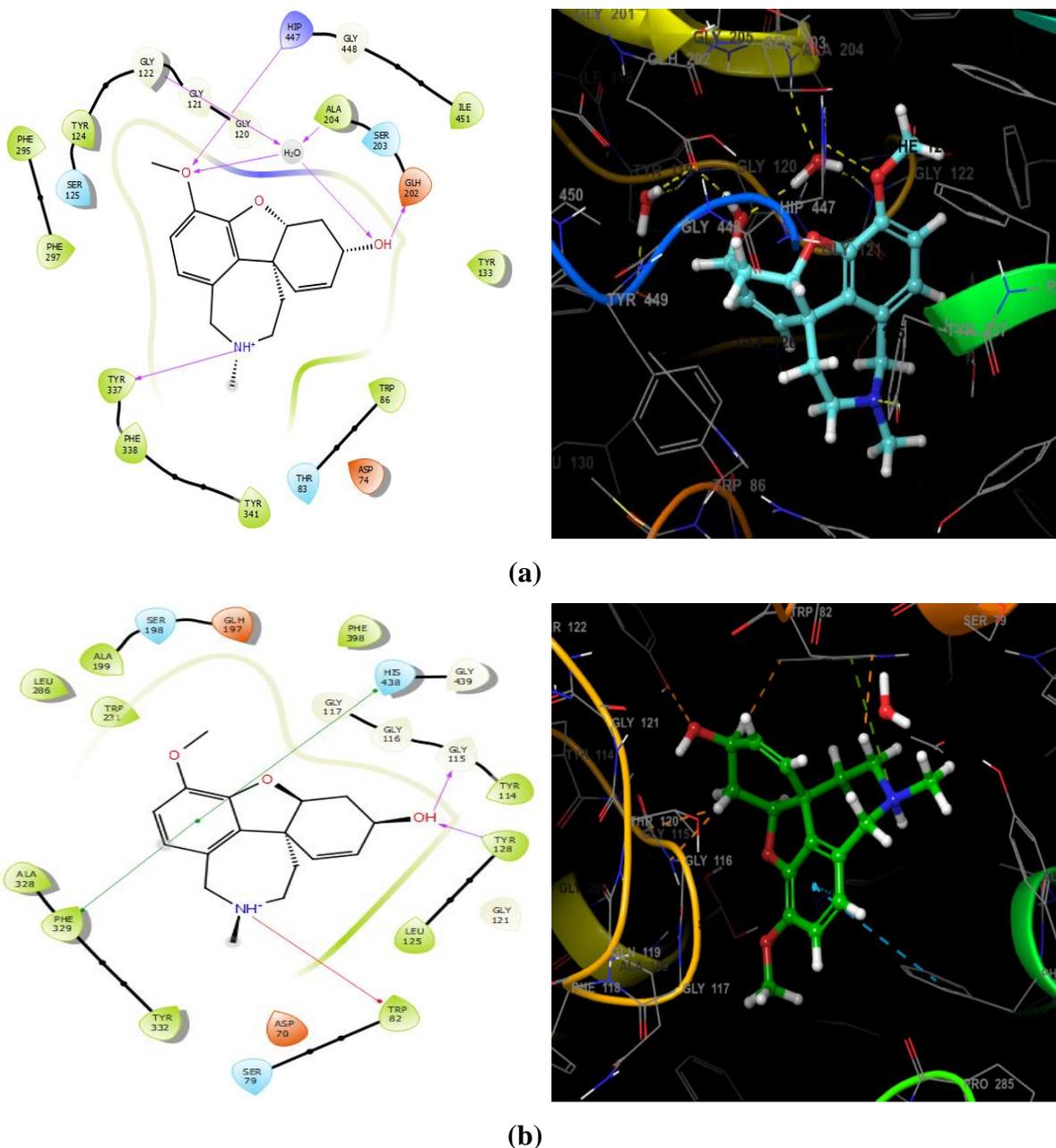


Figure V 13 : Diagrammes d'interaction en 2D et 3D de la molécule 4-HNAP avec l'acétylcholinestérase (a) et la butyrylcholinestérase (b)

Ces types d'interactions sont probablement responsables de la stabilisation d'un complexe inhibiteur de protéines. Ce qui reflète la grande stabilité et l'affinité des molécules étudiées pour se lier aux récepteurs.

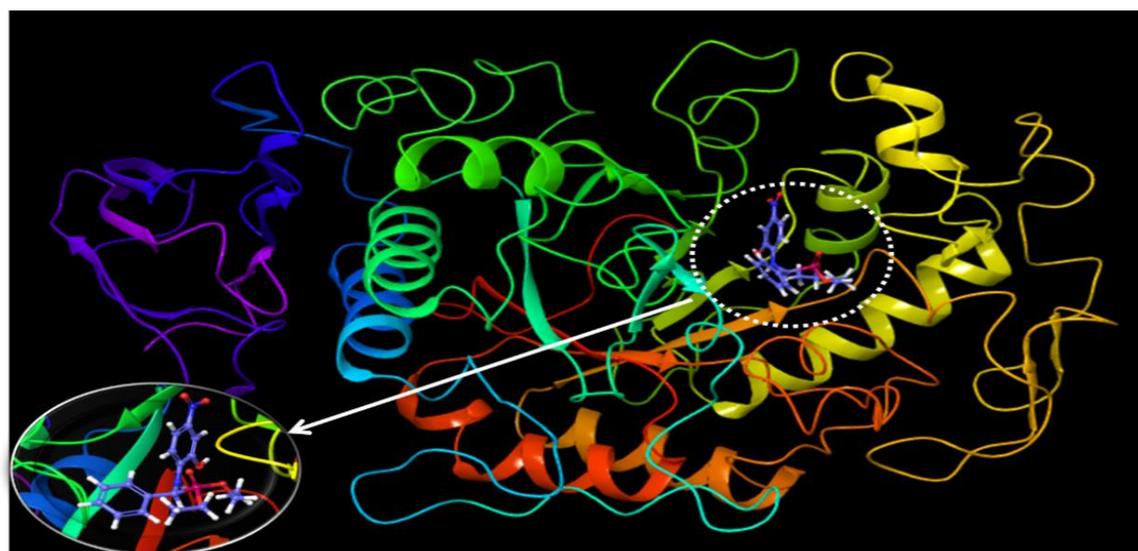
V.4.3.2 Résultats du docking moléculaire avec l' α -amylase

Une étude de docking moléculaire a été réalisée afin d'explorer les interactions des dérivés α -aminophosphonates synthétisés dans le site actif de l' α -amylase (4W93). La conformation stable qui correspond à l'énergie de liaison la plus basse a été choisie comme meilleure pose et a été utilisée dans l'analyse d'amarrage [40].

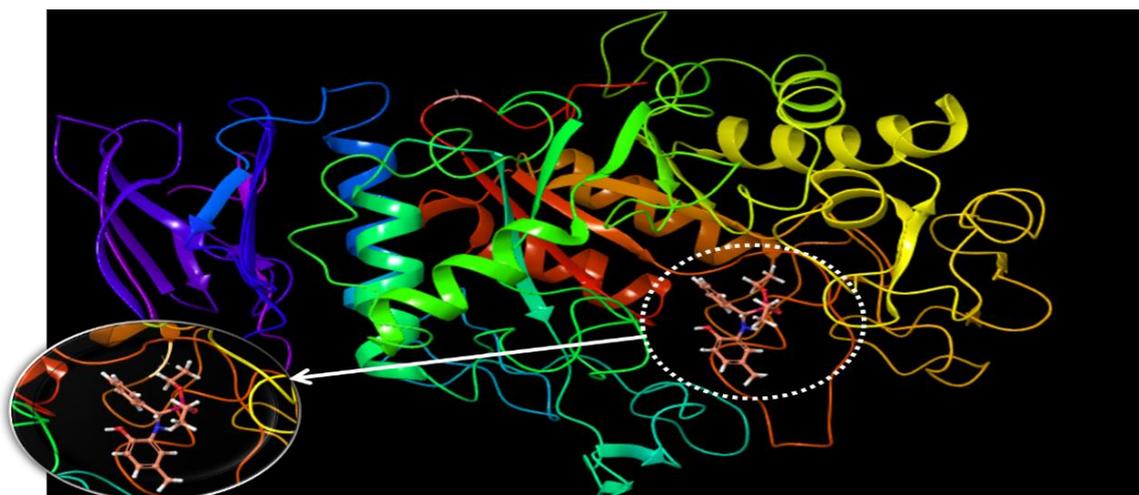
Les structures cristallines des meilleurs modes de docking des complexes 5-HMAP- α -amylase 5-HNAP- α -amylase et 4-HNAP- α -amylase sont représentées sur la figure ci-dessous.



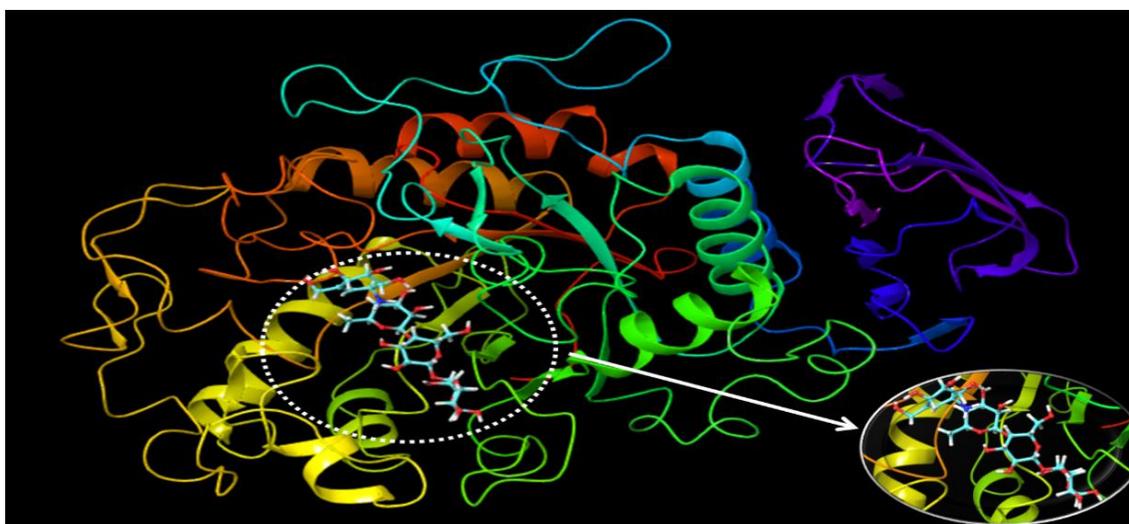
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure V 14: Visualisation des meilleures poses de docking de (a) 5-HMAP, (b)5-HNAP, (c) 4-HNAP et d) acarbose avec l' α -amylase 'PDB ID: (4W93)'.

