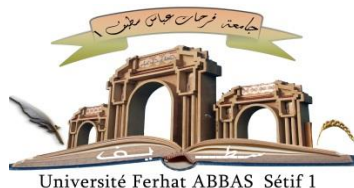


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ SETIF 1 - FERHAT ABBAS

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

ELKOLLI Mouna

THÈME

**Synthèse, caractérisation et valorisation de nouvelles substances d'intérêt
bio-pharmacologique à base de phosphonates**

Soutenue le 22 / 04 / 2025 devant le Jury:

MERBAH-ELKOLLI Meriem	Professeur	Univ. Sétif 1. Ferhat Abbas	Présidente
CHAFAI Nadjib	Professeur	Univ. Sétif 1. Ferhat Abbas	Directeur de thèse
HARKAT Hassina	Professeur	Univ. Batna 2. Mostefa B.Boulaïd	Examinatrice
KERKOUR Rachida	MCA	Univ. Abdelhafid Boussouf-Mila	Examinatrice
ISSAADI Saïfi	Professeur	Univ. Sétif 1. Ferhat Abbas	Examineur
CHAFAA Salah	Professeur	Univ. Sétif 1. Ferhat Abbas	Invité

Dédicace

Je dédie ce travail,

A la mémoire de mon cher père et mon cher frère Sami

A ma chère mère que dieu le préserve pour nous

A mes frères Walid et Houssein et mes sœurs Sihem, Ahlem et Nawel.

A mon mari Mohamed

A ma petite chère et adorable fille « Anais »

A mes chères nièces Aridj et Ines et chers neveux Sami et Younes

A toute ma famille, tous mes collègues et amies.

Remerciements

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour finir ce travail.

*Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire d'Électrochimie des Matériaux Moléculaire et Complexes (LEMMC), Faculté de technologie, Département de Génie des Procédés de l'Université Ferhat ABBAS –sous la direction du professeur **Nadjib CHAFAI**.*

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements et mes reconnaissances 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 aide apporté au long de ce parcours jusqu'à la rédaction du manuscrit.*

*Je tiens également à témoigner toute ma gratitude envers Monsieur **Nadjib CHAFAI**, professeur de l'Université Sétif-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 **Rachida KERKOUR**, maitre de conférences « A » à l'université de Mila pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.*

*Que Monsieur **Saïfi ISSAADI** professeur à l'université de Sétif-1, trouve ici mes sincères considérations pour m'avoir fait l'honneur d'examiner le travail de ma thèse.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur **Mubarek S. Muhammed**, qui m'a accueillie à son laboratoire à l'université de Jordanie, Amman, merci à vous pour m'avoir aidé d'apprendre et effectuer des analyses spectroscopiques et pour l'accueil chaleureux, et l'aide, particulier lors de mon séjour au sein du laboratoire.*

*J'adresse mes remerciements particuliers à Dr **Bencouici Chawki** et Dr **Kadi Imed-eddine** de centre de recherche et de biotechnologie -Constantine- (CRBT) .*

Un grand merci aussi à tous les membres de l'équipe du laboratoire LEMMC et à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement, pour réaliser ce travail.

Je remercie toute ma famille pour leurs soutiens durant la réalisation de ce travail.

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

Merci à tous.

Mouna El kolli

TABLE
DES MATIERES

Table des Matières

Table des matières	i
Liste des abréviations	vii
Liste des schémas	xi
Liste des figures	xii
Liste des tableaux	xvi
Introduction générale	1
Références bibliographiques	4

Chapitre I : Rappels bibliographiques

I.1 Introduction	8
I.2 Composés organophosphorés	8
I.3 Phosphinates et phosphonates	10
I.3.1 Définition	10
I.3.2 Phosphinates et phosphonates dans la nature	10
I.3.3 Domaines d'application des phosphinates et des phosphonates	12
I.3.3.1 Dans La biologie, la médecine et la pharmacologie	12
I.3.3.1.1 Activité anticancéreuse	12
I.3.3.1.2 Activité antibactérienne	13
I.3.3.1.3 Activité antiviral	13
I.3.3.1.4 Activité Anti-inflammatoire	14
I.3.3.2 Dans l'agriculture	14
I.3.3.3 Dans la corrosion	15
I.4 Les α -aminophosphinates et les α -aminophosphonates	15
I.4.1 Méthodes d'accès aux α -aminophosphinates et α -aminophosphonates	16
I.4.1.1 Réaction de Kabachnik-Fields	16
• Mécanismes possibles pour la réaction de Kabachnik-Fields	17
I.4.1.2 Réaction de Pudovik	19
I.4.1.3 Réaction de Moedritzer-Irani	19
I.4.1.4 Réaction de Mitsunobu	20

I.4.2 Méthodes d'accès aux autres composés contenant le motif phosphinate ou phosphonate	20
I.4.2.1 Réaction de Michaelis-Arbuzov	20
I.4.2.2 Réaction de Michaelis-Becker	21
I.5 Généralités sur les activités biologiques	21
I.5.1 Activité antioxydante	21
I.5.1.1 Stress oxydatif	21
I.5.1.2 Radicaux libres	21
I.5.1.2.1 Nature des radicaux libres	22
• Radicaux dérivés d'azote (ERN)	22
• Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	23
I.5.1.2.2 L'origine des radicaux libres	23
• Les sources endogènes	23
• Les ions métalliques	24
• Les sources exogènes	24
I.5.1.3 Antioxydants	24
I.5.1.3.1 Différentes types des antioxydants	24
• Systèmes antioxydant endogène	24
• Systèmes antioxydant exogènes	25
I.5.1.3.2 Mécanisme antioxydant	25
• Transfert d'atome d'hydrogène (<i>HAT</i>)	25
• Transfert d'électron singulier (<i>SET</i>)	25
• Chélation des métaux de transition	26
I.5.2 Activité anti-glucosidase (antidiabétique)	26
I.5.2.1 Maladie du Diabète	26
I.5.2.2 Types du diabète	26
I.5.2.3 Traitements du diabète de type 2	26
I.5.2.3.1 Traitements non médicamenteux	27

I.5.2.3.2 Traitements médicamenteux	27
• Inhibiteurs De la MGAM	27
• Inhibiteurs d' α -amylase	28
I.5.3 Activité anticholinestérase (Anti-Alzheimer)	28
I.5.3.1 Maladie d'Alzheimer	28
I.5.3.2 Traitement de La maladie d'Alzheimer	29
I.5.3.3 Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase	29
Références bibliographiques	31

Chapitre II : Analyses et méthodes expérimentales

II.1 Introduction	42
II.2 Méthodes analytiques et appareils	42
II.2.1 Chromatographie	42
II.2.2 Point de fusion	42
II.2.3 Spectrophotométrie ultraviolet visible (UV-Vis)	42
II.2.4 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)	42
II.2.5 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	42
II.2.6 Spectroscopie de masse (SM)	43
II.3 Méthodes d'évaluation des activités biologiques	43
II.3.1 Activité antioxydante	43
II.3.1.1 Matériels et réactifs	44
II.3.1.1.1 Instrument utilisé	44
II.3.1.1.2 Réactifs	44
II.3.1.2 Activité de piégeage du radical DPPH	45
II.3.1.3 Activité de piégeage du radical ABTS	46
II.3.1.4 Activité inhibitrice de peroxydation des lipides (le blanchiment de Beta-carotène)	48
II.3.1.5 Activité réductrice de l'ion cuprique(CUPRAC)	48
II.3.1.6 Activité réductrice l'ion ferrique (FRAP)	49
II.3.1.7 Activité de la Phénanthroline	50
II.3.2 Activité anti-enzymatiques	51

II.3.2.1 Matériels et réactifs	51
II.3.2.1.1 Instrument utilisé	51
II.3.2.1.2 Réactifs utilisés	51
II.3.2.2 Activité inhibitrice de l' α -glucosidase (antidiabétique)	52
II.3.2.3 Activité anticholinestérase (anti-Alzheimer)	53
II.3.3 Analyse statistique	54
Références bibliographiques	56

Chapitre III : Synthèse et caractérisation

III.1 Introduction	59
III.2 Synthèse des molécules ciblées	59
III.2.1 Réactifs et solvants utilisés	59
III.2.2 Synthèse des molécules ciblées	60
III.2.2.1 Synthèse de l'acide [(4-hydroxy-phénylamino) -phényl-méthyl] phosphinique (A) et l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphonique (B)	61
III.2.3 Mécanismes réactionnels	61
III.3 Caractérisation des produits synthétisés	63
III.3.1 Détermination des propriétés physiques des produits synthétisés	63
III.3.1.1 Analyse chromatographique par CCM	63
III.3.1.2 Solubilité des produits synthétisés	63
III.3.1.3 Points de fusion des produits synthétisés	64
III.3.2 Détermination des Propriétés spectroscopiques des produits synthétisés	64
III.3.2.1 Spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-vis)	65
III.3.2.2 Spectroscopie infrarouge (FT-IR)	67
III.3.2.3 Spectrométrie de résonance magnétique (RMN)	69
III.3.3.4 Spectroscopie de masse (SM)	75
Références bibliographiques	77

Chapitre IV : Activités biologiques et pharmaceutiques

IV.1 Introduction	78
-------------------------	----

IV.2	Activité antioxydante	78
IV.2.1	Activité de piégeage du radical DPPH	78
IV.2.2	Activité de piégeage du radical ABTS	80
IV.2.3	Activité inhibitrice de peroxydation des lipides (le blanchiment de Beta-carotène)	81
IV.2.4	Activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)	83
IV.2.5	Activité réductrice de l'ion ferrique (FRAP)	85
IV.2.6	Activité de la phénanthroline	86
IV.3	Activité anti-enzymatiques	88
IV.3.1	Activité antidiabétique (anti-glucosidase)	88
IV.3.2	Activité Anti-Alzheimer (anti-cholinestérase)	89
	Références bibliographique	92

Chapitre V : Modélisation Moléculaire

V.1	Introduction	94
V.2	Théorie de la fonctionnelle de la densité "DFT"	94
V.2.1	Analyse par la théorie de la fonctionnelle de la densité	95
V.2.1.1	Optimisation des géométries moléculaires de l'acide (A) et l'acide (B)	95
V.2.1.2	Orbitales moléculaires frontières et descripteurs de réactivité globale	96
V.2.1.3	Surface du potentiel électrostatique moléculaire	99
V.3	Docking Moléculaire	100
V.3.1	Analyse par le docking moléculaire	100
V.3.2	Résultats du docking moléculaire	100
V.3.2.1	Résultats du docking moléculaire avec l'alpha-glucosidase	100
V.3.2.2	Résultats du docking moléculaire avec l'acétyl/butyrylcholinestérase	104
V.3.2.3	Résultats du docking moléculaire avec la protéase principale du SARS-CoV-2	110
	Références bibliographiques	116
	Conclusion générale	118

LISTE DES ABREVIATIONS

- 4AP** : 4 aminophenol
- 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).
- AChE** : l'enzyme d'acétylcholinestirase.
- ACI** : Acetylthiocholine iodide.
- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- ADO** : antidiabétiques oraux.
- AEP** : aminoethanephosphonique
- ARN** : Acide ribonucleique
- B3LY P** : Becke Three Paramaters Lee-Yang-Parr.
- BChE** : l'enzyme de butyrylcholinestérase.
- BHA** : 3-tertiobutyl-4- hydroxyanisole.
- BHT** : 3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène.
- BuCI** : S-Butyryl-thiocholine iodide.
- C** : Concentration.
- CAT** : Capacité antioxydante totale.
- CCM** : chromatographie sur couche mince.
- ChEs** : Les cholinestérases.
- COP** : composé organophosphoré.
- CRBT**: Centre de Recherche en Biotechnologie.
- CUPRAC**: Cupric Reducing Antioxidant Capacity.
- CYP** : L'enzyme cytochrome P.
- d** : doublet.
- Da** : Dalton.
- DFT** : Density Functional Theory ou La théorie de la fonctionnelle de la densité électronique.
- DMSO** :Diméthylsulfoxyde.
- DMSO-d₆** : dimethyl sulfoxide-d₆.

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

DSTA : démence sénile du type Alzheimer

DT : diabète type

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

EI : Inhibiteur d'enzyme.

Elc: electrostatic interactions

ERN : les espèces réactives de l'azote.

ERO : les espèces réactives de l'oxygène.

ERON : les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.

EtOH : Ethanol.

FMO : orbitales moléculaires frontières.

FRAP : Pouvoir Antioxydant Réducteur Ferrique (FerricReducingAntioxidant Power).

GSH : glutathion

GPX : glutathion peroxydase

HAT : Hydrogen Atom Transfert.

H-bonds: hydrogen bonding

HOMO : HighestOccupiedMolecular Orbital (Orbitale Moléculaire Haute Occupée).

HS : surface de Hirshfeld

Hz : Hertz.

I : Energie d'ionisation.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50.

IR : La spectroscopie infrarouge.

IAG : inhibiteur de l' α -glucosidase

J : constantes de couplage.

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

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

m : multiplet.

MA : maladie d'Alzheimer

MeOH : Méthanol.

MEP : Surfaces du potentiel électrostatique moléculaire.

MGAM : maltase –glucoamylase

Mpro : main protéase

MW : Poids moléculaire.

OMS : Organisation mondiale de la Santé.

PDB : La banque de données sur les protéines.

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

PI : Inhibiteur des enzymes Protéases.

p-NP : *p*-nitrophénol

p-NPG : *p*-nitrophényl- α -D glucopyranoside

ppm : partie par million.

q : quadruplet.

R_f : rapport frontal.

RL : radicaux libres

RM : réfractivité molaire.

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire .

S : Douceur moléculaire.

s : singulet.

SD : Erreur standard (ou erreur type).

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

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise.

SOD : superoxydes dismutases.

SM : spectroscopie de masse

t : triplet.

T_f : Températures de fusion.

TMS : tétraméthylsilane.

Tris-HCl : Tris-(hydroxyméthyl) aminomethanehydrochloride.

Tween 40 : Monopalmitate de polyoxyéthylènesorbitane.

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

VHB : le virus de l'hépatite B.

VIH : le virus de l'immunodéficience humaine.

vdW: van der Waals force

δ : Les déplacements chimiques.

ΔE_{GAP} : Gap énergétique.

ΔG° : Energie libre de Gibbs.

η : Dureté moléculaire.

μ : Potentiel chimique électronique.

χ : Électronégativité.

ω : Indice d'électrophilie.