De ces résultats, il apparaît que les trois esters α -aminophosphonates préfèrent se lier dans la poche interne de l' α -amylase.

Les scores de docking montrent que l'acarbose possède le meilleur score suivi par les composés 5-HNAP, 5-HMAP et 4-HNAP qui sont respectivement les scores de -4.18 Kcal/mol, -4.11 Kcal/mol et -4.06 Kcal/mol, ces valeurs de l'énergie de liaison calculées indiquent une bonne affinité de liaison entre α -amylase et les composés testés (Tableau V 14).

Tableau V 14 : Résultats du docking moléculaire et d'IC₅₀ de l'inhibiteur étudié avec l' α -amylase

<i>Ligand name</i>	<i>Docking Score</i>	<i>Glide energy</i>	<i>hydrogen bonding</i>	<i>Glide ligand efficiency</i>
<i>5-HMAP</i>	-4.11	-34.95	-0.84	-0.17
<i>5-HNAP</i>	-4.18	-35.03	-0.21	-0.16
<i>4-HNAP</i>	-4.07	-39.50	-0.70	-0.15
<i>acarbose</i>	-12.71	-57.25	-7.82	-0.28

Les trois ligands aminophosphonates et le référence acarbose ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie de leur mode de liaison contre le site actif de l' α -amylase (4W93) tableau V 15.

Tableau V 15 : Différents interactions formées entre les inhibiteurs 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et l' α -amylase

<i>Ligand</i>	<i>forces de Van der Waals</i>	<i>Acides aminés</i>
<i>5-HMAP</i>	-30.79	<i>GLU233, HIE299, ARG195</i>
<i>5-HNAP</i>	-30.39	<i>HIE299, ARG195, TRP58, TRP59, ASP300</i>
<i>4-HNAP</i>	-32.69	<i>GLU233, HIS201, ASP197</i>
<i>acarbose</i>	-32.38	<i>*ASP300, GLU233, ASP197, LYS200, *GLU240, ILE235</i>

*(deux interaction hydrogène avec le même acide aminé)

L'étude de docking moléculaire du composé 5-HMAP a montré que ce composé était profondément ajusté à l'intérieur de la poche active de l'enzyme en formant trois liaisons hydrogènes et plusieurs interactions hydrophobes de type van der Waals, L'interaction par des liaisons hydrogènes ont été observées avec les résidus, GLU233, HIE299 et ARG195, alors que les interactions hydrophobes étaient le long des acides

aminés très hydrophobes avec une énergie de liaison de -30.79 Kcal/mol (tableau V 19 et figure V 15).

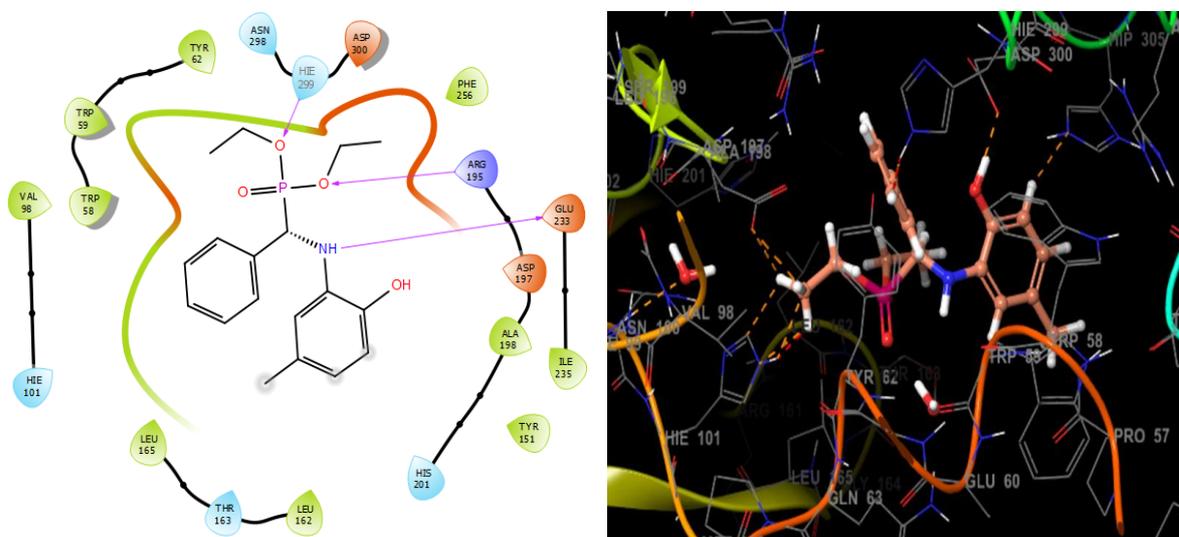


Figure V 15 : Diagrammes d'interaction en 2D et 3D de la molécule 5-HMAP avec l' α -amylase

Il apparaît sur la Figure ci-dessous, que le 5-HNAP s'adapte favorablement à l'ensemble de la poche de liaison de l' α -amylase en formant plusieurs interactions de type de van der Waals avec une énergie de liaison de -30.39 Kcal/mol. En outre, des liaisons hydrogènes ont été observées avec HIE299, ARG195, TRP58, TRP59 et ASP300 (tableau V 14).

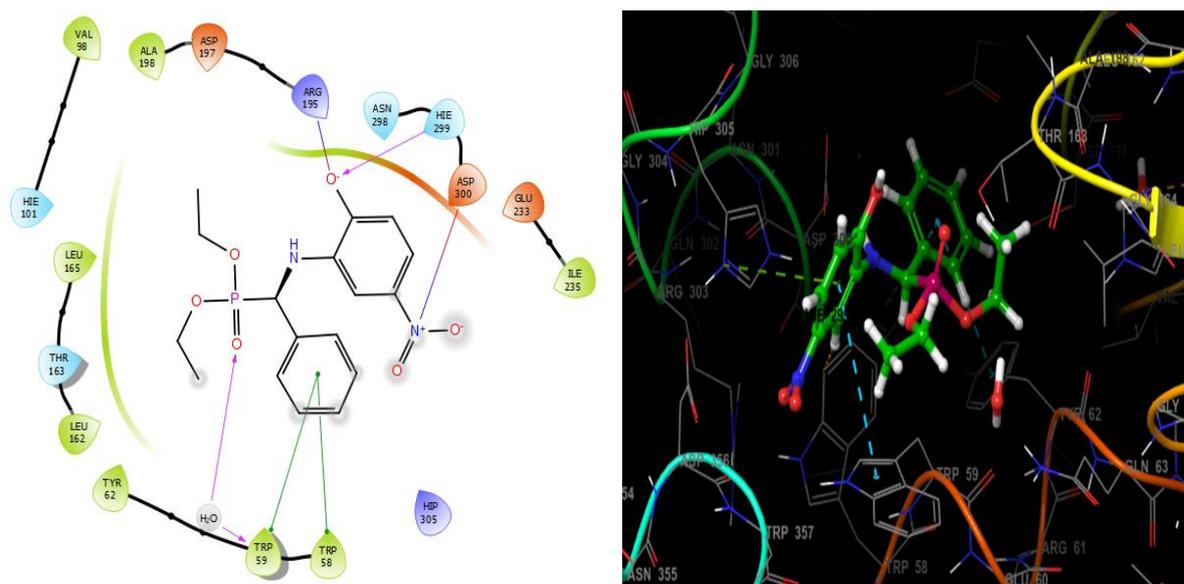


Figure V 16 : Diagrammes d'interaction en 2D et 3D de la molécule 5-HNAP avec l' α -amylase

En conclusion, les informations recueillies lors de l'analyse de simulation de docking pour les trois ligands étaient en faible corrélation avec les valeurs IC50 obtenues lors du test d'inhibition de α -amylase. (Tableau V 14). Il est a noté que le score est une estimation de l'affinité entre la macromolécule et la petite molécule organique. Un score ne prédit donc pas une activité mais une affinité [55].