λ : Longueur d'onde

LISTE DES SCHEMAS

Schéma I. 1 : Schéma général de la réaction de Kabachink-Fields	17
Schéma I. 2 : Propositions de mécanismes de la réaction de Kabachnik-Fields	18
Schéma I. 3 : Synthèse d' α -aminophosphonates selon la réaction d'Arbuzov	18
Schéma I. 4 : Réaction de Pudovik catalysée par le Pd/C.....	19
Schéma I. 5 : Réaction de Moedritzer et Irani	19
Schéma I. 6 : Synthèse des α -aminophosphonates via la réaction de Mitsunobu	20
Schéma I. 7 : Synthèse des phosphonates par réaction de Michaelis-Arbuzov	20
Schéma I. 8 : Synthèse des phosphonates par réaction de Michaelis-Becker	21
Schéma III. 1 : Schéma de la réaction à trois composants de Kabachnik-Fields utilisé pour la synthèse des α -aminophosphonates	60
Schéma III. 2 : Séquence réactionnelle générale de synthèse de l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphinique (A) et l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphonique (B)	61
Schéma III. 3 : Mécanisme réactionnel proposé pour la formation de l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphinique (A) et l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphonique (B)	62

LISTE DES FIGURES

Figure I. 1 : Nomenclature des familles d'organophosphorés	09
Figure I. 2 : Structure des phosphates et leurs analogues phosphinates / phosphonates	10
Figure I. 3 : La formule de Ciliatine	11
Figure I. 4 : Structures de phosphonates isolés à partir de <i>Streptomyces regensis</i>	11
Figure I. 5 : Structures d' α -aminophosphonates ayant une activité anti-tumorale	12
Figure I. 6 : Structures d' α -aminophosphonates à activité antibactérienne	13
Figure I. 7 : structures d' α -aminophosphinates à activité inhibitrice de la protéase	13
Figure I. 8 : Structures chimiques des anti-inflammatoires contenant des groupements phosphinate ou phosphonate	14
Figure I. 9 : Structures des composés phosphonates utilisés dans l'agriculture	14
Figure I. 10 : certains exemples des inhibiteurs de la corrosion contenant le motif Phosphonate	15
Figure I. 11 : la structure générale des α -amino acids (1) et leur analogues phosphinique (2) et phosphonique (3)	16
Figure I. 12 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase	30
Figure II. 1 : Réduction du radical DPPH $\cdot$ par R-H, où (RH) est un composé capable de céder un H au radical DPPH	46
Figure II. 2 : le 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 $H\cdot$	47
Figure II. 3 : Structure de la molécule du β -carotène	48
Figure II. 4 : Réaction de CUPRAC par une molécule antioxydante	49
Figure II. 5 : Réaction de test FRAP (FerricReducing-Antioxydant Power)	49
Figure II. 6 : Réaction de la 1,1'O phénanthroline avec le Fe^{3+} après son oxydation en Fe^{2+} par un antioxydant	50
Figure II. 7 : la dégradation du p-nitrophényl- α -D glucopyranoside (p-NPG) en α -D-glucopyranoside et en p-nitrophénol (p-NP) par l'enzyme α -glucosidase	52
Figure II. 8 : Mécanisme d'action de la méthode d'Ellman	54
Figure III. 1 : Spectres UV-Vis de l'acide (A) et son amine de départ 4AP, enregistrés en DMSO à température ambiante dans une cuve de trajet optique $l = 1$ cm	65
Figure III. 2 : Spectres UV-Vis de l'acide (B) et son amine de départ 4AP, enregistrés en	

DMSO à température ambiante dans une cuve de trajet optique $l = 1 \text{ cm}$	66
Figure III. 3 : Spectres infrarouge caractéristiques de l'acide (A) et son amine de départ 4aminophenol (4AP)	68
Figure III. 4 : Spectres infrarouge caractéristiques l'acide (B) et son amine de départ 4aminonol (4AP)	68
Figure III. 5 : Spectre RMN ^1H caractéristique de l'acide (A)	70
Figure III. 6 : Structure proposée pour l'acide (A) d'après l'RMN ^1H	70
Figure III. 7 : Spectre RMN ^{13}C caractéristique de l'acide (A)	71
Figure III. 8 : Structure proposée pour l'acide (A) d'après l'RMN ^{13}C	71
Figure III. 9 : Spectre RMN ^{31}P caractéristique de l'acide(A)	72
Figure III. 10 : Spectre RMN ^1H caractéristique de l'acide (B)	73
Figure III. 11 : Structure proposée pour l'acide (B) d'après l'RMN ^1H	73
Figure III. 12 : Spectre RMN ^{13}C caractéristique de l'acide (B)	74
Figure III. 13 : Structure proposée pour l'acide (B) d'après l'RMN ^{13}C	74
Figure III. 14 : Spectre RMN ^{31}P caractéristique de l'acide (B)	75
Figure III. 15 : Spectre de masse de l'acide (A)	76
Figure III. 16 : Spectre de masse de l'acide (B)	76
Figure IV. 1 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition et des concentrations inhibitrices IC_{50} du radical DPPH exprimées en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA	79
Figure IV. 2 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition et des concentrations inhibitrices IC_{50} du radical ABTS exprimées en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA	81
Figure IV. 3 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition et des concentrations inhibitrices IC_{50} de blanchiment β -carotène exprimées en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) par les molécules (A), (B) et les standards BHT et BHA	82
Figure IV. 4 : Présentation graphique d'absorbance et des concentrations inhibitrices $\text{A}_{0.5}$ du exprimées en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA déterminé par la méthode CUPRAC	84
Figure IV. 5 : Présentation graphique d'absorbance et des concentrations inhibitrices $\text{A}_{0.5}$ du exprimées en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA déterminé par la méthode FRAP	85
Figure IV. 6 : Présentation graphique d'absorbance et des concentrations inhibitrices	

A0.5 du exprimées en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA déterminé par la méthode de phénanthroline	87
Figure IV. 7 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition et des concentrations inhibitrices IC_{50} du α -glucosidase exprimées en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) par les molécules (A), (B) et le standard acarbose	89
Figure IV. 8 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition et des concentrations inhibitrices IC_{50} d'acétylcholinestérase exprimées en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) par les molécules (A), (B) et le standard galantamine	90
Figure IV. 9 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition et des concentrations inhibitrices IC_{50} du butyrylcholinestérase exprimées en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) par les molécules (A), (B) et le standard galantamine	90
Figure V. 1 : Structures moléculaires optimisées de l'acide (A) et l'acide (B)	95
Figure V. 2 : Distribution de la densité électronique totale des orbitales moléculaires frontières des molécules (A) et (B)	97
Figure V. 3 : Potentiel électrostatique moléculaire MEP des acides (A) et (B)	99
Figure V. 4 : Visualisation des meilleures poses de docking des molécules (A) et (B) avec l'alpha-glucosidase	101
Figure V. 5 : À gauche : Diagrammes d'interaction en 3D des inhibiteurs étudiés (A) et (B) avec l'alpha-glucosidase. À droite: les inhibiteurs étudiés à l'intérieur des sites actifs avec les interactions	103
Figure V. 6 : Visualisation des meilleures poses de docking des molécules (A) et (B) avec l'acétylcholinestérase	105
Figure V. 7 : Visualisation des meilleures poses de docking des molécules (A) et (B) avec la butyrylcholinestérase	106
Figure V. 8 : À gauche : Diagrammes d'interaction en 3D des inhibiteurs étudiés (A) et (B) avec l'acétylcholinestérase. À droite: les inhibiteurs étudiés à l'intérieur des sites actifs avec les interactions	108
Figure V. 9 : À gauche : Diagrammes d'interaction en 3D des molécules (A) et (B) avec la butyrylcholinestérase. À droite: les inhibiteurs étudiés à l'intérieur des sites actifs avec les interactions	109
Figure V. 10 : Visualisation des meilleures poses de docking des molécules (A) et (B) avec la protéase principale du SARS-CoV-2	111
Figure V. 11 : À gauche : Diagrammes d'interaction en 3D des molécules (A) et (B) avec	

la protéase principale du SARS-CoV-2: À droite: les inhibiteurs étudiés à l'intérieur des sites actifs avec les interactions	112
Figure V. 12 : Diagrammes d'interaction en 2D des inhibiteurs étudiés avec la protéase principale du SARS-CoV-2	114

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. 1 : Espèces réactives d'azote d'intérêt biologique	22
Tableau I. 2 : Espèces réactives d'oxygène d'intérêt biologique	23
Tableau II. 1 : Structures chimiques et propriétés physiques des réactifs utilisés pour déterminer l'activité antioxydante	44
Tableau II. 1 : Structures chimiques et propriétés physique des réactifs utilisés dans l'activité anti-enzymatique	51
Tableau III. 1 : Caractères physicochimiques principaux des solvants utilisés	59
Tableau III. 2 : Caractères physicochimiques principaux des réactifs utilisés	60
Tableau III. 3 : Rapports frontaux des produits analysés par CCM	63
Tableau III. 4 : Solubilité des produits synthétisés dans les solvants organiques principaux et dans l'eau	64
Tableau III. 5 : Caractères principaux des produits synthétisés	64
Tableau III. 6 : Paramètres spectrales caractéristiques des spectres UV-Vis des produits de départ et des acides synthétisés enregistrés en DMSO à température ambiante	67
Tableau III. 7 : Principaux pics caractéristiques des vibrations IR des produits synthétisés et leurs produits de départ correspondant	69
Tableau IV. 1 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA	79
Tableau IV. 2 : Pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS en fonction des concentrations des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA	80
Tableau IV. 3 : Pourcentage d'inhibition des molécules (A),(B) et standards BHT et BHA, par peroxydation du β -carotène	82
Tableau IV. 1 : Pouvoir réducteur cuivrique(CUPRAC) exprimé en absorbance des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA	83
Tableau IV. 2 : Pouvoir réducteur des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA sur le fer, déterminé par la méthode FRAP	85
Tableau IV. 3 : Pouvoir réducteur des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA sur le fer déterminé par la méthode de phénanthroline	86
Tableau IV. 4 : L'inhibition de α -glucosidase (activité antidiabétique) par les molécules synthétisées (A), (B) et le standard acarbose	88

Tableau V. 1 : Les indices de réactivité chimique globale des molécules (A) et (B)	98
Tableau V. 2 : Résultats du docking moléculaire des inhibiteurs étudiés (A) et(B) avec l'alpha-glucosidase	102
Tableau V. 3 : Distribution d'énergie des différentes interactions entre les inhibiteurs étudiés et l'alpha-glucosidase	104
Tableau V. 4 : Résultats du docking moléculaire des inhibiteurs étudiés (A) et(B) avec l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase	107
Tableau V. 5 : Distribution d'énergie des différentes interactions entre les inhibiteurs étudiés et l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase	110
Tableau V. 6 : Résultats du docking moléculaire des inhibiteurs étudiés (A) et (B) avec la protéase principale du SARS-CoV-2	113
Tableau V. 7 : Distribution d'énergie des différentes interactions entre les inhibiteurs étudiés et la protéase principale du SARS-CoV-2	115

INTRODUCTION

GENERALE

Introduction générale

Les composés organophosphorés jouent un rôle primordial dans la chimie des vivants, et prépondérant dans de nombreux biomolécules et métabolites biologiques. Les phosphates représentent la forme la plus abondante du phosphore intracellulaire, soit sous la forme d'anions libres, soit sous la forme de composés organiques possédant une importance cruciale dans de nombreux processus biologiques, y compris les voies de signalisation, le stockage de l'information, et le transfert d'énergie [1, 2].

En revanche, les phosphinates, comme les phosphonates sont rarement rencontrés dans les organismes vivants. Mais les connaissances actuelles, concernant les voies métaboliques et les enzymes impliquées dans la production d'un certain nombre de ces composés naturels, ont engendré une reconsidération de cette famille de composés [3, 4].

D'un point de vue chimique, les phosphinates diffèrent des phosphates par la présence de deux liaisons phosphore-carbone à la place des deux liaisons phosphore-oxygène, tandis que, les phosphonates sont caractérisés par la présence d'une seule liaison phosphore-carbone. La substitution d'un atome d'oxygène par un atome de carbone plus stable empêche l'hydrolyse de ces molécules par la phosphatase, ce qui permet généralement d'accéder à des composés aussi actifs, plus stables et plus lipophiles [5]. Les molécules possédant un groupement phosphinate ou phosphonate ont un champ d'activités biologiques très étendu [6].

Généralement, les phosphinates avec les phosphonates se comportent comme des bioisostères des phosphates, des acides carboxyliques et divers intermédiaires tétraédriques intervenant dans les réactions enzymatiques [7], ce qui explique leur large utilisation en biochimie et en médecine comme régulateurs, médiateurs ou inhibiteurs d'enzymes.

Il est bien connu que les dérivés phosphonates/phosphinates ont un large champ d'applications dans les domaines de l'agriculture, de l'industrie, de la chimie médicinale, des intermédiaires synthétiques et des catalyseurs [8-11]. Les dérivés de l' α -aminophosphonate et de l' α -aminophosphinate sont des analogues structuraux des acides α -aminés correspondants dans lesquels le groupe acide carboxylique est remplacé par un groupe acide phosphonique, $P(O)(OH)_2$, ou phosphinique, $P(O)(OH)R$ (dans lequel R peut être H, alkyle ou aryle). Ces dérivés représentent une classe importante de composés organophosphorés en raison de leur activité biologique exceptionnelle [12-14]. Dans ce contexte, les α -aminophosphinates et les

α -aminophosphonates ont montré des propriétés pharmacologiques intéressantes et utiles contre diverses maladies telles que : les agents antigrippaux, antihépatitiques, antipaludiques, antiprolifératifs [15], anti-VIH [15,16], anti-Alzheimer [15,17], antiviraux [18], antioxydants [19, 20], anti-inflammatoires [15,19], antifongiques et antimicrobiens [15-21]. Ils agissent comme des antibiotiques potentiels [22], des antitumoraux [23] et des inhibiteurs d'enzymes [24]. Ils ont également diverses applications dans l'industrie agricole [25] et en électrochimie comme agents anticorrosifs [26, 27]. En outre, ils peuvent être utilisés comme agents complexants [28]. C'est pourquoi, ces dernières années, la synthèse des dérivés phosphorylés α -substitués (acides phosphoniques et phosphiniques) a fait l'objet d'une attention considérable et des efforts importants ont été consacrés à la mise au point de procédures plus efficaces pour la synthèse de cette famille particulière de composés organophosphorés [29].

En général, les réactions multicomposantes (RCM) en une seule étape, y compris la réaction de type Mannich et la réaction de Kabachnik-Fields, sont considérées comme la voie la plus rapidement efficace pour synthétiser les dérivés de l' α -aminophosphonate et de l' α -aminophosphinate [30-34]. Dans ce contexte, les RCM présentent une multitude d'avantages évidents tels qu'une méthode rapide pour construire des molécules complexes et structurellement variées, la réduction du nombre d'étapes chimiques, l'économie d'atomes plus élevée et l'utilisation de catalyseurs simples [35, 36]. Récemment, les RCM ont été largement appliquées dans la chimie pharmaceutique et médicale afin de synthétiser plusieurs composés. La réaction de Kabachnik-Fields (phospha-Mannich) est l'une des plus importantes réactions à trois composants une seule étape (*one-pot*) utilisées pour préparer des dérivés α -aminophosphonates et α -aminophosphinate.