Références bibliographiques

- [1] P. Vayer, A. Arrault, B. Lesur, M. Bertrand, B. Walther, Apports de la chémoinformatique dans la recherche et l'optimisation des molécules d'intérêt thérapeutique, *Med Sci (Paris)*. 25 (2009) 871–877. <https://doi.org/10.1051/medsci/20092510871>.
- [2] A. Fornili, M. Sironi, M. Raimondi, Determination of extremely localized molecular orbitals and their application to quantum mechanics/molecular mechanics methods and to the study of intramolecular hydrogen bonding, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 632 (2003) 157–172. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(03\)00296-3](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(03)00296-3).
- [3] D.A. Pearlman, D.A. Case, J.W. Caldwell, W.S. Ross, T.E. Cheatham, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel, P. Kollman, AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules, *Computer Physics Communications*. 91 (1995) 1–41. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00041-D](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00041-D).
- [4] M. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. Petersson, gaussian 09, Revision d. 01, Gaussian, Inc., Wallingford CT. 201 (2009).
- [5] A. Frisch, A.B. Nielson, A.J. Holder, Gaussview User Manual, Gaussian Inc., PA, (2000).
- [6] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction, *The Journal of Chemical Physics*. 96 (1992) 2155–2160.
- [7] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B*. 37 (1988) 785–789. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>.
- [8] K. Benbouguerra, N. Chafai, S. Chafaa, Y.I. Touahria, H. Tlidjane, New α -Hydrazinophosphonic acid: Synthesis, characterization, DFT study and in silico prediction of its potential inhibition of SARS-CoV-2 main protease, *Journal of Molecular Structure*. 1239 (2021) 130480.
- [9] S.A. Halim, M.A. Ibrahim, Synthesis, DFT calculations, electronic structure, electronic absorption spectra, natural bond orbital (NBO) and nonlinear optical (NLO) analysis of the novel 5-methyl-8H-benzo[h]chromeno[2,3-b][1,6]

- naphthyridine-6(5H),8-dione (MBCND), *Journal of Molecular Structure*. 1130 (2017) 543–558. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.10.058>.
- [10] B. Amul, S. Muthu, M. Raja, S. Sevvanthi, Molecular structure, spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, NMR, UV-VIS), chemical reactivity and biological examinations of Ketorolac, *Journal of Molecular Structure*. 1210 (2020) 128040. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128040>.
- [11] E. Kavitha, N. Sundaraganesan, S. Sebastian, Molecular structure, vibrational spectroscopic and HOMO, LUMO studies of 4-nitroaniline by density functional method, (2010).
- [12] E.E. Ebenso, D.A. Isabirye, N.O. Eddy, Adsorption and quantum chemical studies on the inhibition potentials of some thiosemicarbazides for the corrosion of mild steel in acidic medium, *International Journal of Molecular Sciences*. 11 (2010) 2473–2498.
- [13] P.K. Chattaraj, B. Maiti, HSAB principle applied to the time evolution of chemical reactions, *Journal of the American Chemical Society*. 125 (2003) 2705–2710.
- [14] R.G. Pearson, Chemical hardness and density functional theory, *Journal of Chemical Sciences*. 117 (2005) 369–377.
- [15] P. Geerlings, F. De Proft, W. Langenaeker, Conceptual density functional theory, *Chemical Reviews*. 103 (2003) 1793–1874.
- [16] A.B. Sawant, C.H. Gill, R.S. Nirwan, Molecular structure and vibrational spectra of 2-[5-(4-chlorophenyl)-4, 5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl] phenol, (2012).
- [17] J. Pipek, P.G. Mezey, A fast intrinsic localization procedure applicable for abinitio and semiempirical linear combination of atomic orbital wave functions, *The Journal of Chemical Physics*. 90 (1989) 4916–4926.
- [18] M.V. Putz, N. Russo, E. Sicilia, About the Mulliken electronegativity in DFT, *Theor Chem Acc*. 114 (2005) 38–45. <https://doi.org/10.1007/s00214-005-0641-4>.
- [19] Y.N. Mabkhot, F.D. Aldawsari, S.S. Al-Showiman, A. Barakat, S.M. Soliman, M.I. Choudhary, S. Yousuf, M.S. Mubarak, T.B. Hadda, Novel enaminoone derived from thieno [2,3-b] thiene: Synthesis, x-ray crystal structure, HOMO, LUMO, NBO analyses and biological activity, *Chemistry Central Journal*. 9 (2015) 24. <https://doi.org/10.1186/s13065-015-0100-9>.
- [20] H. van de Waterbeemd, S. Rose, Quantitative Approaches to Structure–Activity Relationships, in: *The Practice of Medicinal Chemistry*, Elsevier, 2008: pp. 491–513. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374194-3.00023-8>.

- [21] A. Debnath, Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Paradigm - Hansch Era to New Millennium, *MRMC*. 1 (2001) 187–195. <https://doi.org/10.2174/1389557013407061>.
- [22] S. Rekkab, “ Drug Design” et synthèse de nouveaux calix [8] arènes sulfoniques flexibles à activités anticorrosive et anticoagulante, (2014).
- [23] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 23 (1997) 3–25.
- [24] R. Mannhold, G.I. Poda, C. Ostermann, I.V. Tetko, Calculation of Molecular Lipophilicity: State-of-the-Art and Comparison of LogP Methods on more than 96,000 Compounds, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 98 (2009) 861–893. <https://doi.org/10.1002/jps.21494>.
- [25] S. Prasanna, R. Doerksen, Topological Polar Surface Area: A Useful Descriptor in 2D-QSAR, *CMC*. 16 (2009) 21–41. <https://doi.org/10.2174/092986709787002817>.
- [26] P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 3714–3717. <https://doi.org/10.1021/jm000942e>.
- [27] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 23 (1997) 3–25.
- [28] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.-Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- [29] A.K. Ghose, V.N. Viswanadhan, J.J. Wendoloski, A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases, *J. Comb. Chem.* 1 (1999) 55–68. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>.
- [30] C. Empereur-Mot, Développement d’outils statistiques d’évaluation de méthodes de criblage virtuel: courbes de prédictivité & Screening Explorer, phdthesis, Conservatoire national des arts et metiers - CNAM, 2017. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01681848> (accessed November 15, 2021).

- [31] A.M. Alafeefy, S.I. Alqasoumi, A.E. Ashour, V. Masand, N.A. Al-Jaber, T. Ben Hadda, M.A. Mohamed, Quinazoline–tyrphostin as a new class of antitumor agents, molecular properties prediction, synthesis and biological testing, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 53 (2012) 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.03.044>.
- [32] Z.H. Chohan, S.H. Sumrra, M.H. Youssoufi, T.B. Hadda, Metal based biologically active compounds: Design, synthesis, and antibacterial/antifungal/cytotoxic properties of triazole-derived Schiff bases and their oxovanadium(IV) complexes, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 45 (2010) 2739–2747. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.02.053>.
- [33] D. Khaoula, Synthèse, étude structurale et mise au point du comportement pharmaceutique d'une nouvelle série de molécules bioactives, PhD Thesis, 2021. <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/handle/123456789/3723>.
- [34] J.R. Proudfoot, Drugs, leads, and drug-likeness: an analysis of some recently launched drugs, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 12 (2002) 1647–1650. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00244-5](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00244-5).
- [35] J. Tixier, G. Dusserre, S. Rault-Doumax, J. Ollivier, C. Bourely, OSIRIS: software for the consequence evaluation of transportation of dangerous goods accidents, *Environmental Modelling & Software*. 17 (2002) 627–637. [https://doi.org/10.1016/S1364-8152\(02\)00025-7](https://doi.org/10.1016/S1364-8152(02)00025-7).
- [36] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci Rep*. 7 (2017) 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- [37] V. Srimai, M. Ramesh, K. Satya Parameshwar, T. Parthasarathy, Computer-aided design of selective Cytochrome P450 inhibitors and docking studies of alkyl resorcinol derivatives, *Med Chem Res*. 22 (2013) 5314–5323. <https://doi.org/10.1007/s00044-013-0532-5>.
- [38] G. Piccaro, G. Poce, M. Biava, F. Giannoni, L. Fattorini, Activity of lipophilic and hydrophilic drugs against dormant and replicating *Mycobacterium tuberculosis*, *J Antibiot*. 68 (2015) 711–714. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.52>.
- [39] R. Cecchelli, V. Berezowski, S. Lundquist, M. Culot, M. Renftel, M.-P. Dehouck, L. Fenart, Modelling of the blood–brain barrier in drug discovery and development, *Nat Rev Drug Discov*. 6 (2007) 650–661. <https://doi.org/10.1038/nrd2368>.

- [40] S.A. Wildman, G.M. Crippen, Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 39 (1999) 868–873. <https://doi.org/10.1021/ci9903071>.
- [41] A.K. Ghose, V.N. Viswanadhan, J.J. Wendoloski, A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases, *J. Comb. Chem.* 1 (1999) 55–68. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>.
- [42] A. Joshi, R. Kumar, A. Sharma, Molecular docking studies, bioactivity score prediction, drug likeness analysis of GSK-3 β inhibitors: A target protein involved in Alzheimer's disease, *Biosciences Biotechnology Research Asia.* 15 (2018) 455–467.
- [43] S. Jamuna, A. Rathinavel, S.S.M. Sadullah, S.N. Devaraj, In silico approach to study the metabolism and biological activities of oligomeric proanthocyanidin complexes, *Indian Journal of Pharmacology.* 50 (2018) 242.
- [44] A.P. Li, Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery, *Drug Discovery Today.* 6 (2001) 357–366. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)01712-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)01712-3).
- [45] A. De la Nuez Veulens, R. Rodriguez, Current methodology for the assessment of ADME-Tox properties on drug candidate molecules, *Biotecnologia Aplicada.* 25 (2008).
- [46] R.O. Potts, R.H. Guy, Predicting Skin Permeability, *Pharmaceutical Research.* 09 (1992) 663–669. <https://doi.org/10.1023/A:1015810312465>.
- [47] Fidelis Toloyi Ndombera, Geoffrey K. K. Maiyoh, Vivian C. Tuei, Pharmacokinetic, Physicochemical and Medicinal Properties of N-glycoside Anti-cancer Agent More Potent than 2-Deoxy-D-Glucose in Lung Cancer Cells, *JPP.* 7 (2019). <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2019.04.003>.
- [48] C.C. Ogu, J.L. Maxa, Drug Interactions Due to Cytochrome P450, *Baylor University Medical Center Proceedings.* 13 (2000) 421–423. <https://doi.org/10.1080/08998280.2000.11927719>.
- [49] A. Parvez, J. Meshram, V. Tiwari, J. Sheik, R. Dongre, M.H. Youssoufi, T.B. Hadda, Pharmacophores modeling in terms of prediction of theoretical physico-chemical properties and verification by experimental correlations of novel coumarin derivatives produced via Betti's protocol, *European Journal of Medicinal Chemistry.* 45 (2010) 4370–4378.

- [50] J. Sheikh, A. Parvez, H. Juneja, V. Ingle, Z. Chohan, M. Youssoufi, T. Ben Hadda, Synthesis, biopharmaceutical characterization, antimicrobial and antioxidant activities of 1-(4'-O- β -d-glucopyranosyloxy-2'-hydroxyphenyl)-3-aryl-propane-1,3-diones, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46 (2011) 1390–1399. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.01.068>.
- [51] N. Uddin, M. Sirajuddin, N. Uddin, M. Tariq, H. Ullah, S. Ali, S.A. Tirmizi, A.R. Khan, Synthesis, spectroscopic characterization, biological screenings, DNA binding study and POM analyses of transition metal carboxylates, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 140 (2015) 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.12.062>.
- [52] S. Guezane-Lakoud, M. Toffano, L. Aribi-Zouiouche, Promiscuous lipase catalyzed a new P-C bond formation: Green and efficient protocol for one-pot synthesis of α -aminophosphonates, *Heteroatom Chem.* 28 (2017) e21408. <https://doi.org/10.1002/hc.21408>.
- [53] R. Bensegueni, Étude de l'activité et des propriétés thérapeutiques d'une série de composés organiques azotés, PhD Thesis, Université des frères Mentouri - Constantine 1, 2019.
- [54] J. Vora, S. Patel, M. Athar, S. Sinha, M.T. Chhabria, P.C. Jha, N. Shrivastava, Pharmacophore modeling, molecular docking and molecular dynamics simulation for screening and identifying anti-dengue phytochemicals, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. (2019).
- [55] M.H.J. Seifert, Assessing the Discriminatory Power of Scoring Functions for Virtual Screening, *J. Chem. Inf. Model.* 46 (2006) 1456–1465. <https://doi.org/10.1021/ci060027n>.
- [56] A. Mermer, O. Faiz, A. Demirbas, N. Demirbas, M. Alagumuthu, S. Arumugam, Piperazine-azole-fluoroquinolone hybrids: Conventional and microwave irradiated synthesis, biological activity screening and molecular docking studies, *Bioorganic Chemistry*. 85 (2019) 308–318. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.01.009>.

CONCLUSION
GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de cette thèse était de synthétiser une nouvelle série de composés organophosphorés de la catégorie des α -aminophosphonates, molécules ayant de nombreuses propriétés biologiques intéressantes dans les applications médicales et dans l'industrie pharmacologique.

■ Nous sommes arrivés à synthétiser trois α -aminophosphonates en appliquant le protocole de la réaction à trois composants de Kabachnik-Fields (phospha-Mannich) à partir d'aminophénols différemment substitués :

- [(2-Hydroxy-5-methyl-phenylamino)-diphenyl-methyl]-phosphonic acid diethyl ester
5-HMAP.
- [(2-Hydroxy-5-nitro-phenylamino)-diphenyl-methyl]-phosphonic acid -diethyl ester
5-HNAP.
- [(2-Hydroxy-4-nitro-phenylamino)-diphenyl-methyl]-phosphonic acid diethyl ester
4-HNAP.

Le rendement de la synthèse était entre 70% et 85%. Les produits synthétisés sont des solides de couleurs et de solubilité différents, ils sont caractérisés par des points de fusion suivants :

$$Tf_{5-HMAP}=156^{\circ}\text{C}, Tf_{5-HNAP}=214^{\circ}\text{C} \text{ et } Tf_{4-HNAP}=190^{\circ}\text{C}.$$

La spectroscopie infrarouge ATR-FTIR, a montré la disparition des pics caractéristiques des groupements NH_2 et $\text{C}=\text{O}$ des réactifs de départ et l'apparition de nouveaux pics attribués aux groupements phosphonates, $\text{P}=\text{O}$, $\text{P}-\text{O}-\text{C}$ et $\text{P}-\text{C}$.

La spectrophotométrie UV-vis a permis de confirmer l'obtention de nouvelles molécules différencier par leurs bandes d'absorption de λ_{max} différentes d'une molécule à une autre et différentes de celles des réactifs de départ.

L'analyse des produits synthétisés par la spectroscopie de résonance magnétique RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P et l'RMN bidimensionnel 2D a permis de confirmer les structures attendues.

L'analyse de la structure cristalline des molécules 5-HMAP, 5-HNAP par les rayons RX montre qu'elles sont connectées en chaînes dimériques et en couches bidimensionnelles parallèles au

plan (1-10), formées par des liaisons hydrogène O-H--O et C-H--O. Ces couches sont ensuite étendues en un réseau tridimensionnel via des interactions C-H--- π .

■ Les molécules synthétisées, ont été valorisés à travers des tests biologiques différents et des tests pharmacologiques *in vitro*. Dans un premier temps nous avons étudié l'activité antioxydante par les techniques chimiques couramment utilisées dans ce type de tests :

► La capacité de piégeage des radicaux :

- Le DPPH basée sur la réduction du radical libre (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle,
- L'ABTS basé sur la capacité à réduire le radical libre (acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique et
- Le GOR basé sur la capacité à réduire le radical libre galvinoxyl),

► La capacité réductrice des ions :

- Cuivriques(CUPRAC)
- Ferriques (FRAP et PHENANTHROLINE)

► La capacité de prévention de la peroxydation lipidique par le test du blanchiment du bêta carotène.

Les produits testés montrent une bonne capacité antioxydante avec des valeurs IC_{50} comparables à celles des standards utilisés BHT et BHA.

■ Dans un deuxième temps nous avons testé l'activité anti-enzymatique des molécules α -aminophosphonates synthétisées, vis-à-vis de quatre enzymes dont l'**AChE** et le **BChE** pour évaluer l'activité anti-**Alzheimer**, l' **α -amylase** pour évaluer l'activité **antidiabétique** et l'**uréase** pour évaluer l'activité **antiulcéreuse**.

- Les molécules testées montrent une bonne et prometteuse activité anti-Alzheimer. Le taux d'inhibition de la molécule 5-HMAP, exprimée un pourcentage est supérieur à celui de la référence BChE et comparable à celui de l'AChE.
- Les molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP présentent une activité antidiabétique très importante *in vitro* contre l' α -amylase considéré comme un enzyme important dans la digestion des glucides et par conséquent dans la régulation de la glycémie postprandiale. En revanche les produits testés ont montré une faible activité inhibitrice de l'uréase par rapport à la référence utilisée.

■ L'effet de différents produits sur la dénaturation thermique de l'albumine du sérum bovin (BSA) évalué *in vitro*, montre que seules les molécules substituées en position *meta* (m) du noyau aromatique dans les α -aminophosphonates possèdent une activité antiinflammatoire comparable à celle de l'ibuprofène.

■ Les résultats de l'étude effectuée sur les facteurs de protection solaire indiquent que les dérivées α -aminophosphonates synthétisées appartenant à la catégorie des produits de haute protection solaire, ils sont donc, des bons protecteurs contre les rayonnements solaires, ils peuvent bloquer plus de 97% des rayonnements UV, et ils ont une protection meilleure que celle de la référence.

■ L'activité hémolytique des molécules α -aminophosphonates synthétisées dépende de la concentration, forte heureusement toutes nos molécules ont un effet hémolytique faible sur les globules rouges humains et elles sont pratiquement non toxiques.

■ Les molécules synthétisées possèdent une activité antibactérienne contre les microbes pathogènes, quoique les diamètres des zones d'inhibition pour les molécules substituées par un groupement *nitro* soient relativement faibles.

■ Pour une meilleure compréhension de différentes activités, on a fait recours à la modélisation moléculaire des molécules synthétisées, en utilisant trois méthodes : DFT, QSAR et amarrage moléculaire.

► La méthode de calcul DFT est appliquée à l'aide du logiciel Gaussian09, pour connaître, d'une manière approfondie, les propriétés structurales (géométriques), les orbitales HOMO et LUMO, ΔE_{GAP} , les moments dipolaires, les charges atomiques de Mulliken, la dureté, la douceur locale, l'électrophilie et l'électronégativité des molécules synthétisées.

- Les orbitales moléculaires sont principalement localisés autour des cycles aromatiques.
- Les énergies des orbitales HOMO de toutes les molécules sont basses, ceci confère aux molécules un caractère électrophile.
- Les valeurs du gap énergétiques ($\Delta E_{HOMO-LUMO}$) indiquent que les molécules : 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP sont des espèces réactives et instables.
- Selon Mulliken, les charges négatives sont portées sur les atomes d'oxygène, d'azotes et par certains atomes de carbone des cycles aromatiques.

- Les valeurs obtenues des descripteurs de réactivité globales démontrent que les molécules α -aminophosphonates synthétisées sont des électrophiles puissants et donneurs d'électrons.
 - ▶ Une analyse de la relation structure-réactivité et de prédiction de la similarité de nos molécules avec les médicaments à travers le concept Drug-likeness et Drug-score, a été menée à bien en utilisant des logiciels spécialisés. Cela est réalisé selon les règles de lipinski, Veber, Ghose et Score de biodisponibilité. Cette évaluation, nous a permis de :
- Constater que les molécules synthétisées ont une bonne biodisponibilité orale.
- Prédire la bioactivité de toutes les molécules vis-à-vis des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), des canaux ioniques, des protéines kinases, des récepteurs nucléaires et d'autres cibles enzymatiques.
- Les molécules synthétisées présentent une bioactivité modérée par rapport aux normes.
- Les molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP, ont des structures supposées non mutagènes, non irritantes et sans effet sur la reproduction lors de l'exécution de l'étude de mutagénicité.
 - ▶ Enfin, le docking moléculaire entre les molécules : 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP et les récepteurs acétylcholinestérase (4EY6), butyrylcholinestérase (4BDS) et *Alpha-amylase* (4W93), a été exécuté pour définir la conformation appropriée des acides diesters α -aminophosphonates synthétisés dans les récepteurs et les forces secondaires qui en résultent entre ces molécules et les acides aminés actifs des récepteurs, les résultats montrent que :
- Les molécules synthétisées dans ce travail, représentent du point de vue énergétique, une bonne affinité avec les résidus des sites actifs
- L'interaction des molécules 5-HMAP, 5-HNAP et 4-HNAP avec les trois enzymes a révélé que les molécules étudiées peuvent se lier à ces enzymes au moyen de divers contacts de liaison.