En raison des facteurs mentionnés ci-dessus, ce travail de recherche a été effectué dans la continuité des travaux précédents de notre équipe de recherche de laboratoire (LEMMC) autour la synthèse de nouvelles dérivées phosphonates et l'étude de leurs différentes activités biologiques, leurs propriétés complexantes et leurs applications dans la lutte contre la corrosion. A cet effet et pour contribuer à l'enrichissement de cette catégorie des molécules multidisciplinaires, nous avons synthétisé deux acides : l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphinique (A) et l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphonique (B), puis on a effectué des applications biologiques différentes sur leurs aspects pharmacologiques.

Notre thèse est subdivisée en cinq chapitres :

- Dans le premier chapitre, nous allons présenter un aperçu général sur les composés organophosphorés en particulier les phosphinates et les phosphonates, leurs dérivées, leurs méthodes de synthèse et leurs différents domaines d'applications. Une brève revue bibliographique sur les applications réalisées : activités antioxydants, anti-enzymatiques.

- Le deuxième chapitre décrit les procédés expérimentaux appliqués dans la synthèse et la caractérisation physicochimique et spectroscopique des molécules synthétisées, ainsi que, les principes de différentes méthodes d'analyse utilisées pour évaluer *in vitro*, les activités antioxydante, antidiabétique et anti Alzheimer des molécules ciblées.

- Le troisième chapitre regroupe les résultats de la synthèse et la caractérisation des acides synthétisés selon la réaction de *Kabachnik-Fields*.

- Dans le quatrième chapitre nous allons exposer les résultats et la discussion de l'étude des propriétés biologiques des molécules synthétisées.

- Le cinquième chapitre regroupe les résultats de la modélisation moléculaire, notamment les calculs de la chimie quantique (DFT) et le docking moléculaire pour déterminer certaines propriétés moléculaires importantes comme les propriétés électroniques, la stabilité et la réactivité, qui sont liées à la structure moléculaire d'une part, et d'autre part afin d'estimer l'affinité entre l' α -glucosidase, l'AChE, la BChE et la protéase principal du SARS-CoV-2 et les molécules testées et pour analyser les interactions intermoléculaires impliquées.

Enfin, ce manuscrit se termine par une conclusion générale qui récapitule les principaux résultats obtenus au cours de la réalisation de ce travail, ainsi que certaines perspectives envisagées.

Références Bibliographique :

- [1] M. Butusov, A. Jernelöv, Phosphorus: An element that could have been called Lucifer. Springer New York. 9 (2013).
- [2] M.W. Bowler, M. J. Cliff, J. P. Waltho, G. Michael Blackburn, Why did Nature select phosphate for its dominant roles in biology?, Journal of Chemistry. 34 (2010) 784-794.
- [3] W.W. Metcalf, W.A. Van der Donk, Biosynthesis of phosphonic and phosphinic acid natural products, Annual Review of Biochemistry. 78 (2009) 65-94.
- [4] S.C. Peck, J. Gao, W.A. Van der Donk, Discovery and biosynthesis of phosphonate and phosphinate natural products, Methods In Enzymology. 516 (2012) 101-123.
- [5] J.R. Van Wazer, Phosphorus and its compounds, Interscience Publishers. 93 (1961).
- [6] a) F.R. Atherton, C.H. Hassal, R.W. Lambert, Synthesis and structure-activity relationships of antibacterial phosphonopeptides incorporating (1-aminoethyl) phosphonic acid and (aminomethyl) phosphonic acid. Journal of medicinal chemistry. 29 (1986) 29-40. b) D.F. Wiemer, Synthesis of nonracemic phosphonates. Tetrahedron. 53 (1997) 16609-16644. c) R. Engel, Phosphonates as analogues of natural phosphates, Chemical Reviews. 77 (1977) 349-367.
- [7] R.A. Dwek, Glycobiology: toward understanding the function of sugars, Chemical reviews. 96 (1996) 683-720.
- [8] (a) K.A. Schug, W. Linder, Noncovalent binding between guanidinium and anionic groups: focus on biological- and synthetic-based arginine/guanidinium interactions with Phosph[on]ate and Sulf[on]ate residues, Chemical Reviews. 105 (2005) 67–113 ; (b) K. Moonen, I. Laureyn, C.V. Stevens, Synthetic methods for azaheterocyclic phosphonates and their biological activity, Chemical Reviews. 104 (2004) 6177–6215 ; (c) F. Palacios, C. Alonso, J.M. Santos, β -phosphono- and phosphinopeptides derived from β -amino-phosphonic and phosphinic acids, Current Organic Chemistry. 8 (2004) 1481–1496.
- [9] S. Demkowicz, J. Rachon, M. Dasko, W. Kozak, Selected organophosphorus compounds with biological activity. Applications in medicine, RSC Adv. 6 (2016) 7101–7112.
- [10] A. Tajti, G. Keglevich, The importance of organophosphorus compounds as biologically active agents, in: G. Keglevich (Ed.), Organophosphorus Chemistry–Novel Developments, De Gruyter Inc., Berlin. (2018) 53–65.

- [11] G.P. Horsman, D.L. Zechel, Phosphonate biochemistry, *Chemical Reviews*. 117 (2017) 5704–5783.
- [12] R.A. Cherkasov, V.I. Galkin, The Kabachnik-fields reaction: synthetic potential and the problem of the mechanism, *Russian Chemical Reviews*. 67 (1998) 940–968.
- [13] (a) P. Kafarski, B. Lejczak, Aminophosphonic acids of potential medical importance, *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 1 (2001) 301–312; (b) P. Kafarski, B. Lejczak, Biological activity of aminophosphonic acids, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 63 (1991) 193–215; (c) R.L. Hilderbrand, *The Role of Phosphonates in Living Systems*, CRC Press, Boca Raton. (1983). First ed.
- [14] R. Engel, *Synthesis of Carbon-Phosphorus Bond*, CRC Press, Boca Raton.(1988) First ed.
- [15] M.M. Abdou, P.M. O'Neill, E. Amigues, M. Matziari, Phosphinic acids: current status and potential for drug discovery, *Drug Discovery Today* 24 (2019) 916–929.
- [16] A.M. Polozov, S.E. Cremer, Synthesis of 2H-1,2-oxaphosphorin, *Journal of Organometallic Chemistry* . 646 (2002) 153–160.
- [17] S. Zaout, S. Chafaa, A. Hellal, O. Boukhemis, L. Khattabi, H. Merazig, N. Chafai, C. Bensouici, L. Bendjeddou, Hydroxyphenylamine phosphonate derivatives: synthesis, X-ray crystallographic analysis, and evaluation of theirs anti-Alzheimer effects and antioxidant activities, *Journal of Molecular Structure*. 1225 (2021) 129–121.
- [18] J. Huang, R. Chen, An overview of recent advances on the synthesis and biological activity of α -aminophosphonic acid derivatives, *Heteroatom Chemistry*. 11 (2000) 480–492.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] A. Hellal, S. Chafaa, N. Chafai, L. Touafri, Synthesis, antibacterial screening and DFT studies of series of α -aminophosphonates derivatives from aminophenols, *Journal of Molecular Structure*. 1134 (2017) 217–225.

- [22] M.S. Bhatia, P. Pawanjit, Phosphorus containing heterocycles as fungicides: synthesis of 2,2 - diphenylene chlorophosphonate and 2,2 - diphenylene chlorothiophosphonate, *Experientia*. 32 (1976) 1111-1111.
- [23] G. Lavielle, P. Hautefaye, C. Schaeffer, J.A. Boutin, C.A. Cudennec, A. Pierré, New α -amino phosphonic acid derivatives of vinblastine: chemistry and antitumor activity, *Journal of Medicinal Chemistry*. 34 (1991) 1998–2003.
- [24] Z. Chen, P. Marcé, R. Resende, P.M. Alzari, A.C. Frasch, J.M.H. van den Elsen, S.J. Crennell, A.G. Watts, The synthesis and kinetic evaluation of aryl α -aminophosphonates as novel inhibitors of *T. cruzi* trans-sialidase, *European Journal of Medicinal Chemistry*.. 158 (2018) 25–33.
- [25] (a) L. Maier, Organic phosphorus compounds 91.1 synthesis and properties of 1-amino-2-arylethylphosphonic and-phosphinic acids as well as phosphine oxides, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. 53 (1990) 43–67 ; (b) L. Maier, P.J. Diel, Organic phosphorus compounds 941 preparation, physical and biological properties of amino-arylmethylphosphonic and phosphonous acids, Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. 57 (1991) 57–64.
- [26] 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 0.5 M H₂SO₄: experimental and theoretical studies, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 70 (2017) 331–344.
- [27] 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.
- [28] E. Farkas, I. Sóvágó, Metal complexes of amino acids and peptides, in: G.C. Barrett, J.S. Davies (Eds.), *Amino Acids Peptides and Proteins*, Royal Society of Chemistry, Cambridge. 33 (2002) 295-364.
- [29] (a) M. Ordóñez, H. Rojas-Cabrera, C. Cativiela, An overview of stereoselective synthesis of α -aminophosphonic acids and derivatives, *Tetrahedron* 65 (2009) 17–49 ; (b) 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, *Current Organic Chemistry*. 15 (2011) 2015–2071.

- [30] A. Shahrise, R. Teimuri-Mofrad, M. Gholamhosseini-Nazari, Synthesis of a new class of betti bases by the mannich-type reaction: efficient, facile, solvent-free and one-pot protocol, *Molecular Diversity*. 19 (2015) 87–101.
- [31] M.M. Salter, J. Kobayashi, Y. Shimizu, S. Kobayashi, Direct-type catalytic three-component mannich reactions leading to an efficient synthesis of α , β -diamino acid derivatives, *Organic Letters*. 8 (2006) 3533–3536.
- [32] 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, *The Journal of Organic Chemistry*. 72 (2007) 1263–1270.
- [33] 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 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ or molecular iodine, *Organic and Biomolecular Chemistry*. 4 (2006) 1663–1666.
- [34] B.C. Ranu, A. Hajra, U. Jana, A simple, efficient, and general one-pot reaction of aldehydes and ketones with amines in the presence of indium(III) chloride as a catalyst provides α -amino phosphonates. Sonication accelerates the reaction, *Organic Letters*. 1 (1999) 1141–114
- [35] E. Ruijter, R. Scheffelaar, R.V. Orru, Multicomponent reaction design in the quest for molecular complexity and diversity, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 6234–6246.
- [36] B.H. Rotstein, S. Zaretsky, V. Rai, A.K. Yudin, Small heterocycles in multicomponent reactions, *Chemical Reviews*. 114 (2014) 8323–8359.

CHAPITRE I

Rappels Bibliographiques

I.1 Introduction

Le phosphore est l'un des éléments principaux de l'écorce terrestre, il constitue environ de 0,1% de sa nombre total d'atome et on lui connaît un seul isotope stable. Il est considéré, avec le potassium (K) et l'azote (N), comme un macronutriment fondamental pour tous les organismes vivants [1], il est largement répandu en tant que constituant moléculaire, aussi bien dans le monde animal et végétal que dans de nombreux composés inorganiques se trouvant à la surface de la terre. Il représente environ 2 à 4 % du poids sec de la plupart des cellules [2].

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. En outre, Le phosphore a la capacité à former des composés hypervalents et de faire des liaisons avec des métaux pour faire des complexes à cause des orbitales(d) vides qui acceptent facilement des électrons provenant de bons donneurs. Ainsi que leur fort caractère oxophile, qui augmente leur réactivité en synthèse organique [3].

L'extension extraordinaire des découvertes autour du phosphore et ces applications scientifiques ont formulé une branche médus de la science chimique, connue par « La chimie du phosphore ». Cette spécialité relie la biochimie à la chimie des matériaux et à l'ingénierie moléculaire, en tenant compte de la relation étroite de l'élément avec les organismes vivants et les applications captivantes des composés organophosphorés.

I.2 Composés organophosphorés

Les composés organophosphorés (COP) sont des composés organiques qui portent au moins un atome de phosphore lié directement à un carbone [4], ils se répartissent en différentes classes selon le degré d'oxydation du phosphore, aussi la nature des substituants et le nombre de liaisons liés au phosphore [5]. Parmi celles-ci on retrouve (Figure I. 1) :

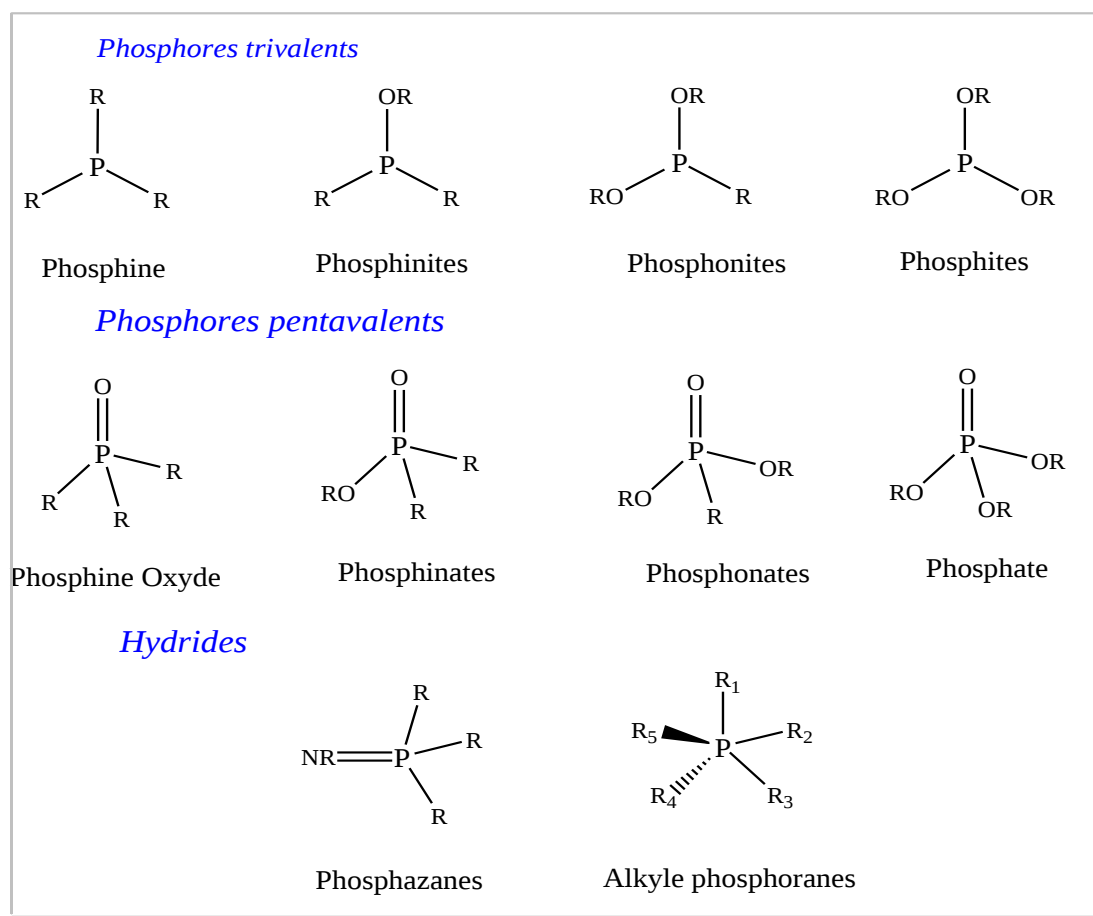


Figure I. 1 : *Nomenclature des familles d'organophosphorés* [5].