PERSPECTIVES

Vu les résultats excellents des tests biologiques réalisés, et en se concerne les prochains objectifs, il serait intéressant d'envisager comme perspectives de :

- ✓ Préparer les acides phosphoniques correspondant aux molécules obtenues par l'hydrolyse de la fonction ester de ces phosphonates en milieu acide
- ✓ Compléter la série des phosphonates à partir d'aminophénols substitués par des groupements actifs en positions *ortho*, *meta* et *para*.
- ✓ Poursuivre la mise en évidence des activités biologiques et pharmaceutiques des molécules synthétisées, notamment l'étude de leur intérêt dans la lutte contre le covid19, le Cancer et la Tuberculose.
- ✓ Faire des tests de toxicité *in vitro* et des tests *in vivo* pour confirmer leurs propriétés thérapeutiques et leur disposition à être administrés chez l'être humain.

ANNEXE

Paramètres géométriques expérimentaux et théoriques calculés (méthode DFT
B3LYP / 6-31G (d, p)) (Å, °)

Distances interatomiques (Å)		
liaisons	Exp.	Theo.
C7—C6	1.385 (3)	1.4027
C2—C7	1.392 (3)	1.3974
C7—H7	0.93	1.0889
C6—C5	1.402 (3)	1.4073
C6—N1	1.397 (2)	1.4388
C5—C4	1.375 (3)	1.4034
C5—O1	1.376 (2)	1.3561
C3—C4	1.387 (3)	1.3913
C4—H4	0.93	1.0856
C2—C3	1.370 (3)	1.4053
C3—H3	0.93	1.0877
C2—C1	1.505 (3)	1.5123
O1—H1	0.82	0.9785
C1—H1A	0.96	1.0971
C1—H1B	0.96	1.0963
C1—H1C	0.96	1.0943
N1—H	0.86	1.0155
N1—C8	1.444 (2)	1.4773
C8—H8	0.98	1.1001
C8—C9	1.518 (3)	1.5173
C8—P1	1.8167 (18)	1.8599
C9—C14	1.381 (3)	1.4012
C9—C10	1.386 (3)	1.4045
C14—C13	1.389 (4)	1.3971
C14—H14	0.93	1.0869
C10—C11	1.372 (3)	1.397
C10—H10	0.93	1.0856
C13—C12	1.366 (4)	1.3975
C13—H13	0.93	1.0862
C11—C12	1.361 (4)	1.3983
C11—H11	0.93	1.0863
C12—H12	0.93	1.0862
P1—O3	1.5552 (16)	1.6162
P1—O2	1.4650(16)	1.4975
P1—O4	1.5617 (14)	1.6118
O3—C15	1.464 (3)	1.4569
O4—C17	1.449 (3)	1.4552
C17—H17A	0.97	1.0963
C17—H17B	0.97	1.0939
C17—C18	1.435 (4)	1.5167

C15—H15A	0.97	1.0951
C15—H15B	0.97	1.093
C15—C16	1.401 (4)	1.5174
C16—H16A	0.96	1.0959
C16—H16B	0.96	1.0943
C16—H16C	0.96	1.0934
C18—H18A	0.96	1.0935
C18—H18B	0.96	1.0942
C18—H18C	0.96	1.0955

Angles de liaisons (°)

angles	theo.	exp
C6—C7—C2	122.4043	121.85 (18)
C6—C7—H7	118.0989	119.1
C2—C7—H7	119.4932	119.1
C7—C6—C5	119.26	117.98 (17)
C7—C6—N1	121.7493	124.13 (17)
N1—C6—C5	118.895	117.88 (17)
C4—C5—C6	118.9525	120.35 (18)
O1—C5—C6	123.4512	116.31 (16)
C4—C5—O1	117.5927	123.34 (18)
C5—C4—C3	120.6506	120.37 (19)
C5—C4—H4	118.2662	119.8
C3—C4—H4	121.0795	119.8
C2—C3—C4	121.443	120.52 (19)
C4—C3—H3	119.0419	119.7
C2—C3—H3	119.5147	119.7
C3—C2—C7	117.2886	118.91 (19)
C7—C2—C1	121.5625	120.51 (19)
C3—C2—C1	121.1489	120.58 (19)
C5—O1—H1	111.3525	109.5
C2—C1—H1A	111.5367	109.5
C2—C1—H1B	111.5221	109.5
C2—C1—H1C	111.2775	109.5
H1A—C1—H1B	107.1303	109.5
H1A—C1—H1C	107.505	109.5
H1B—C1—H1C	107.6459	109.5
C6—N1—H	110.4198	119.5
C6—N1—C8	118.8418	120.94 (15)
C8—N1—H	108.6132	119.5
N1—C8—H8	112.5533	107.5
N1—C8—C9	109.9243	117.04 (15)
N1—C8—P1	108.117	108.79 (12)
C9—C8—H8	109.111	107.5
P1—C8—H8	106.3872	107.5
C9—C8—P1	110.6992	108.20 (12)
C14—C9—C8	120.2241	121.27 (19)

C10—C9—C8	120.7662	120.41 (18)
C14—C9—C10	119.003	118.2 (2)
C9—C14—C13	120.6571	120.0 (2)
C9—C14—H14	119.578	120
C13—C14—H14	119.7649	120
C11—C10—C9	120.3162	121.2 (2)
C9—C10—H10	119.3966	119.4
C11—C10—H10	120.287	119.4
C12—C13—C14	120.0632	120.6 (3)
C14—C13—H13	119.7555	119.7
C12—C13—H13	120.1808	119.7
C12—C11—C10	120.3107	120.2 (3)
C10—C11—H11	119.6018	119.9
C12—C11—H11	120.0874	119.9
C11—C12—C13	119.6496	119.8 (3)
C13—C12—H12	120.1613	120.1
C11—C12—H12	120.1888	120.1
O3—P1—C8	106.6628	102.97 (8)
O2—P1—C8	114.0632	113.70 (9)
O4—P1—C8	100.5683	106.42 (9)
O2—P1—O3	114.2882	116.23 (10)
O3—P1—O4	103.6653	102.65 (8)
O2—P1—O4	116.1009	113.59 (9)
C15—O3—P1	122.7715	119.61 (17)
C17—O4—P1	120.7668	124.31 (15)
O4—C17—H17A	108.4094	109.7
O4—C17—H17B	108.4418	109.7
C18—C17—O4	107.8633	110.0 (2)
H17A—C17—H17B	109.0479	108.2
C18—C17—H17A	111.3126	109.7
C18—C17—H17B	111.6652	109.7
O3—C15—H15A	106.7473	109.4
O3—C15—H15B	109.1928	109.4
C16—C15—O3	109.0292	111.2 (3)
H15A—C15—H15B	108.3075	108
C16—C15—H15A	111.2289	109.4
C16—C15—H15B	112.1728	109.4
C15—C16—H16A	109.4183	109.5
C15—C16—H16B	110.8839	109.5
C15—C16—H16C	111.0706	109.5
H16A—C16—H16B	108.2825	109.5
H16A—C16—H16C	108.481	109.5
H16B—C16—H16C	108.6284	109.5
C17—C18—H18A	110.5993	109.5
C17—C18—H18B	110.9117	109.5
C17—C18—H18C	109.562	109.5

H18A—C18—H18B	108.6742	109.5
H18A—C18—H18C	108.5717	109.5
H18B—C18—H18C	108.4605	109.5

Coordonnées atomiques et facteurs d'agitation thermiques isotropes (\AA^2).

	x	y	z	$U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$
P1	0.32355 (6)	0.15144 (5)	0.27970 (5)	0.04488 (18)
O4	0.32313 (18)	0.21119 (15)	0.42232 (14)	0.0536 (4)
O3	0.16458 (18)	0.15943 (17)	0.18648 (16)	0.0603 (4)
O1	0.5428 (2)	0.10811 (14)	-0.09693 (15)	0.0573 (4)
H1	0.564	0.0807	-0.1636	0.086*
O2	0.3405 (2)	0.01560 (15)	0.26383 (17)	0.0639 (4)
N1	0.4972 (2)	0.22674 (17)	0.12066 (16)	0.0489 (4)
H	0.4469	0.1408	0.0819	0.059*
C6	0.5927 (2)	0.31139 (19)	0.06085 (18)	0.0413 (4)
C8	0.4817 (2)	0.28147 (19)	0.24676 (18)	0.0418 (4)
H8	0.4453	0.3598	0.2365	0.05*
C9	0.6333 (2)	0.3310 (2)	0.36921 (19)	0.0439 (4)
C5	0.6165 (2)	0.2489 (2)	-0.05371 (19)	0.0451 (4)
C2	0.7564 (3)	0.5331 (2)	0.0425 (2)	0.0490 (5)
C3	0.7801 (3)	0.4691 (2)	-0.0679 (2)	0.0579 (6)
H3	0.8438	0.5211	-0.1105	0.07*
C10	0.6739 (3)	0.4549 (2)	0.4598 (2)	0.0538 (5)
H10	0.6119	0.5107	0.4417	0.065*
C4	0.7098 (3)	0.3273 (2)	-0.1165 (2)	0.0562 (5)
H4	0.7258	0.2849	-0.192	0.067*
C7	0.6629 (2)	0.4534 (2)	0.10622 (19)	0.0462 (4)
H7	0.6471	0.4965	0.1814	0.055*
C14	0.7286 (3)	0.2509 (3)	0.3978 (3)	0.0625 (6)
H14	0.7044	0.1675	0.3385	0.075*
C1	0.8324 (3)	0.6870 (2)	0.0952 (3)	0.0665 (6)
H1A	0.8035	0.7142	0.1724	0.1*
H1B	0.7937	0.7312	0.0271	0.1*
H1C	0.9485	0.7138	0.1197	0.1*
C11	0.8040 (3)	0.4967 (3)	0.5757 (2)	0.0675 (7)
H11	0.8288	0.5799	0.6356	0.081*
C12	0.8967 (3)	0.4168 (3)	0.6034 (3)	0.0757 (7)

H12	0.9845	0.4451	0.6822	0.091*
C17	0.3889 (4)	0.1674 (3)	0.5413 (2)	0.0751 (7)
H17A	0.416	0.0866	0.5162	0.09*
H17B	0.4876	0.2402	0.6002	0.09*
C13	0.8605 (3)	0.2949 (3)	0.5151 (3)	0.0782 (8)
H13	0.9247	0.241	0.5337	0.094*
C15	0.0071 (3)	0.0755 (3)	0.1916 (4)	0.0900 (9)
H15A	-0.0147	-0.0206	0.1531	0.108*
H15B	0.0107	0.0848	0.2842	0.108*

Facteurs d'agitation thermique anisotropes (\AA^2).