Les propriétés physico-chimiques (volatilité, stabilité, solubilité ...etc.), la toxicité des composés organophosphorés sont très variables et dépendent de la nature des substituants (atomes de soufre, oxygène, chaînes latérales ...etc.) liés à l'atome de phosphore et du type de liaisons (covalente ou double liaison) liant le ou les substituants à l'atome de phosphore.

Les composés organophosphorés sont caractérisés par une excellente stabilité chimique et une très bonne solubilité dans l'eau, ce qui permet de leurs usages dans la composition des médicaments [6], des huiles additives et insecticides [7], agents plastifiants, agents de flottation [8], dans l'inhibition de la corrosion [9] ...ect.

Les phosphinates et les phosphonates sont considérés parmi les familles des composés organophosphorés les plus importants vis-à-vis leurs diverses applications en différents domaines [10].

I.3 Phosphinates et phosphonates

I.3.1 Définition

Les phosphinates et les phosphonates sont des composés organiques contenant un ou plusieurs groupements $C-P(O)(OH)R$ ou $C-PO(OR)_2$ respectivement avec (R =alkyl, aryle). Ils sont des analogues des phosphates naturels (phosphates glycosidiques, nucléotidiques, phospholipides, phosphates produits par la glycolyse), ils ont des propriétés chimiques et biologiques différentes [11].

D'un point de vue chimique, les phosphinates diffèrent des phosphates par la présence de deux liaisons phosphore-carbone à la place des deux liaisons phosphore-oxygène, tandis que, les phosphonates sont caractérisés par la présence d'une seule liaison phosphore-carbone (Figure I. 2).

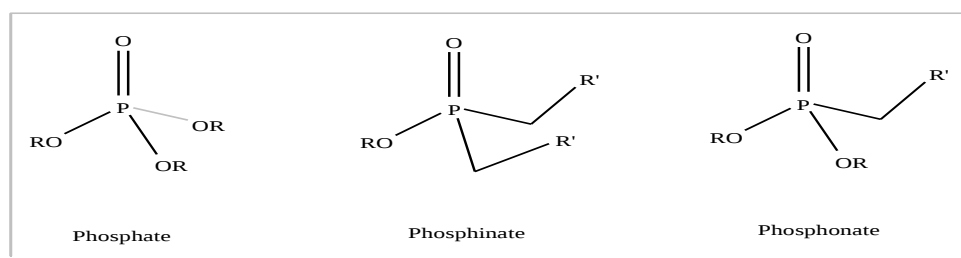


Figure I. 2 : Structure des phosphates et leurs analogues phosphinates / phosphonates.

La substitution d'un atome d'oxygène par un atome de carbone plus stable empêche l'hydrolyse de ces molécules par la phosphatase, ce qui permet généralement d'accéder à des composés aussi actifs, plus stables et plus lipophiles [12]. Les molécules possédant un groupement phosphinate ou phosphonate ont un champ d'applications biologiques et pharmacologiques très étendu.

I.3.2 Phosphinates et phosphonates dans la nature

Parmi les produits naturels, les composés possédant une liaison carbone-phosphore dans leur structure sont rarement trouvés. Actuellement, seulement une vingtaine de phosphonates naturels ont pu être isolés et caractérisés. Ces molécules ont été extraites de microorganismes mais aussi d'animaux terrestres et aquatiques. Cette rareté les rend uniques puisque la plupart parmi eux présentent une activité biologique importante et intéressante. Il est à noter que des propriétés antibactériennes, antivirales, antibiotiques, pesticides ou anticancéreuses ont été observées chez plusieurs composés de ce type. Leur activité serait liée à la nature relativement inerte du lien C-P mais aussi aux similitudes physiques entre les

groupements acides phosphoniques, phosphates et acides carboxyliques. Cette dernière caractéristique expliquerait leur capacité à inhiber plusieurs processus enzymatiques [13 ,14].

L'acide 2-aminoéthylphosphonique (AEP) ou bien la ciliatine que l'on trouve dans la flore du rumen de mouton est le premier composé naturel isolé contenant un lien C-P (Figure I. 3). Il a été isolé pour la première fois en 1959 d'un protozoaire. C'est l'un des phosphonates les plus abondants dans la nature. En effet, depuis sa découverte, il a été isolé de plusieurs autres sources différentes (invertébrés marins, microorganismes, humains) [15].

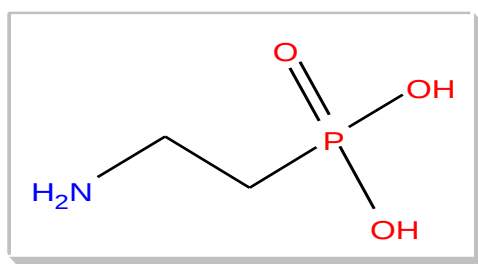


Figure I. 3 : La formule de Ciliatine

La souche de *Streptomycesregensis* a été considérée comme producteur potentiel d'acide phosphonique dans un criblage à grande échelle de micro-organismes. Récemment, trois nouveaux acides phosphoniques extraits de *Streptomycesregensis* ont été identifiés et caractérisés : 2-acides acétamidoéthylphosphoniques (**1**), 2-acétamido-1-hydroxy éthyl phosphonique (**2**) et un nouveau phosphonate contenant de la cyanohydrine, l'acide (cyano (hydroxy) méthyle) phosphonique (**3**) (Figure I. 4) [16].

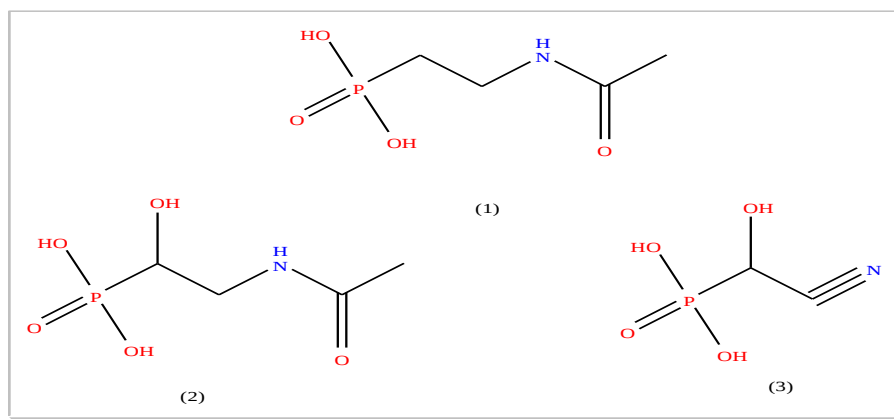


Figure I. 4 : Structures de phosphonates isolés à partir de *Streptomycesregensis*.

I.3.3 Domaines d'application des phosphinates et des phosphonates

Les champs d'applications des phosphates, phosphinates, phosphonates et autres phosphines, sont extrêmement nombreux et touchent pratiquement l'ensemble des aspects de la vie de tous les jours. Nous présentons quelques domaines d'application ainsi que les travaux antérieurs cités dans la littérature.

I.3.3.1 Dans La biologie, la médecine et la pharmacologie

Les phosphinates et 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 [17] et la grande stabilité de la liaison P-C qui empêche leur hydrolyse par la phosphatase [12].

I.3.3.1.1 Activité anticancéreuse :

De nos jours, plusieurs composés phosphorylés de structures différentes ont montré une grande efficacité thérapeutique contre différentes tumeurs cancéreuses. Parmi les nombreux exemples présents dans la littérature, *Huang et al* ont développé la synthèse d'une nouvelle série d' α -aminophosphonates dérivés de l'acide dé-hydro-abiétiqque (Figure I. 5) [18]. Ces dérivés ont été examinés *in vitro* vis-à-vis des cellules tumorales. Les résultats obtenus ont montré une activité supérieure à celle du 5-fluorouracil (médicament anticancéreux utilisé comme référence).

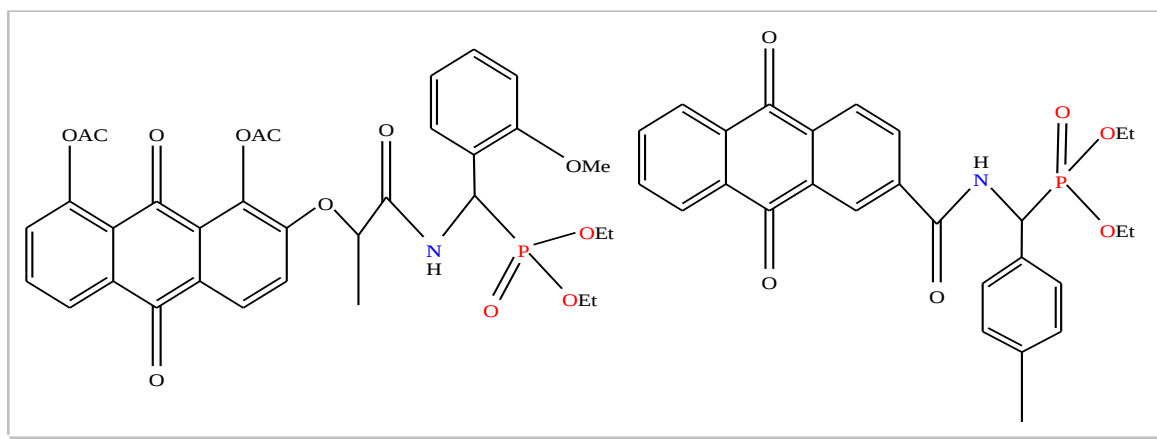


Figure I. 5 : Structures d' α -aminophosphonates ayant une activité anti-tumorale.

I.3.3.1.2 Activité antibactérienne :

Récemment, une nouvelle série d' α -aminophosphonates a été synthétisée par Narayana Reddy *et al* (Figure I. 6), et évaluée pour son activité antibactérienne *in vitro* vis-à-vis des bactéries à Gram positif (*Escherichia coli*) et à Gram négatif (*Staphylococcus aureus*). Les résultats obtenus ont montré une activité supérieure à la pénicilline (médicament utilisé dans le traitement des infections bactériennes) [19].

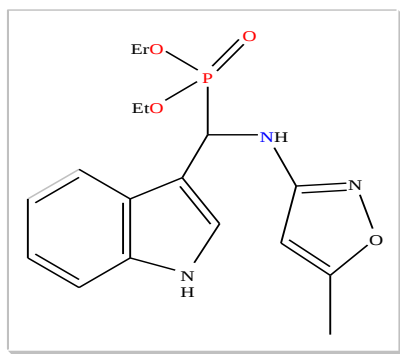


Figure I. 6 : Structures d' α -aminophosphonates à activité antibactérienne.

I.3.3.1.3 Activité antiviral :

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est le rétrovirus responsable du tristement célèbre syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Comme tous les rétrovirus, les inhibiteurs de protéases constituent une classe thérapeutique d'antirétroviraux, ils ont pour fonction de protéger l'organisme d'une activité protéolytique exogène en empêchant une cellule infectée de produire de nouvelles particules virales. Plusieurs dérivés d' α -aminophosphinates (Figure I. 7) ont été testés pour leur activité inhibitrice de la protéase du VIH [20].

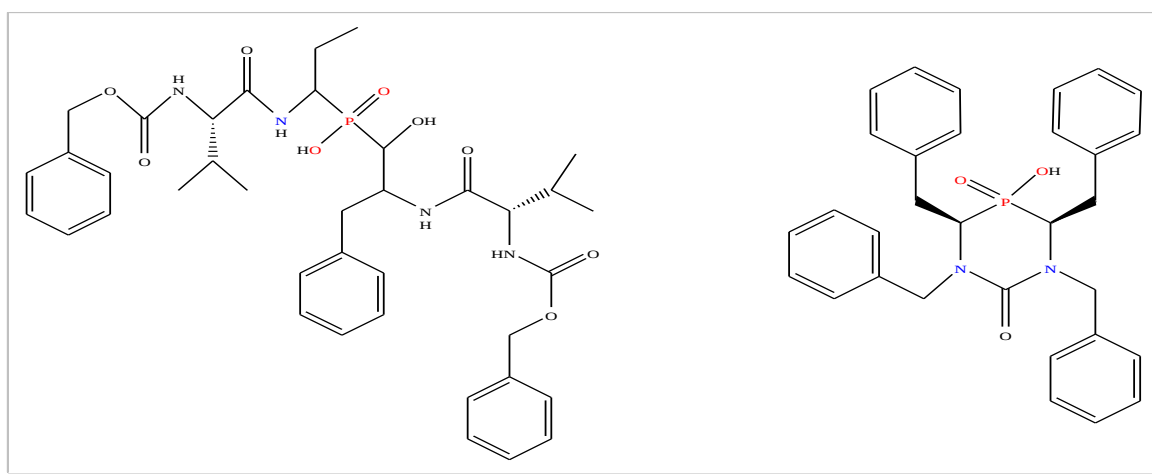


Figure I. 7 : structures d' α -aminophosphinates à activité inhibitrice de la protéase.

I.3.3.1.4 Activité Anti-inflammatoire :

Les composés phosphorés contenant des hétérocycles tel que : les oxaphospholes, l'oxaphosphinine et le vinyloxaphosphinine ont été décrits comme des anti-inflammatoires (Figure I. 8) [21, 22].

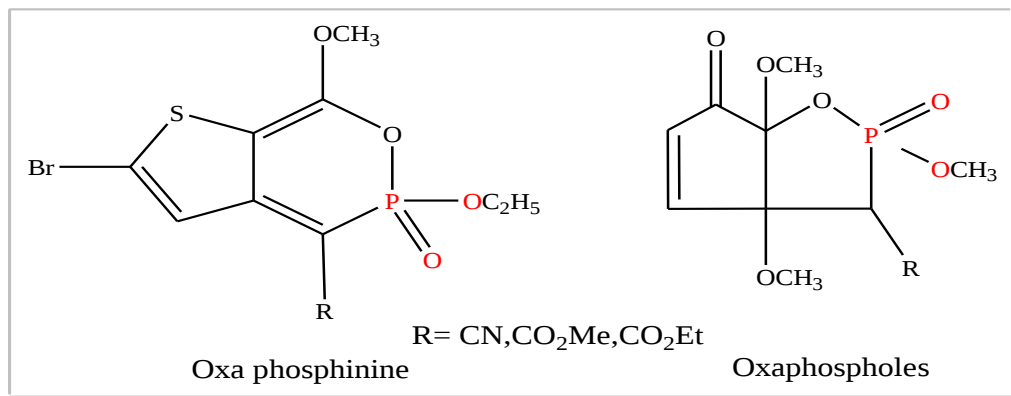


Figure I. 8 : Structures chimiques des anti-inflammatoires contenant des groupements phosphinate ou phosphonate

I.3.3.2 Dans l'agriculture

Pendant des années, de nombreux composés organophosphorés ont été fabriqués et utilisés en très grandes quantités dans l'agriculture, non seulement comme les insecticides mais aussi comme herbicides et régulateurs de la croissance des plantes. Les composés du phosphore ont des avantages distincts dans le marché des pesticides ; ils sont relativement faciles à faire, et facile a dégrader par hydrolyse, de sorte que les problèmes de l'activité résiduelle, si grave avec les pesticides d'hydrocarbures chlorés, sont à évités. Parmi ces composés organophosphorés on est trouvé : Le Buminafos qui est utilisé comme régulateur de la croissance des plantes dans l'industrie de l'agrochimie. Le glyphosate qui est l'un des pesticides les plus utilisés dans le monde [23].

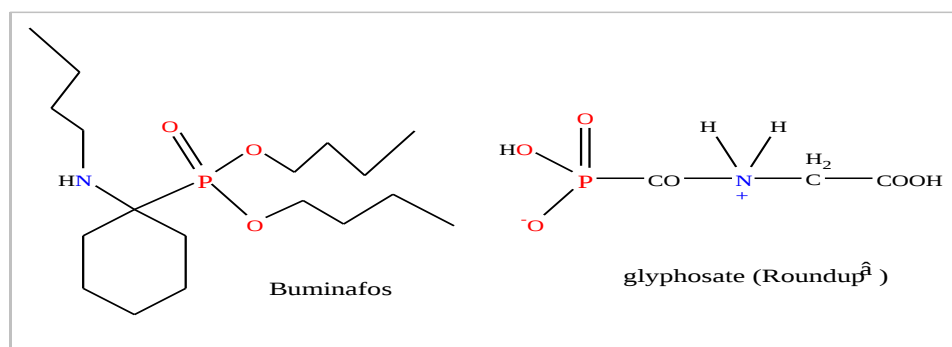


Figure I. 9 : Structures des composés phosphonates utilisés dans l'agriculture.

I.3.3.3 Dans la corrosion

Les phosphinates et les phosphonates sont considérés comme inhibiteurs de corrosion et plusieurs travaux ont été présentés pour impliquer l'importance de ces composés en tant qu'inhibiteurs de corrosion, parmi ceux-ci :

- L'étude de l'activité inhibitrice de L'acide 4-(2- {[ethoxy (hydroxy) phosphonyl] (3-nitrophenyl) methyl} hydrazinyl) benzoïque (Figure I. 10) vis-à-vis de la corrosion de l'acier XC48 dans l'acide sulfurique 0.5M par *N. Chafai et al* montre que la molécule étudiée représente un inhibiteur de corrosion efficace [24].
- La synthèse d'une série de dérivés d' α -hydroxyphosphonates ainsi que leurs acides correspondants, par *L. Ouksel et al* [25] (Figure I. 10), suivie par une étude de leurs activités inhibitrices de corrosion vis-à-vis de l'acier l'acier XC48 dans un milieu acide (HCl ; 1M).

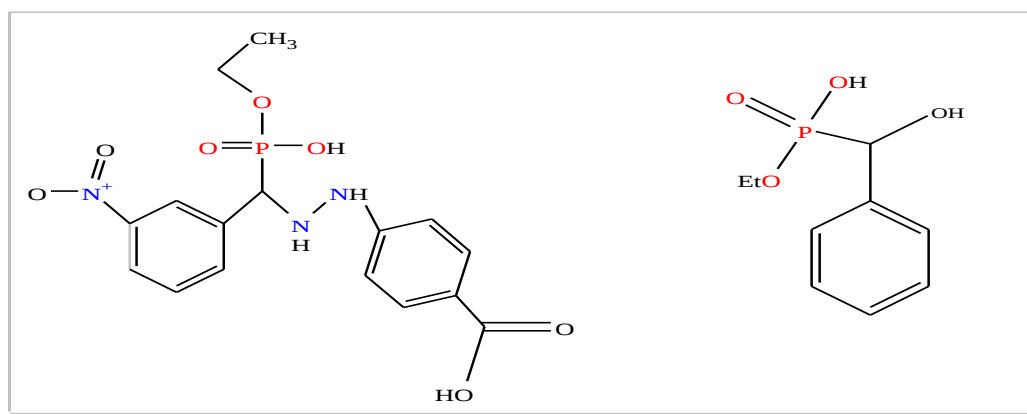


Figure I. 10 : certains exemples des inhibiteurs de la corrosion contenant le motif Phosphonate

I.4 Les α -aminophosphinates et les α -aminophosphonates

Les dérivés de l' α -aminophosphinate et de l' α -aminophosphonate sont des analogues structurels des acides α -aminés correspondants dans lesquels le groupe acide carboxylique est remplacé par un groupe acide phosphonique, $P(O)(OH)_2$, ou phosphinique, $P(O)(OH)R$ (dans lequel R peut être H, alkyle ou aryle) (Figure I. 11). Ces dérivés représentent une classe importante de composés organophosphorés en raison de leur activité biologique exceptionnelle [26-28]. Dans ce contexte, les α -aminophosphinates et les α -aminophosphonates ont montré des propriétés pharmacologiques intéressantes et utiles contre diverses maladies telles que : les agents antigrippaux, antihépatitiques, antipaludiques, antiprolifératifs, [29], anti-VIH [29, 30], anti-Alzheimer [29, 31], antiviraux [32], antioxydants [33, 34], anti-inflammatoires [29, 33], antifongiques et antimicrobiens [29, 35]. Ils ont également diverses applications dans l'industrie agricole [36] et en électrochimie comme agents anticorrosifs [37, 38].

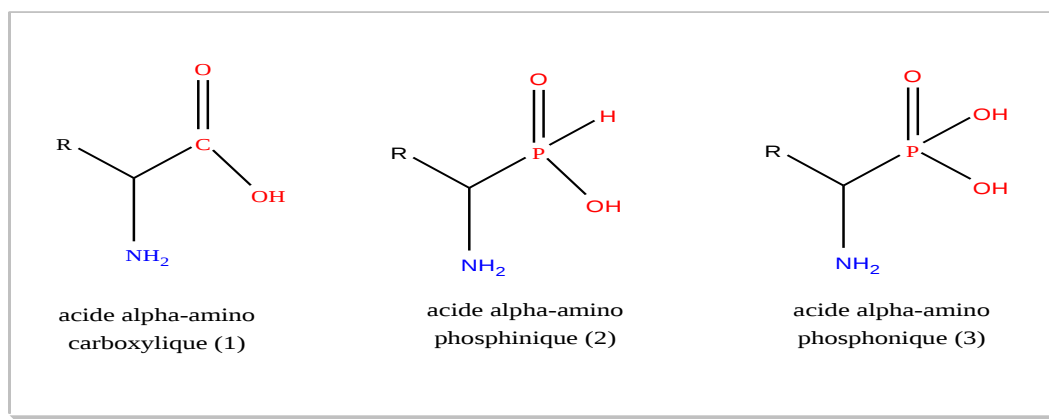


Figure I. 11 : la structure générale des α -amino acids (1) et leur analogues phosphinique (2) et phosphonique (3).

I.4.1 Méthodes d'accès aux α -aminophosphinates et α -aminophosphonates

Les α -aminophosphinates et les α -aminophosphonates en tant que des analogues des acides α -aminés, occupent une place importante et révèlent diverses propriétés biologiques et biochimiques intéressantes. Compte tenu de l'immense importance de ces composés organophosphorés, les chercheurs s'y sont orientés ces dernières années vers la découverte de nouvelles méthodes de la synthèse de ces composés. Dans ce contexte plusieurs voies et procédures de préparation des dérivés α -aminophosphinates et α -aminophosphonates ont été développées et décrites dans la littérature.

I.4.1.1 Réaction de Kabachnik-Fields

La réaction de Kabachnik-Fields constitue une méthode de choix pour la synthèse des α -aminophosphonates. Cette réaction, indépendamment découverte par Kabachnik, Medved [39] et Fields [40] en 1952, est une réaction à trois composants s'effectuant en une seule étape «one pot » (Schéma I. 1).

Elle est réalisée à partir d'une amine, d'un dérivé carbonyle (aldéhyde ou cétone) et d'un dérivé hydrophosphoryle. Cette réaction peut être conduite en présence ou en absence de solvant, de catalyseur et de dérivé hydrophosphoryle, le plus utilisé est un hydrogénophosphonate de dialkyle [41].

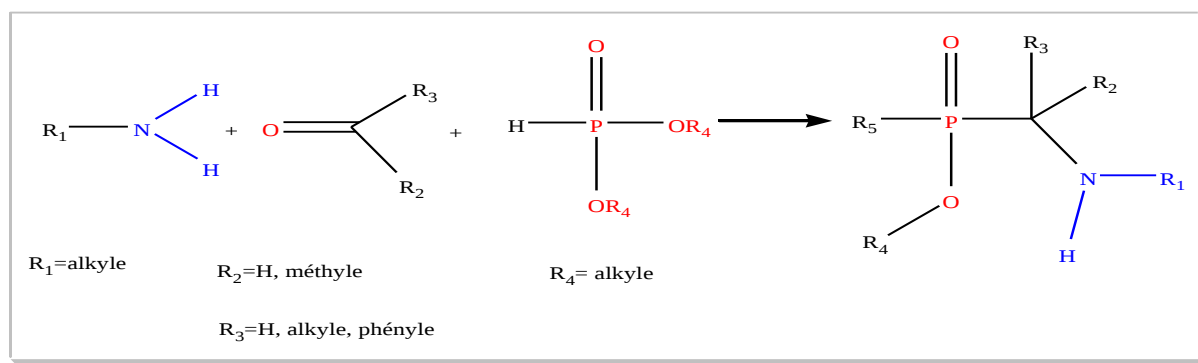


Schéma I. 1 : Schéma général de la réaction de Kabachnik-Fields.

Dans certains cas, la réaction Kabachnik-Fields est réalisée sans catalyseur. 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 (III) [42] ou de magnésium [43] le trichlorure d'indium [44] le sulfate de magnésium [45] la silice [46] ...etc.

La réaction de Kabachnik-Fields a été étendue à des espèces comprenant la fonction $>P(O)H$, à des phosphites cycliques, acycliques et H-phosphinates cycliques, ainsi que les oxydes de phosphines secondaires. D'autre part, des amines hétérocycliques ont également été utilisées pour préparer une nouvelle α -aminophosphonique, phosphinique et des dérivés d'oxyde de la phosphine. Donc, la gamme de composés qui peut être impliquée dans ce procédé est extrêmement large. La réaction peut être effectuée avec ou sans catalyseur, avec ou sans solvant. Il y a beaucoup d'exemples de cette réaction dans la littérature.

- **Mécanismes possibles pour la réaction 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. Il semble que le mécanisme dépende de la nature des réactifs [47].

Deux mécanismes généraux ont été proposés (Schéma I. 2) qui se distinguent par l'ordre dans lequel se font les deux étapes. Dans La proposition A, l' α -aminophosphonate est formé par une condensation de l'amine sur le composé carbonyle suivie par une hydrophosphorylation de l'imine intermédiaire, cette deuxième étape correspondant à la réaction de Pudovik [48]. Cette réaction est peut-être catalysée par diverses bases [49] ou divers acides de Lewis comme le chlorure de diméthylaluminium [50] le tri-fluorure de bore [51] le tétrachlorure d'étain [52]. La proposition B a consisté en une hydroxyphosphorylation de dialkylphosphite sur le composé carbonyle, qui constitue une réaction d'Abramov [53],

suivie de l'amination de l'hydroxyphosphonate intermédiaire pour obtenir l' α -aminophosphonate.

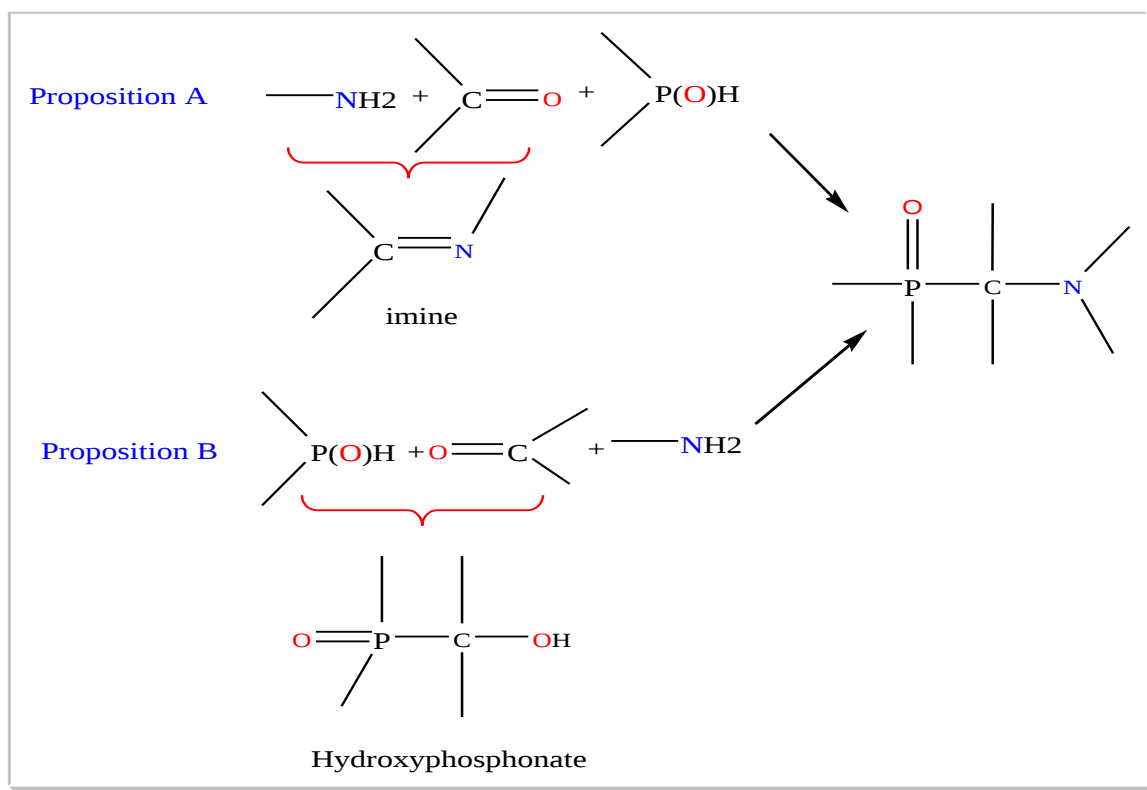


Schéma I. 2 : Propositions de mécanismes de la réaction de Kabachnik-Fields.