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{12}	U^{13}	U^{23}
P1	0.0436 (3)	0.0469 (3)	0.0480 (3)	0.0125 (2)	0.0239 (2)	0.0132 (2)
O4	0.0589 (9)	0.0629 (9)	0.0519 (8)	0.0261 (7)	0.0301 (7)	0.0196 (7)
O3	0.0389 (8)	0.0745 (10)	0.0631 (9)	0.0087 (7)	0.0178 (7)	0.0251 (8)
O1	0.0681 (10)	0.0479 (8)	0.0545 (8)	0.0103 (7)	0.0314 (8)	0.0071 (6)
O2	0.0781 (11)	0.0487 (8)	0.0785 (11)	0.0207 (7)	0.0479 (9)	0.0166 (7)
N1	0.0534 (10)	0.0431 (8)	0.0476 (9)	0.0048 (7)	0.0267 (8)	0.0090 (7)
C6	0.0362 (9)	0.0473 (10)	0.0403 (9)	0.0108 (8)	0.0145 (8)	0.0146 (8)
C8	0.0400 (10)	0.0430 (10)	0.0457 (10)	0.0129 (8)	0.0202 (8)	0.0124 (8)
C9	0.0394 (10)	0.0498 (10)	0.0451 (10)	0.0123 (8)	0.0206 (8)	0.0132 (8)
C5	0.0442 (11)	0.0468 (10)	0.0440 (10)	0.0126 (8)	0.0165 (9)	0.0127 (8)
C2	0.0471 (11)	0.0483 (11)	0.0484 (11)	0.0107 (8)	0.0131 (9)	0.0192 (8)
C3	0.0562 (13)	0.0608 (13)	0.0570 (12)	0.0081 (10)	0.0274 (11)	0.0236 (10)
C10	0.0530 (13)	0.0543 (12)	0.0537 (12)	0.0150 (9)	0.0231 (10)	0.0082 (9)
C4	0.0617 (14)	0.0616 (13)	0.0480 (11)	0.0147 (10)	0.0288 (11)	0.0153 (9)
C7	0.0473 (11)	0.0466 (10)	0.0438 (10)	0.0127 (8)	0.0168 (9)	0.0123 (8)
C14	0.0557 (14)	0.0671 (14)	0.0676 (14)	0.0266 (11)	0.0203 (12)	0.0132 (11)
C1	0.0720 (16)	0.0514 (12)	0.0702 (15)	0.0084 (11)	0.0247 (13)	0.0221 (11)
C11	0.0648 (16)	0.0690 (15)	0.0519 (13)	0.0070 (12)	0.0168 (12)	0.0023 (11)
C12	0.0551 (15)	0.096 (2)	0.0588 (15)	0.0123 (14)	0.0085 (12)	0.0160 (14)
C17	0.0753 (18)	0.111 (2)	0.0540 (13)	0.0420 (16)	0.0273 (13)	0.0332 (14)
C13	0.0567 (16)	0.100 (2)	0.0830 (19)	0.0376 (15)	0.0139 (14)	0.0306 (16)
C15	0.0459 (15)	0.093 (2)	0.121 (3)	0.0024 (13)	0.0248 (16)	0.0452 (18)
C16	0.0512 (17)	0.142 (3)	0.116 (3)	0.0259 (18)	0.0257 (18)	0.032 (2)
C18	0.119 (3)	0.187 (4)	0.102 (2)	0.077 (3)	0.069 (2)	0.092 (3)

Paramètres géométriques expérimentaux et théoriques calculés (méthode DFT
B3LYP / 6-31G (d, p)) (Å, °).

Distances interatomiques (Å)		
liaisons	theo.	exp.
C7—C2	1.3985	1.3957 (10)
C3—C2	1.3952	1.3828 (11)
N2—C2	1.463	1.4548 (10)
C6—C7	1.3909	1.3881 (10)
C7—H7	1.0816	0.93
C5—C6	1.4166	1.4188 (10)
N1—C6	1.425	1.3818 (9)
C4—C5	1.3969	1.3916 (11)
O1—C5	1.3565	1.3468 (9)
C4—C3	1.3912	1.3923 (12)
C4—H4	1.0844	0.93
C3—H3	1.0825	0.93
O1—H1	0.9742	0.82
N1—H	1.0219	0.86
N1—C8	1.468	1.4505 (9)
N2—O5	1.2346	1.2278 (11)
O6—N2	1.2356	1.2293 (10)
C8—H8	1.102	0.98
C9—C8	1.5189	1.5248 (11)
P1—C8	1.8621	1.8160 (7)
C9—C10	1.401	1.3962 (11)
C9—C14	1.401	1.3898 (11)
C10—C11	1.396	1.3939 (14)
C10—H10	1.0852	0.93
C14—C13 1	1.3965	1.3943 (13)
C14—H14	1.0867	0.93
C11—C12	1.3977	1.3828 (16)
C11—H11	1.0862	0.93
C12—C13	1.3969	1.3830 (16)
C13—H13	1.086	0.93
P1—O2	1.4948	1.4748 (6)
P1—O3	1.6051	1.5646 (6)
P1—O4	1.6161	1.5709 (7)
O3—C15	1.4568	1.4501 (11)
O4—C17	1.4551	1.4627 (12)
C15—H15A	1.0947	0.97
C15—H15B	1.0946	0.97
C15—C16	1.5162	1.4921 (16)
C16—H16A	1.0938	0.96

C16—H16B	1.0952	0.96
C16—H16C	1.0939	0.96
C17—H17A	1.0935	0.97
C17—H17B	1.0957	0.97
C17—C18	1.5168	1.4991 (16)
C18—H18A	1.0938	0.96
C18—H18B	1.0941	0.96
C18—H18C	1.0954	0.96

Angles de liaisons (°)

angles	theo	exp
C3—C2—C7	122.0804	123.21 (7)
C7—C2—N2	118.6321	117.81 (7)
C3—C2—N2	119.2867	118.97 (7)
C6—C7—C2	119.3003	118.89 (6)
C2—C7—H7	118.8066	120.6
C6—C7—H7	121.893	120.6
C7—C6—C5	118.8772	118.76 (6)
N1—C6—C7	125.3305	123.99 (6)
N1—C6—C5	115.7694	117.21 (6)
C4—C5—C6	120.9898	120.74 (7)
O1—C5—C6	119.9169	115.35 (6)
O1—C5—C4	119.0933	123.91 (7)
C5—C4—C3	119.9161	120.55 (7)
C5—C4—H4	118.8899	119.7
C3—C4—H4	121.1792	119.7
C2—C3—C4	118.7851	117.83 (7)
C2—C3—H3	119.7784	121.1
C4—C3—H3	121.4309	121.1
C5—O1—H1	107.4497	109.5
C6—N1—H	111.8191	119.4
C6—N1—C8	118.824	121.25 (6)
C8—N1—H	108.9318	119.4
O5—N2—C2	117.9745	118.78 (8)
O6—N2—C2	118.0121	118.86 (7)
O5—N2—O6	124.0132	122.34 (8)
N1—C8—H8	111.8365	107.4
N1—C8—C9	113.7561	115.21 (6)
N1—C8—P1	105.2902	108.73 (5)
C9—C8—H8	108.453	107.4
P1—C8—H8	102.9041	107.4
C9—C8—P1	114.116	110.44 (5)
C10—C9—C8	121.5365	121.23 (7)
C14—C9—C8	119.5332	119.62 (7)
C14—C9—C10	118.9257	119.14 (8)

C11—C10—C9	120.5079	120.29 (8)
C9—C10—H10	119.5245	119.9
C11—C10—H10	119.963	119.9
C9—C14—C13	120.6351	120.32 (9)
C9—C14—H14	119.6551	119.8
C13—C14—H14	119.7095	119.8
C12—C11—C10	120.244	120.04 (9)
C10—C11—H11	119.6672	120
C12—C11—H11	120.0879	120
C12—C13—C14	120.1114	120.13 (9)
C14—C13—H13	119.6875	119.9
C12—C13—H13	120.1973	119.9
C11—C12—C13	119.5746	120.08 (9)
C11—C12—H12	120.2105	120
C13—C12—H12	120.2123	120
O2—P1—C8	111.2052	113.61 (4)
O3—P1—C8	99.8784	101.34 (3)
O4—P1—C8	110.1504	107.81 (4)
O2—P1—O3	118.3324	115.99 (4)
O2—P1—O4	113.9999	113.97 (4)
O3—P1—O4	102.0805	102.80 (4)
C15—O3—P1	121.1844	124.50 (6)
C17—O4—P1	121.5998	119.95 (6)
O3—C15—H15A	108.4798	110.3
O3—C15—H15B	108.2383	110.3
O3—C15—C16	107.8683	107.16 (9)
H15A—C15—H15B	109.1216	110.3
C16—C15—H15A	111.513	110.3
C16—C15—H15B	111.5123	110.3
C15—C16—H16A	110.8745	109.5
C15—C16—H16B	109.5304	109.5
C15—C16—H16C	110.8552	109.5
H16A—C16—H16B	108.4038	109.5
H16A—C16—H16C	108.6928	109.5
H16B—C16—H16C	108.4138	109.5
O4—C17—H17A	108.8299	110.1
O4—C17—H17B	108.0267	110.1
O4—C17—C18	108.025	108.00 (9)
H17A—C17—H17B	108.8663	108.4
C18—C17—H17A	111.9523	110.1
C18—C17—H17B	111.0376	110.1
C17—C18—H18A	110.8827	109.5
C17—C18—H18B	110.8709	109.5
C17—C18—H18C	109.5766	109.5
H18A—C18—H18B	108.6103	109.5
H18A—C18—H18C	108.4822	109.5

H18B—C18—H18C	108.3466	109.5
---------------	----------	-------

Coordonnées atomiques et facteurs d'agitation thermique isotropes (\AA^2).