Une autre modification de la réaction de Kabachnik-Fields utilise des dialkylphosphites silylés, générés in situ, qui jouent le rôle de nucléophile [54]. Des chlorures de phosphore et des acides phosphoriques inorganiques sont également utilisés. Il est également possible d'ajouter des trialkylphosphites sur des imines [55] ou des sels d'iminium [56], selon des réactions de type Arbuzov.

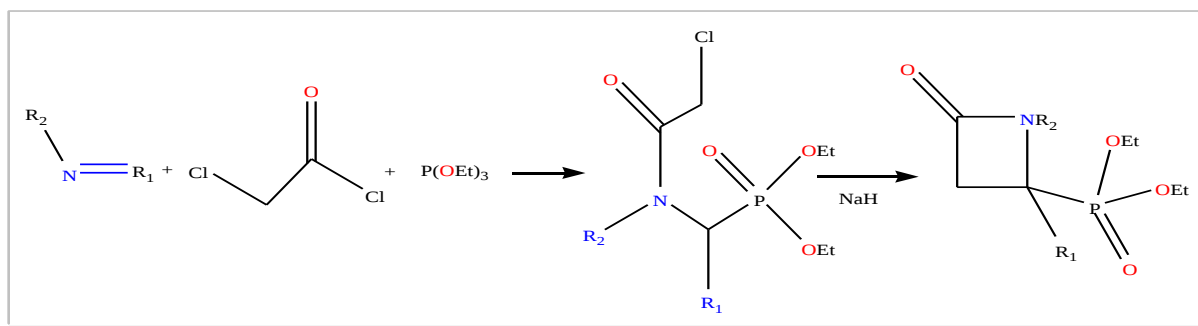


Schéma I. 3 : Synthèse d' α -aminophosphonates selon la réaction d'Arbuzov.

I.4.1.2 Réaction de Pudovik

Les imines constituent des intermédiaires synthétiques largement exploités dans la synthèse des α -aminophosphonates. Pudovik [41] a développé une voie de synthèse afin d'obtenir les α -aminophosphonates par l'emploi du diéthylephosphite et une imine portant un groupement benzyle, qui pourra être clivé par la suite par une réaction d'hydrogénation avec le palladium sur charbon (Pd/C) comme catalyseur (Schéma I. 4).

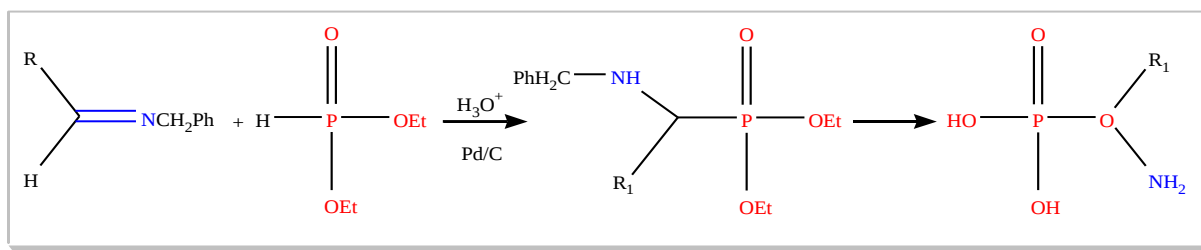


Schéma I. 4 : Réaction de Pudovik catalysée par le Pd/C.

Cette réaction peut être effectuée en solution ou en phase condensée avec des catalyseurs acides ou basiques ou juste par chauffage [57]

I.4.1.3 Réaction de Moedritzer-Irani

Une nouvelle procédure pour la synthèse des acides α -aminophosphoniques a été développée par Moedritzer et Irani, en 1966 en se basant sur la réaction de Kabachnik-Fields. Ils ont préparé des acides α -aminométhylphosphoniques en impliquant une série d'amines, le formaldéhyde et l'acide phosphoreux, (schéma I. 5) [58].

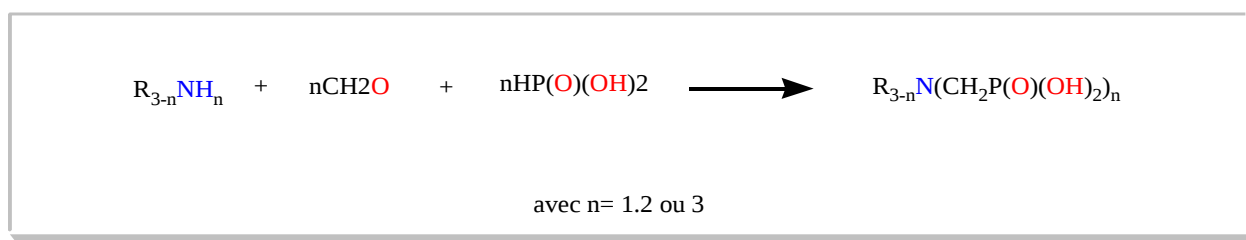


Schéma I. 5 : Réaction de Moedritzer et Irani

Cette méthode est moins générale que les autres, mais elle présente l'avantage de permettre d'accéder aux différents types de fonctions (acides phosphoniques, phosphiniques, phosphines) suivant le type de précurseurs utilisés directement sans passer par l'étape d'hydrolyse des esters correspondants.

I.4.1.4 Réaction de Mitsunobu

La synthèse des α -aminophosphonates par la réaction de Mitsunobu, est une amination nucléophile d'un α -hydroxyphosphonate. Elle a été réalisée par une réaction «one pot», entre un alcool, un azodicarboxylate, une triphénylphosphine et une amine (NH₃), elle conduit à l'azoture correspondant avec une inversion de configuration. L'azoture est ensuite réduit en amine par traitement avec la triphénylphosphine et une hydrolyse aqueuse avec un bon rendement (Schéma I. 6) [59].

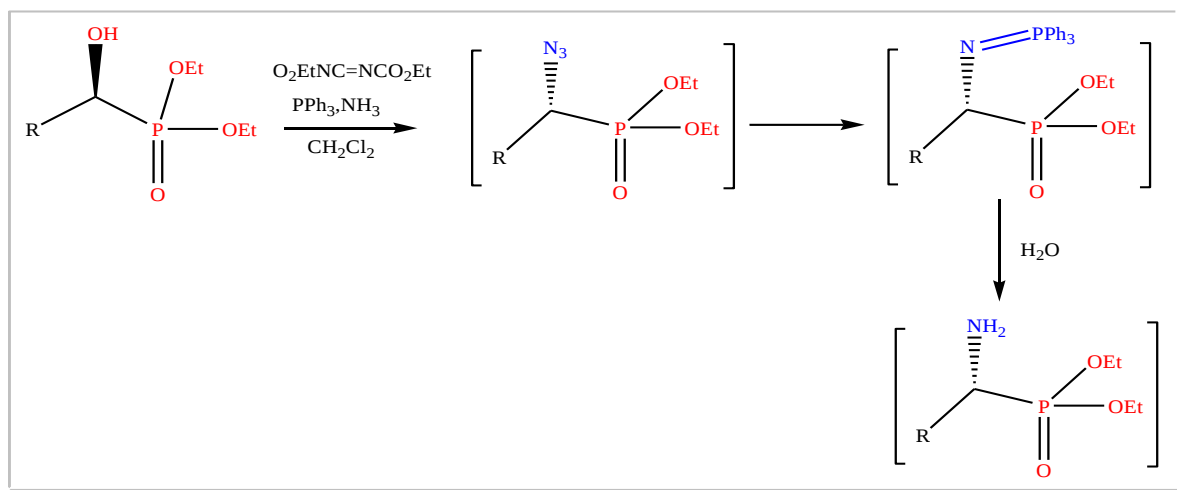


Schéma I. 6 : Synthèse des α -aminophosphonates via la réaction de Mitsunobu.

I.4.2 Méthodes d'accès aux autres composés contenant le motif phosphinate ou phosphonate

I.4.2.1 Réaction de Michaelis-Arbuzov

Cette réaction est découverte pour la première fois par *Michaelis* en 1898 [60] 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 [61].

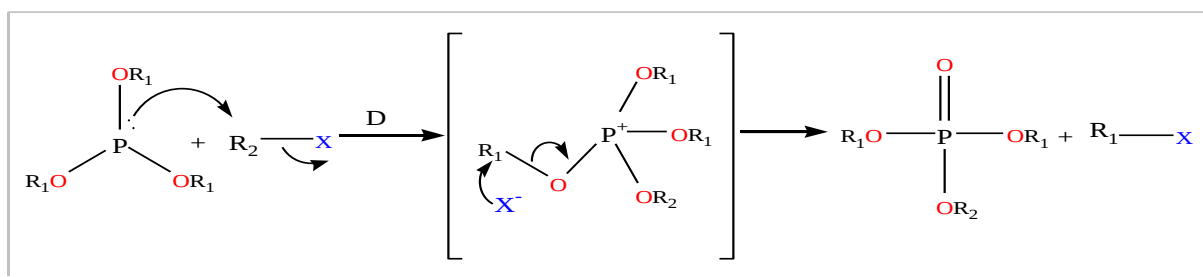


Schéma I. 7 : Synthèse des phosphonates par réaction de Michaelis-Arbuzov.

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 [62].

I.4.2.2 Réaction de Michaelis-Becker

Les phosphonates peuvent également être synthétisés par la réaction de Michaelis–Becker (schéma I. 8) décrite pour la première fois en 1897. 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 [60].

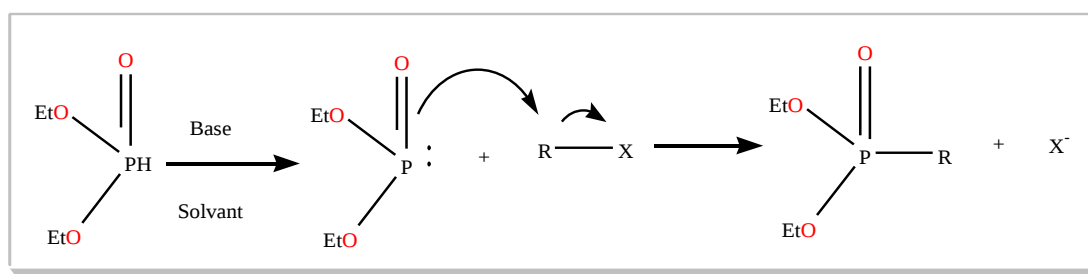


Schéma I. 8 : Synthèse des phosphonates par réaction de Michaelis-Becker.

I.5 Généralités sur les activités biologiques

I.5.1 Activité antioxydante

I.5.1.1 Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (ERO/ERN) et les défenses antioxydants de l'organisme [63]. L'importance des dommages du stress oxydant dépend de la cible moléculaire, de la sévérité de l'effort et du mécanisme par lequel l'effort oxydant est imposé [64].

Le stress oxydatif est impliqué dans différentes pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement augmente la production mitochondriale des radicaux et diminue les défenses antioxydants [65].

I.5.1.2 Radicaux libres

Les radicaux libres RL sont des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés (électron célibataire) sur leur couche périphérique, ce qui leur confère une grande instabilité et une forte réactivité [66,67]. Les espèces radicalaires vont tenter de

rappartier leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron [68]. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour des radicaux libres et initient une chaîne des réactions [69]. A des concentrations physiologiques, les radicaux libres jouent un rôle dans le maintien d'un statut redox cellulaire normal, les fonctions tissulaires et les processus de signalisation intracellulaire [70,71]. Par contre, une production excessive des RL induit la mort cellulaire et l'apoptose [72].

I.5.1.2.1 Nature des 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 [65]. Plus récemment, certains auteurs ont parlé d'ERON (espèces réactives de l'oxygène et l'azote) au lieu d'ERO pour désigner l'ensemble des espèces réactives oxydantes radicalaires ou non radicalaire. La production des ERON peut être d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou aussi une exposition des facteurs pro-oxydants dans l'environnement parmi ces facteurs : (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) [73,74].

- **Espèces réactives d'azote (ERN)**

Les espèces réactives d'azote sont considérées comme une sous-classe des radicaux libres qui sont générés par la réaction de l'oxygène avec l'azote. Contrairement aux ERO, il y a peu de données sur l'altération induite par l'ERN [75],

Tableau I. 1 : 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 d'ONOO•
<i>Dioxyde d'azote NO²</i>	<i>Formé lors de la pollution par le dioxyde atmosphérique</i>

- **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. La génération des ROS est liée au fonctionnement normal de la cellule. Cependant, elle est amplifiée dans certaines conditions pathologiques telles que l'inflammation et l'ischémie/ reperfusion, qui peuvent évoluer vers de multiples maladies [76].

Tableau I. 2 : Espèces réactives d'oxygène d'intérêt biologique

<i>Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)</i>	<i>Réactivité</i>
<i>L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$</i>	Généré dans les mitochondries et dans le système cardiovasculaire.
<i>Le 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

I.5.1.2.2 L'origine des radicaux libres

Les Radicaux Libres sont formés par un grand nombre de mécanismes, endogènes et exogènes.

- **Les sources endogènes**

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, les radicaux libres se forment en majorité, au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobies, 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 endogène des radicaux libre [77].

- **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' H_2O_2 en $\text{OH}^\bullet$ par la réaction de Fenton[78,79].

- **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.

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents extérieurs responsables de la production des radicaux libres. Ces agents incluant des toxiques présents dans notre environnement tels que (tabac, suie, goudron, polluants industriels) et les composés générés par les rayonnements UV et les radiations ionisantes ou par la prise de certains médicaments antibiotiques, anti-cancéreux [80,81] .

I.5.1.3 Antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme toute molécule naturelle ou synthétique capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder, prévenir, neutraliser ou de réduire les dommages de l'oxydation de ces substrats et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO [82]. Ils ont la capacité de contrecarrer les effets néfastes des radicaux libres dans les tissus, ils sont donc sensés pour protéger contre les maladies cardiaques, le cancer et plusieurs autres maladies métaboliques [83].

Les antioxydants sont fréquemment utilisés, ils couvrent un large nombre de molécules et filières très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique ; et peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine [84].

I.5.1.3.1 Différents types des antioxydants

- **Systèmes antioxydant endogène**

Les antioxydants endogènes sont synthétisés dans les cellules et comprennent à la fois les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

- Les principaux antioxydants enzymatiques comprennent la glutathion peroxydase (GPX), le superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT). Ces enzymes existent à l'état endogène permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire normal [85].

- Le principal antioxydant non enzymatique dans toutes les cellules est le glutathion (GSH). Cet important antioxydant non enzymatique peut agir non seulement comme un piège des oxydants indépendants, mais aussi collaborer avec la glutathion peroxydase pour éliminer le peroxyde d'hydrogène (un oxydant) de la cellule [86].

- **Systèmes antioxydants exogènes**

- **Les vitamines** : Les vitamines sont des molécules organiques requises en faible quantité indispensable pour le fonctionnement des voies métaboliques des êtres vivants. Elles réagissent sous forme de coenzyme. Parmi ces vitamines on cite la vitamine E, la vitamine A, et la vitamine C [87] .

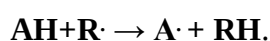
- **Les oligo-éléments** : Les oligo-éléments interviennent comme cofacteurs d'enzymes essentiels dans la lutte contre les radicaux libres. Comme exemple de ces oligo-éléments on cite ; le zinc, le sélénium et le manganèse [88].

- **Les antioxydants synthétiques** : sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers. On cite le butylate hydroxytoluene (BHT) et le butylate hydroxyanisole (BHA) qui sont des antioxydants solubles dans les lipides et fréquemment utilisés comme conservateurs dans les produits cosmétiques et alimentaires pour protéger les lipides du rancissement [89].

I.5.1.3.2 Mécanisme antioxydant

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition.

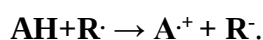
- **Transfert d'atome d'hydrogène (HAT)** où l'antioxydant peut éteindre les radicaux libres par le don d'un atome d'hydrogène, le radical résultant est stabilisé par résonance



Les produits de cette réaction sont la forme réduite (RH) du radical néfaste, et le radical A• (forme oxydée de l'antioxydant) [90].

- **Transfert d'électrons singulier (SET)** Dans ce mécanisme, l'antioxydant AH est céder un électron au radical libre et se transforme en cation radicalaire pour réduire le radical

libre. L'anion R^- et le cation radical A^+ formé sont généralement des entités stables [91].



- **Chélation des métaux de transition**

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* [90].

I.5.2 Activité anti-glucosidase (antidiabétique)

I.5.2.1 Maladie du diabète

Le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou lorsque l'organisme n'est plus capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. Il en résulte une concentration accrue de glucose dans le sang (hyperglycémie). Au cours de son évolution, le diabète peut engendrer de nombreuses complications touchant le cœur, les reins ou les yeux [92,93]

I.5.2.2 Types du diabète

Le diabète sucré se divise en différents types dont trois principaux :

- Le diabète de type 1 (DT1) marqué par l'absence d'une hormone, appelée insuline, due à la disparition des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas qui la sécrètent. L'insuline est une hormone qui régule la glycémie, jouant un rôle essentiel dans le métabolisme du glucose en favorisant l'absorption du glucose dans le sang par les cellules adipeuses, le foie et les muscles.
- Le diabète de type 2 (DT2) représentant 90% des malades, s'identifie par la résistance à l'action d'insuline, des organes cibles comme les tissus adipeux, les muscles et le foie, et à des défauts de sécrétion d'insuline.
- Le diabète gestationnel qui, comme son nom l'indique apparaît chez la femme lors de la grossesse, est caractérisé par une intolérance au glucose due à la fabrication, lors de la grossesse, d'hormones placentaires [94].

I.5.2.3 Traitements du diabète de type 2

L'objectif principal dans la prise en charge du diabète est consisté à réguler la concentration de glucose de sang, pour le but de prévenir les complications diabétiques et les maladies chroniques. Les traitements du diabète sont de deux types, les non médicamenteux

(traitement hygiénodététiques) et les médicamenteux (antidiabétiques oraux (ADO) et insulinothérapie).

I.5.2.3.1 Traitements non médicamenteux

La pratique régulière de l'activité physique (adaptée et contrôlée) et la réduction pondérale 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 [95].

I.5.2.3.2 Traitements médicamenteux

En générale, comme traitement médicamenteux pour le DT2, un médicament hypoglycémiant pour contrôler la glycémie est suffi. Cependant, en fonction de l'avancement de cette maladie, un deuxième médicament avec un mécanisme d'action différent est souvent nécessaire. Ces traitements ne peuvent être utilisés que si la quantité de cellules bêta-pancréatiques est suffisante. Selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé, le GLUCOPHAGE® (metformine hydrochlorée) ayant à la fois un effet hypoglycémiant et diminuant la résistance des tissus cibles à l'insuline est utilisé en première intention pour traiter le DT2. D'autres traitements sont couramment utilisés en bi ou trithérapie comme le FORXIGA® (dapagliflozin), un inhibiteur de SGLT2 (sodium-glucose cotransporteur 2), un transporteur responsable de la réabsorption du glucose dans la circulation sanguine, des sulfamides comme le DIAMICRON® (gliclazide) qui stimulent la sécrétion d'insuline, ou encore des inhibiteurs de MGAM comme le GLUCOR® (acarbose) ou le DIASTABOL® (miglitol). Nous nous intéresserons par la suite aux inhibiteurs de la MGAM. Puis nous aborderons les inhibiteurs d' α -amylase, qui est une cible intéressante dans le traitement du DT2 [96,97].

- **Inhibiteurs De la MGAM**

La MGAM est une α -glucosidase (EC.3.2.1.20) (GH31), localisée au niveau de l'intestin. Les inhibiteurs de la MGAM, plus connus sous le nom d'inhibiteur de l' α -glucosidase (IAG), permettent de limiter l'hyperglycémie postprandiale (2h après le repas), ce qui est essentiel dans le contrôle de la maladie DT2. De plus, cette hyperglycémie est associée

à des complications cardiovasculaires [98,99]. Inhiber la MGAM, située au niveau de la surface externe des cellules épithéliales de l'intestin grêle, permet de diminuer le taux d'absorption du glycogène dans le sang en ralentissant ou interrompant la digestion de di/oligo/polysaccharides, notamment l'amidon, qui sont sources de glucose [100].

Actuellement, trois IAG sont disponibles sur le marché : le GLUCOR® (acarbose), le VOGLIB® (voglibose) et le DIASTABOL® (miglitol) [101].

- **Inhibiteurs d' α -amylase**

Contrairement à la MGAM qui catalyse essentiellement l'hydrolyse de disaccharides, les α -amylases salivaire et pancréatique (EC.3.2.1.1) hydrolysent des liaisons glycosidiques α -(1,4) des sucres plus complexes comme l'amidon [102]. L' α -amylase pancréatique qui agit au niveau du tractus gastro-intestinal et l' α -amylase salivaire, principale enzyme digestive buccale, sont sécrétées respectivement par le pancréas et les glandes salivaires. Toutes deux sont des cibles prometteuses pour contrôler l'hyperglycémie postprandiale [103]. En effet, inhiber ces α -amylases permet de limiter l'absorption de glucose au niveau de l'intestin.

De nombreux inhibiteurs des α -amylases sont répertoriés dans la littérature comme des flavonoïdes, des dérivés oxadiazoles, des dérivés pyrroles et pyrrolidines, des benzotriazoles, des arylimines et arylamines, des dérivés indoles, des benzofuranes, des dérivés de salacinol... [104].

I.5.3 Activité anticholinestérase (Anti-Alzheimer)

I.5.3.1 Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer ou la démence sénile du type Alzheimer (DSTA) c'est une maladie se caractérise par un trouble neurodégénératif progressif mais irréversible provoquée par la perte de neurones et de synapses dans le cortex cérébral et certaines régions sous-corticales [105]. C'est la forme la plus fréquente de démence chez l'être humain. La fréquence de la maladie d'Alzheimer augmente avec l'âge, on estime qu'environ 10% des personnes de plus de 65 ans et 50% de ceux de plus de 85 ans souffrent de la MA [106]. Le nombre de personnes atteintes de la MA pourrait atteindre les 81 millions en 2040, notamment à cause du vieillissement de la population sauf s'il y a nouveaux traitements sont développés pour réduire le risque [107].

I.5.3.2 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 [108].

I.5.3.3 Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Les cholinestérases (ChEs) sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse d'esters de choline (acétylcholine, butyrylcholine, succinylcholine) en acide carboxylique et en choline. 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'AChE est un élément clé des synapses cholinergiques du cerveau et des jonctions neuromusculaires. L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme présente dans le tissu neuronal qui permet la régulation de l'influx nerveux : en dégradant l'acétylcholine résiduelle issue d'une neurotransmission, elle libère la fente synaptique en vue d'une éventuelle nouvelle transmission, permettant ainsi le passage des informations. Selon l'hypothèse cholinergique, les troubles de la mémoire chez les patients atteints de DSTA résultent d'une déficience de la fonction cholinergique dans le cerveau. Plus précisément, de faibles quantités de l'ACh dans l'hippocampe et le cortex sont généralement considérés comme la cause de la MA [109], ce qui explique les troubles cognitifs observés.

Bien que le rôle exact de la BChE n'est pas encore complètement compris, il est rapporté d'être impliqués dans la morphogénèse, la cytogenèse 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 le métabolisme des lipoprotéines. En outre, les données biologiques appuient le rôle de la BChE dans la perturbation de la neurotransmission cholinergique observée dans la MA [109].

L'une des solutions pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste alors à diminuer sa dégradation, ceci en inhibant l'action de l'enzyme AChE (Figure I. 12).

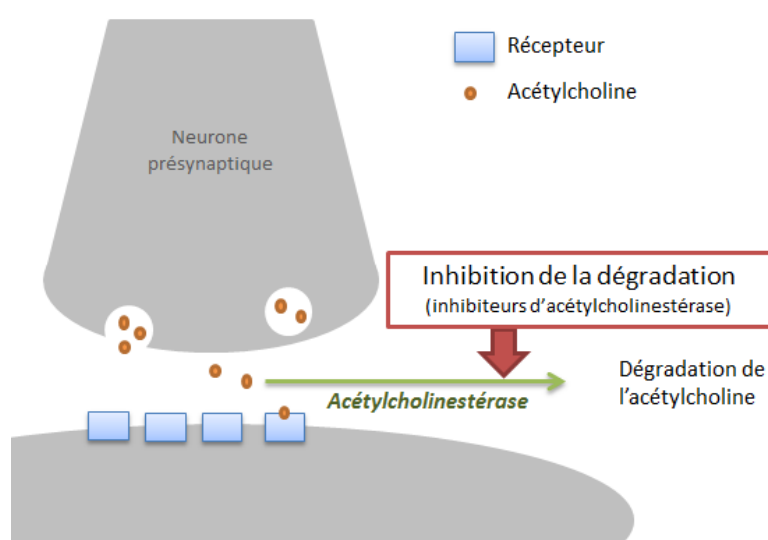


Figure I. 12 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase [110].

C'est sur la base de cette hypothèse que sont apparus sur le marché les inhibiteurs de l'AChE. Depuis, il a été mis en évidence que cette enzyme, en plus de son rôle dans la dégradation cholinergique, accélère la formation des plaques amyloïdes ; ceci renforce l'intérêt de découvrir de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase [110].

Références bibliographiques

- [1] L.D. Quin, A Guide to Organophosphorus Chemistry, John Wiley & Sons, Inc. New York. (a) Chapter 2, (b) Chapter 10, (c) Chapter 11, (2000).
- [2] K. Tsujii, T. Yakamoto, T. Onda, S. Shibuichi Angew. Super oil-repellent surfaces. *Angewandte Chemie International Edition* . 36 (1997) 1011-1012.
- [3] T. Largman, S. Sifniades. U.S Patent, 4402917. 198.
- [4] F. Matsumura, Degradation of pesticides in the environment by microorganisms and sunlight, *Biodegradation of Pesticides*, Plenum Press, New York. (1982) 67-87.
- [5] M. Christopher Timperley, *Best Synthetic Methods: Organophosphorus (v) chemistry*, Scriven: Pyridines: From Lab to Production. (2013).
- [6] J. Defrank, T.C. Cheng, Purification and properties of an organophosphorus acid anhydrase from a halophilic bacterial isolate, *bacteriology*. 173 (1991) 1938-1943.
- [7] J.C. Judd, D.D. Harbuck, Extraction de gallium par solvant à partir de solutions d'acide sulfurique à l'aide d'OPAP, *Separation Science and Technology*. 25 (1990) 1641-1653.
- [8] W.D. Arnold, D.R. McKamey, C.F. Baes. Effects of organic and aqueous phase composition on uranium extraction from phosphoric acid with octylphenyl acid phosphate, *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*. 21 (1982) 301-308.
- [9] J.M. Lehn, *La chimie supramoléculaire, concepts et perspectives*, De Boeck Université, Ed (1997).
- [10] R. Engel, *Synthesis of Carbon-Phosphorus Bonds*, CRC Press, Fla. (1987).
- [11] R. Engel, Phosphonates as analogues of natural phosphates, *Chemical Reviews*. 77 (1977) 349-367
- [12] D.F. Wiemer, Synthèse de phosphonates non racémiques, *Tetrahedron*. 53 (1997) 16609-16644
- [13] S.C. Fields, Synthesis of natural products containing a C-P bond, *Tetrahedron*. 55 (1999) 12237-12273
- [14] S. Freeman, H.M. Seidel, C.H. Schwalbe, J.R. Knowles, *Journal of The American Chemical Society*. 772 (1990) 8149-8155
- [15] E. Roberts, J.S. Kittredge, A Carbon-Phosphorus Bond in Nature: A spot on a chromatogram leads to a new field of phosphorus biochemistry, *Science*. 164 (1969) 37-42

- [16] J.P. Cioni, R.J. Doroghazi, K.S. Ju, X. Yu, B.S. Evans, J. Lee, W.W. Metcalf, Produit naturel de phosphonate de cyanohydrine issu de *Streptomyces regensis*, natural products. 77 (2014) 243–249.
- [17] P. Kafarski, B. Lejczak, Aminophosphonic Acids of Potential Medical Importance, CMCACA. 1 (2001) 301–312.
- [18] X.C. Huang, M.Wang, Y.M. Pan, X.Y. Tian, H.S.Wang, Y. Zhang, Synthesis and Antitumor Activities of Novel α -Aminophosphonates Dehydroabietic Acid Derivatives, Bioorganic & medicinal chemistry letters. 23 (2013) 5283–5289.
- [19] M.V.N. Reddy, B.S. Kumar, A. Balakrishna, C.S. Reddy, S.K. Nayak, C.D. Reddy, One-Pot Synthesis of Novel α -Amino Phosphonates Using Tetramethylguanidine as a Catalyst, Arkivoc.15 (2007) 46–254.
- [20] B. Stowasser, K.H. Budt, Jian-Qi, L. Peyman, D. Ruppert, New Hybrid Transition State Analog Inhibitors of HIV Protease with Peripheric C2-Symmetry, Tetrahedron Letters. 33 (1992) 6625–6628.
- [21] W. M. Abdou, A. A. Kamel, A. A. Shaddy, Use of phosphonyl carbanions in the synthesis of anti-inflammatory active phosphorus-containing fused heterocycles and relevance phosphonates, European journal of medicinal chemistry. 45 (2010) 5217-5224.
- [22] S. Kirkiacharian, Guide de chimie médicinale et médicaments, édition TEC & DOC, Paris, Lavoisier, (2010).
- [23] J. Emsley, D. Hall, The chemistry of phosphorus, Harper and Row, Wiley, New York, (1976).
- [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.
- [25] 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.
- [26] R.A. Cherkasov, V.I. Galkin, The Kabachnik-fields reaction: synthetic potential and the problem of the mechanism, *Russian Chemical Reviews*. 67 (1998) 857–882
- [27] (a) P. Kafarski, B. Lejczak, Aminophosphonic acids of potential medical importance, *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 1 (2001) 301–312; (b) P. Kafarski, B. Lejczak, Biological activity of aminophosphonic acids, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 63 (1991) 193–215; (c) R.L. Hilderbrand, *The Role of Phosphonates in Living Systems*, CRC Press, Boca Raton. (1983). First ed.
- [28] R. Engel, *Synthesis of Carbon-Phosphorus Bond*, CRC Press, Boca Raton.(1988) First ed.
- [29] M.M. Abdou, P.M. O'Neill, E. Amigues, M. Matziari, Phosphinic acids: current status and potential for drug discovery, *Drug Discovery Today* 24 (2019) 916–929.
- [30] A.M. Polozov, S.E. Cremer, Synthesis of 2H-1,2-oxaphosphorin, *Journal of Organometallic Chemistry* . 646 (2002) 153–160.
- [31] S. Zaout, S. Chafaa, A. Hellal, O. Boukhemis, L. Khattabi, H. Merazig, N. Chafai, C. Bensouici, L. Bendjeddou, Hydroxyphenylamine phosphonate derivatives: synthesis, X-ray crystallographic analysis, and evaluation of theirs anti-Alzheimer effects and antioxidant activities, *Journal of Molecular Structure*. 1225 (2021) 129–121.
- [32] J. Huang, R. Chen, An overview of recent advances on the synthesis and biological activity of α -aminophosphonic acid derivatives , *Heteroatom Chemistry*. 11 (2000) 480–492.
- [33] 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.
- [34] M. Mehri, N. Chafai, L. Oukse, 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.