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	$U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$
P1	0.43871 (3)	0.837829 (12)	0.580456 (12)	0.01802 (5)
O4	0.62344 (8)	0.85363 (4)	0.56211 (4)	0.02480 (12)
O1	0.67002 (9)	0.67493 (4)	0.84840 (4)	0.02354 (12)
H1	0.7178	0.6612	0.8978	0.035*
O2	0.31210 (9)	0.87108 (4)	0.50959 (4)	0.02550 (12)
O3	0.43633 (10)	0.87666 (4)	0.67637 (4)	0.02588 (13)
O6	0.42145 (10)	0.40947 (5)	0.55453 (5)	0.03074 (15)
N1	0.52255 (9)	0.70316 (4)	0.68479 (4)	0.01935 (11)
H	0.5694	0.7434	0.7179	0.023*
N2	0.50599 (11)	0.39616 (5)	0.62718 (5)	0.02413 (13)
O5	0.55791 (16)	0.32481 (5)	0.65008 (7)	0.0519 (3)
C9	0.23247 (9)	0.70176 (5)	0.60174 (5)	0.01839 (12)
C8	0.41607 (9)	0.72477 (4)	0.60275 (5)	0.01660 (11)
H8	0.4576	0.6934	0.5536	0.02*
C4	0.67217 (12)	0.52188 (5)	0.82824 (5)	0.02377 (15)
H4	0.7258	0.5132	0.8861	0.029*
C3	0.63160 (12)	0.45217 (5)	0.77218 (6)	0.02480 (15)
H3	0.6584	0.3968	0.7913	0.03*
C14	0.14723 (11)	0.66272 (7)	0.52637 (6)	0.02719 (16)
H14	0.2025	0.6507	0.4771	0.033*
C5	0.63320 (9)	0.60444 (5)	0.79843 (5)	0.01767 (12)
C6	0.55018 (9)	0.61921 (4)	0.71073 (5)	0.01584 (11)
C15	0.38324 (16)	0.96281 (6)	0.69385 (7)	0.0332 (2)
H15A	0.2679	0.9712	0.6685	0.04*
H15B	0.4519	1.004	0.6671	0.04*
C10	0.14713 (12)	0.72038 (6)	0.67473 (6)	0.02606 (15)
H10	0.2029	0.7465	0.7255	0.031*
C7	0.50733 (10)	0.54966 (5)	0.65528 (5)	0.01779 (12)
H7	0.451	0.5574	0.5979	0.021*
C2	0.55023 (10)	0.46787 (5)	0.68707 (5)	0.01934 (12)

C11	-0.02135 (13)	0.69991 (7)	0.67187 (7)	0.03251 (19)
H11	-0.0779	0.7128	0.7205	0.039*
C17	0.67306 (14)	0.83381 (7)	0.47395 (7)	0.03259 (19)
H17A	0.5932	0.8577	0.4269	0.039*
H17B	0.6766	0.7725	0.4656	0.039*
C18	0.84235 (17)	0.87162 (10)	0.46977 (10)	0.0463 (3)
H18A	0.8777	0.8593	0.4124	0.069*
H18B	0.9205	0.8475	0.5165	0.069*
H18C	0.8374	0.9323	0.4778	0.069*
C12	-0.10448 (13)	0.66046 (8)	0.59679 (8)	0.0349 (2)

Facteurs d'agitation thermique anisotropes (\AA^2).

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{12}	U^{13}	U^{23}
P1	0.02418 (10)	0.01528 (8)	0.01321 (8)	-0.00042 (6)	-0.00312 (6)	0.00095 (5)
O4	0.0268 (3)	0.0255 (3)	0.0212 (3)	-0.0077 (2)	-0.0007 (2)	0.0006 (2)
O1	0.0316 (3)	0.0196 (2)	0.0171 (2)	-0.0016 (2)	-0.0062 (2)	-0.00192 (18)
O2	0.0320 (3)	0.0226 (3)	0.0192 (2)	0.0023 (2)	-0.0071 (2)	0.00413 (19)
O3	0.0432 (4)	0.0166 (2)	0.0163 (2)	0.0054 (2)	-0.0019 (2)	-0.00180 (18)
O6	0.0434 (4)	0.0249 (3)	0.0213 (3)	-0.0011 (3)	-0.0061 (3)	-0.0050 (2)
N1	0.0260 (3)	0.0144 (2)	0.0156 (2)	0.0005 (2)	-0.0054 (2)	-0.00006 (18)
N2	0.0343 (4)	0.0171 (3)	0.0203 (3)	-0.0004 (2)	0.0008 (2)	-0.0028 (2)
O5	0.0927 (8)	0.0173 (3)	0.0390 (4)	0.0106 (4)	-0.0177 (5)	-0.0047 (3)
C9	0.0196 (3)	0.0185 (3)	0.0166 (3)	-0.0002 (2)	0.0004 (2)	-0.0003 (2)
C8	0.0195 (3)	0.0154 (3)	0.0140 (2)	0.0003 (2)	-0.0017 (2)	0.00010 (19)
C4	0.0323 (4)	0.0194 (3)	0.0172 (3)	0.0020 (3)	-0.0062 (3)	0.0016 (2)
C3	0.0347 (4)	0.0170 (3)	0.0205 (3)	0.0032 (3)	-0.0050 (3)	0.0017 (2)
C14	0.0211 (3)	0.0391 (5)	0.0208 (3)	-0.0047 (3)	0.0003 (3)	-0.0069 (3)
C5	0.0202 (3)	0.0173 (3)	0.0145 (2)	-0.0002 (2)	-0.0019 (2)	-0.0001 (2)
C6	0.0176 (3)	0.0153 (2)	0.0140 (2)	0.0004 (2)	-0.0006 (2)	0.00059 (19)
C15	0.0477 (6)	0.0199 (3)	0.0317 (4)	0.0077 (3)	0.0042 (4)	-0.0023 (3)
C10	0.0283 (4)	0.0281 (4)	0.0226 (3)	-0.0036 (3)	0.0064 (3)	-0.0049 (3)
C7	0.0222 (3)	0.0159 (3)	0.0143 (2)	0.0004 (2)	-0.0013 (2)	0.0001 (2)
C2	0.0252 (3)	0.0156 (3)	0.0164 (3)	0.0007 (2)	-0.0007 (2)	-0.0012 (2)
C11	0.0286 (4)	0.0381 (5)	0.0330 (4)	-0.0028 (4)	0.0124 (3)	-0.0042 (4)
C17	0.0361 (5)	0.0349 (5)	0.0280 (4)	-0.0081 (4)	0.0087 (4)	-0.0022 (3)
C18	0.0397 (6)	0.0507 (7)	0.0521 (7)	-0.0113 (5)	0.0195 (5)	0.0008 (6)
C12	0.0220 (4)	0.0456 (6)	0.0375 (5)	-0.0051 (4)	0.0057 (3)	-0.0014 (4)
C13	0.0230 (4)	0.0564 (6)	0.0302 (4)	-0.0093 (4)	-0.0008 (3)	-0.0094 (4)
C16	0.0545 (7)	0.0463 (6)	0.0372 (5)	0.0090 (5)	0.0079 (5)	-0.0184 (5)

Paramètres géométriques théoriques calculés (méthode DFT B3LYP / 6-31G (d, p)) (Å, °) de
4-HNAP

Distances interatomiques (Å) théoriques calculés par la méthode de DFT B3LYP / 6-31G (d, p)			
C1-C2	1.3931	C21-C24	1.3956
C1-C6	1.3947	C21-H25	1.0864
C1-H7	1.0821	C22-C26	1.3961
C2-C3	1.4009	C22-H27	1.0859
C2-H8	1.086	C24-C26	1.3982
C3-C4	1.4159	C24-H28	1.0862
C3-N12	1.4164	C26-H29	1.0859
C4-C5	1.3927	P30-O31	1.4883
C4-O10	1.3585	P30-O32	1.636
C5-C6	1.3951	P30-O33	1.6196
C5-H9	1.0824	O32-C34	1.4626
C6-N16	1.4696	O33-C41	1.4553
O10-H11	0.9775	C34-H35	1.0928
N12-H13	1.0138	C34-H36	1.0952
N12-C14	1.4816	C34-C37	1.5164
C14-H15	1.0947	C37-H38	1.0937
C14-C19	1.5211	C37-H39	1.0953
C14-P30	1.8476	C37-H40	1.0943
N16-O17	1.2333	C41-H42	1.0961
N16-O18	1.2339	C41-H43	1.0941
C19-C20	1.4009	C41-C44	1.5167
C19-C21	1.4036	C44-H45	1.0942
C20-C22	1.3972	C44-H46	1.0952
C20-H23	1.0868	C44-H47	1.094
Angles de liaisons (°) théoriques calculés par la méthode de DFT B3LYP / 6-31G (d,p)			
C2-C1-C6	118.1584	C26-C22-H27	120.2094
C2-C1-H7	121.736	C21-C24-C26	120.2208
C6-C1-H7	120.0944	C21-C24-H28	119.6988
C1-C2-C3	121.1502	C26-C24-H28	120.0787
C1-C2-H8	119.8337	C22-C26-C24	119.6505
C3-C2-H8	119.0074	C22-C26-H29	120.1978
C2-C3-C4	119.2393	C24-C26-H29	120.1516
C2-C3-N12	123.22	C14-P30-O31	117.7444
C4-C3-N12	117.4644	C14-P30-O32	100.918
C3-C4-C5	120.2036	C14-P30-O33	101.3291
C3-C4-O10	121.3009	O31-P30-O32	113.4132
C5-C4-O10	118.4951	O31-P30-O33	115.8564
C4-C5-C6	118.7465	O32-P30-O33	105.6491
C4-C5-H9	120.3919	P30-O32-C34	120.4094

C6-C5-H9	120.8325	P30-O33-C41	120.3918
C1-C6-C5	122.4502	O32-C34-H35	108.6384
C1-C6-N16	118.9964	O32-C34-H36	107.9588
C5-C6-N16	118.5498	O32-C34-C37	108.3593
C4-O10-H11	110.502	H35-C34-H36	108.3839
C3-N12-H13	112.5519	H35-C34-C37	112.2166
C3-N12-C14	117.4483	H36-C34-C37	111.1675
H13-N12-C14	110.8792	C34-C37-H38	111.2519
N12-C14-H15	107.3724	C34-C37-H39	109.2154
N12-C14-C19	115.0307	C34-C37-H40	111.182
N12-C14-P30	108.4968	H38-C37-H39	108.3237
H15-C14-C19	108.0029	H38-C37-H40	108.5532
H15-C14-P30	102.8514	H39-C37-H40	108.223
C19-C14-P30	114.1741	O33-C41-H42	108.1186
C6-N16-O17	117.9425	O33-C41-H43	108.6567
C6-N16-O18	117.8494	O33-C41-C44	108.2476
O17-N16-O18	124.2081	H42-C41-H43	109.0239
C14-C19-C20	119.7181	H42-C41-C44	111.026
C14-C19-C21	121.4451	H43-C41-H45	111.6719
C20-C19-C21	118.8195	C41-C44-C6	110.9753
C19-C20-C22	120.7178	C41-C44-H46	109.6069
C19-C20-H23	119.6583	C41-C44-H47	110.8465
C22-C20-H23	119.624	H45-C44-H46	108.3146
C19-C21-C24	120.5238	H45-C44-H47	108.7654
C19-C21-H25	119.9084	H46-C44-H47	108.2534
C24-C21-H25	119.56	C20-C22-C26	120.066
C20-C22-H27	119.7244		

• Etude de l'activité antioxydante

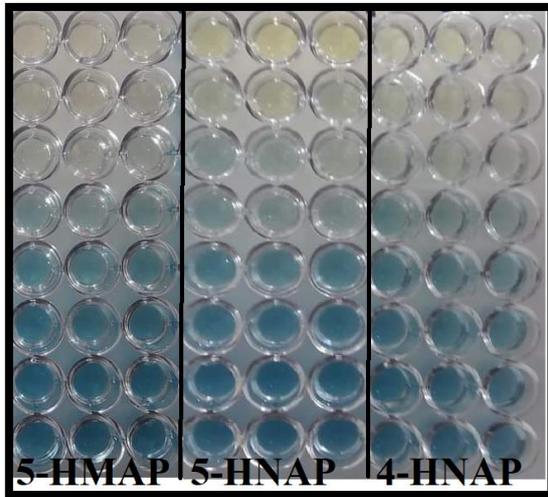


Figure 1: Test ABTS

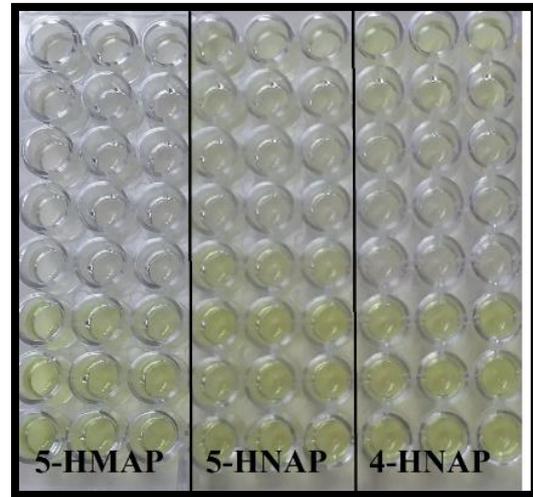


Figure 2: Test GOR



Figure 3: Test CUPRAC



Figure 4: Test Reducing power (FRAP) de 5-HNAP

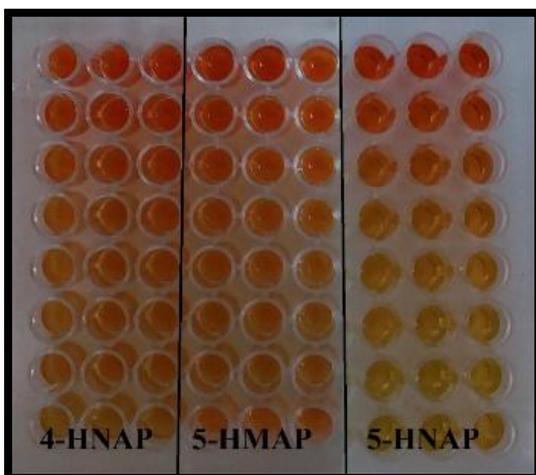


Figure 5 : Test Phenanthroline

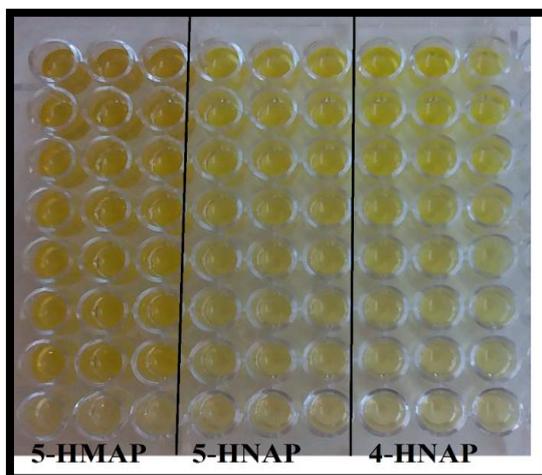


Figure 6 : test de blanchiment du β -carotène

- Etude de l'activité enzymatique

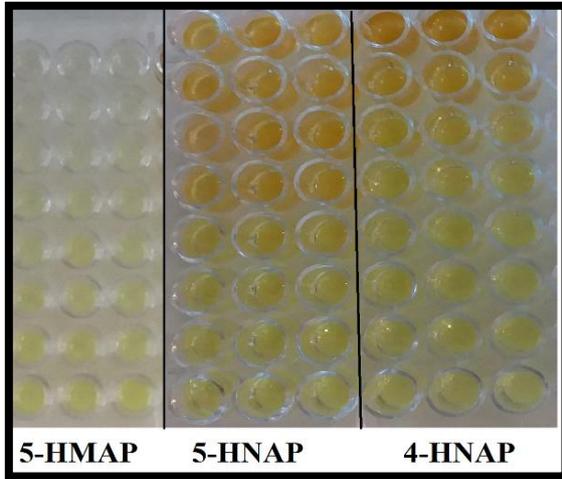


Figure 7 : *Activité inhibitrice de la BChE*

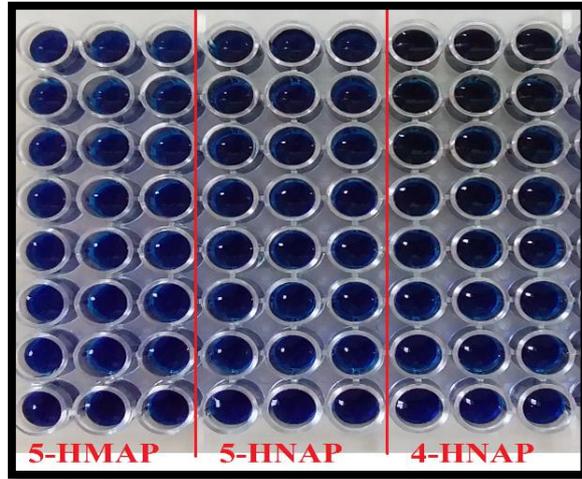


Figure 8 : *Activité inhibitrice de l'Uréase*

- Etude de l'activité antiinflammatoire

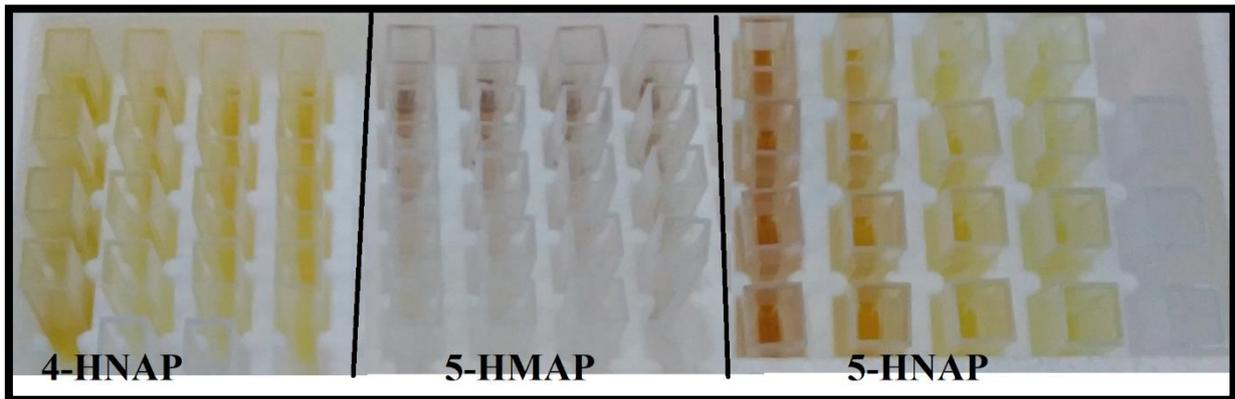


Figure 9 : *Activité anti-inflammatoire*