- [35] A. Hellal, S. Chafaa, N. Chafai, L. Touafri, Synthesis, antibacterial screening and DFT studies of series of α -aminophosphonates derivatives from aminophenols, *Journal of Molecular Structure*. 1134 (2017) 217–225.
- [36] (a) L. Maier, *Organic phosphorus compounds* 91.1 synthesis and properties of 1-amino-2-arylethylphosphonic and-phosphinic acids as well as phosphine oxides, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. 53 (1990) 43–67 ; (b) L. Maier, P.J. Diel, *Organic phosphorus compounds* 941 preparation, physical and biological properties of amino-arylmethylphosphonic and phosphonous acids, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 57 (1991) 57–64.
- [37] 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 0.5 M H₂SO₄: experimental and theoretical studies, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 70 (2017) 331–344.
- [38] 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.
- [39] M.I. Kabachnik, T.Y. Medved, New synthesis of aminophosphonic acids, *Doklady .Akademii Nauk SSSR*. 83 (1952) 689–692.
- [40] E.K. Fields, The synthesis of esters of substituted amino phosphonic acids . *Journal of the American Chemical Society* 74 (1952) 1528–1531.
- [41] N.S. Zefirov, E.D. Matveeva, Catalytic Kabachnik-Fields reaction: new horizons for old reaction, *Arkivoc*. 2008 (2008) 1–17.
- [42] 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.
- [43] 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.

- [44] 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, *Organic Letters*. 1 (1999) 1141–1143.
- [45] E.D. Matveeva, T.A. Podrugina, E.V. Tishkovskaya, L.G. Tomilova, N.S. Zefirov, A Novel Catalytic Three-Component Synthesis (Kabachnick-Fields Reaction) of α -Aminophosphonates from Ketones, *Synlett*. 2003 (2003) 2321–2324.
- [46] B. Kaboudin, A. Rahmani, Silica-Supported Ammonium Hydrogen Carbonate as an Efficient Reagent for One-Pot Synthesis of 1-Aminophosphonates from Aldehydes, *Synthesis*. 2003 (2003) 2705–2708.
- [47] J. Marina, S. Laura, M. Zeljko, V. Marijana, T. Piotro, T. B. Ljerka, *Letters in Organic Chemistry* 6 (2009) 11.
- [48] A.N. Pudovik, Addition of dialkyl phosphites to imines. New method of synthesis of esters of amino phosphonic acids. *Doklady Akademii Nauk SSSR*. 83 (1952) 865-869.
- [49] a) K.M. Yager, C.M. Taylor, A.B. Asymmetric Synthesis of α -Aminophosphonates via Diastereoselective Addition of Lithium Diethyl Phosphite to Chelating Imines. *Journal of the American Chemical Society*. 116 (1994) 9377-9378 b) A. Keplacz, A. Zwierzak, An expeditious one-pot synthesis of diethyl N-Boc-1-aminoalkylphosphonates. *Tetrahedron letters* 43 (2002) 1079-1080.
- [50] S. Doye, Development of the Ti-catalyzed intermolecular hydroamination of alkynes, *Synlett*. 2004 (2004) 1653-1673.
- [51] I. Schlemminger, A. Willecke, W. Maison, R. Koch, A. Lützen, J. Martens, Diastereoselective Lewis acid mediated hydrophosphonylation of heterocyclic imines: a stereoselective approach towards α -amino phosphonates, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. 1 (2001) 2804-2816.
- [52] S. Laschat, H. Kunz, Carbohydrates as chiral templates: stereoselective synthesis of (R)- and (S)- α -aminophosphonic acid derivatives, *Synthesis*. 1992 (1992) 90-95.
- [53] V.S. Abramov, Reaction of dialkyl phosphites with aldehydes and ketones (a new method of synthesis of esters of hydroxyalkanephosphonic acids), *Doklady Akad. Nauk SSSR*, 73 (1950) 487-489.

- [54] Y.V. Rassukana, P. Onys'ko, G. Grechukha, A.D. Sinitsa, *European Journal of Organic Chemistry*. 21 (2003), 4181-1486.
- [55] B. Boduszek, Application of Bromotrimethylsilane and Trialkyl Phosphites for Convenient and Effective Synthesis of Aminophosphonic Acids and Corresponding Monoalkyl and Dialkyl Esters, *Polish Journal of Chemistry*. 75 (2001) 663–672; B. Boduszek, M. Soroka, Application of Silicon-Phosphorus Based Reagents in Synthesis of Aminophosphonates. Part 2: Reactions of N-(Triphenylmethyl)-aldimines with the Silylated Phosphorus Acid Esters, *Polish Journal of Chemistry*. 76 (2002) 1105–1111.
- [56] A. Atmani, J.C. Combret, C. Malhiac, J.K. Mulengi, b,g-Unsaturated α amino phosphonates: synthesis and reactivity, *Tetrahedron Letters*. 41 (2000) 6045–6048 ; K. Moonen, C.V. Stevens, One-Pot Synthesis of N-Chloroacetyl 1-Aminoalkyl Phosphonates - Precursors of 4-Phosphono- β -Lactams, *Synthesis*. 20 (2005) 3603–3612.
- [57] K.M. Yager, C.M. Taylor, A.B. Smith, Asymmetric Synthesis of α . Aminophosphonates via Diastereoselective Addition of Lithium Diethyl Phosphite to Chelating Imines, *Journal of the American Chemical Society*. 116 (1994) 9377–9378.
- [58] K. Moedritzer, R.R. Irani, The Direct Synthesis of α -Aminomethylphosphonic Acids. Mannich-Type Reactions with Orthophosphorous Acid, *The Journal of Organic Chemistry* . 31 (1966) 1603–1607.
- [59] 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) 3185–3189.
- [60] A. Michaelis, R. Kaehne, Ueber das Verhalten der Jodalkyle gegen die sogen. Phosphorigsäureester oder O-Phosphine, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 31 (1898) 1048–1055.
- [61] 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, *Organic Letters*. 13 (2011) 1270–1273.
- [62] P. Savignac, B. Iorga, *Modern phosphonate chemistry*, CRC press, (2003).

- [63] Boyd B., Ford C., Koepke M.C., GaryK., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B, « Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé, Glycoscience & Nutrition. 4 (2003) 7.
- [64] O.I. Aruoma, « Free radicals, antioxidants and international nutrition », Asia Pacific journal of clinical nutrition. 8 (1999) 53-63.
- [65] Favier A, Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, L'actualité chimique. 108 (2003) 108-115.
- [66] D.L. Gilbert, Fifty years of radical ideas, Annals of the New York Academy of Sciences. 899 (2000) 1-14.
- [67] G.G. Ortiz, F.P. Pacheco-Moisés, O.K. Bitzer-Quintero, A.C. Ramírez-Anguiano, L.J. Flores-Alvarado, V. Ramírez-Ramírez, M.A. Macias-Islas, E.D. Torres-Sánchez, Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach, Clinical and Developmental Immunology. (2013).
- [68] I.B. Afanas' ev, Signaling mechanisms of oxygen and nitrogen free radicals, CRC Press, (2009).
- [69] J. Karlsson, V.A. Alexandria, Introduction to nutraology and radical formation, Antioxidants and Exercise. 1 (1997).
- [70] D. Ziech, R. Franco, A.G. Georgakilas, S. Georgakila, V. Malamou-Mitsi, O. Schoneveld, A. Pappa, M.I. Panayiotidis, The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development, Chemico-Biological Interactions. 188 (2010) 334-339.
- [71] B.P. Yu, Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, Physiological Reviews. 74 (1994) 139-162.
- [72] G.M. Salido, J.A. Rosado, Apoptosis: Involvement of oxidative stress and intracellular Ca²⁺ homeostasis, Spain: Dept of Physiology. University of Extremadure. (2009) 229-35.

- [73] R.J. Bloomer, K.H. Fisher-Wellman, Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake, *Gender Medicine*. 5 (2008) 218–228.
- [74] K. Venkataraman, S. Khurana, T.C. Tai, Oxidative stress in aging-matters of the heart and mind, *International Journal of Molecular Sciences*. 14 (2013) 17897–17925.
- [75] 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.
- [76] B. Halliwell, C.E. Cross, Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress, *Environmental Health Perspectives*. 102 (1994) 5–12.
- [77] B. Oyinloye, A. Adenowo, A. Kappo, Reactive Oxygen Species, Apoptosis, Anti-microbial Peptides and Human Inflammatory Diseases, *Pharmaceuticals*. 8 (2015) 151-175.
- [78] B. Halliwell, Free radicals and metal ions in health and disease, *Proceedings of the Nutrition Society*. 46 (1987) 13–26.
- [79] K.W. Jeon, *International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology*, Elsevier, (2004).
- [80] M. Martínez-Cayuela, Oxygen free radicals and human disease, *Journal of Biochemistry*. 77 (1995) 147–161.
- [81] 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.
- [82] S. Vertuani, A. Angusti, S. Manfredini, The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network : An Overview, *Current Pharmaceutical Design CPD*. 10 (2004) 1677–1694.
- [83] 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.
- [84] J. Flieger, W. Flieger, J. Baj, R. Maciejewski, Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles, *Journal of Materials*. 14 (2021) 4135.

- [85] E. Atta, N. Mohamed, A. Abdelgawad, Antioxidants: An Overview on the Natural and Synthetic Types, *European Chemical Bulletin*. 6 (2017) 365-375.
- [86] 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.
- [87] I. Mironczuk-Chodakowska, A.M. Witkowska, M.E. Zujko, Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body, *Advances in Medical Sciences*. 63 (2018) 68–78.
- [88] 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.
- [89] D. Thomas, Les antioxydants de nos jours : définition et applications, Université de Limoges Faculté de Pharmacie. (2016).
- [90] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, *Food Chemistry*. 125 (2011) 288–306.
- [91] J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio, Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *Journal of the American Chemical Society*. 123 (2001) 1173–1183.
- [92] D. Raccach, Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré, *EMC - Endocrinologie*. 1 (2004) 29–42.
- [93] P. BALAGANI, Dr.S. Karimulla, Antidiabetic and Antihyperlipidemic activity of bark of *Bruguiera gymnorhiza* on streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Journal Pharmaceutical Science and Technology*, 1 (2021) 4-7. .
- [94] 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.
- [95] N. Chevalier, P. Fénichel, Obésité, diabète de type 2 et perturbateurs endocriniens, *La Presse Médicale*. 45 (2016) 88–97.

- [96] 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.
- [97] 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.
- [98] K.T. Kim, L.E. Rioux, S.L. Turgeon, Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*, *Phytochemistry*. 98 (2014) 27–33
- [99] H. Sugihara, M. Nagao, T. Harada, Y. Nakajima, K. Tanimura-Inagaki, F. Okajima & S. Oikawa, Comparison of three α -glucosidase inhibitors for glycemic control and bodyweight reduction in Japanese patients with obese type 2 diabetes, *Journal of Diabetes Investigation*. 5 (2014) 206–212.
- [100] J. Leroux-Stewart, R. Rabasa-Lhoret, J.L. Chiasson, α -Glucosidase inhibitors, *International Textbook of Diabetes Mellitus*. (2015) 673–685
- [101] Morikawa, T. J. Akaki, K. Ninomiya, E. Kinouchi, G. Tanabe, Y. Pongpiriyadacha , ... & O. Muraoka, Salacinol and related analogs: new leads for type 2 diabetes therapeutic candidates from the thai traditional natural medicine *Salacia chinensis*. *Nutrients*. 7 (2015) 1480–1493.
- [102] J. Boisselier, Mise en oeuvre d'un système de confinement et de délivrance moléculaire pour la production in situ de glucose au sein d'un hydrogel conçu pour l'ingénierie tissulaire, Thèse de doctorat, Cergy-Pontoise. (2016) .
- [103] S. Imran, M. Taha, M. Selvaraj, N.H. Ismail, S. Chigurupati & J.I. Mohammad, Synthesis and biological evaluation of indole derivatives as α amylase inhibitor, *Bioorganic Chemistry*. 73 (2017) 121–127
- [104] N. Kaur, V. Kumar, S.K. Nayak, P. Wadhwa, P. Kaur, & S.K. Sahu, S. K. Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus: A comprehensive review, *Chemical Biology and Drug Design*. 98 (2021) 539–560

- [105] A. Alzheimer, Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters, Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie. 4 (1911) 356-385.
- [106] Z. Ul-Haq, W. Khan, S. Kalsoom, F.L. Ansari, In silico modeling of the specific inhibitory potential of thiophene-2, 3-dihydro-1, 5-benzothiazepine against BChE in the formation of β -amyloid plaques associated with Alzheimer's disease, Theoretical Biology and Medical Modelling. 7 (2010) 1-26.
- [107] C.P. Ferri, M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K.Hall, M. Scazufca, Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study, The lancet. 366 (2005) 2112-2117.
- [108] 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.
- [109] E.K. Perry, P.H. Gibson, G. Blessed, R.H. Perry, B.E. Tomlinson, Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia : Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue, Journal of the neurological sciences. 34 (1977) 247-265.
- [110] G.T Grossberg, Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on, Current Therapeutic Research. 64 (2003) 216-235.

CHAPITRE II

Analyses et méthodes expérimentales.

II.1 Introduction

Ce chapitre est consacré aux différentes méthodes d'analyse physico-chimiques utilisées pour caractériser les produits synthétisés et les réactifs ainsi que les protocoles expérimentaux appliqués pour évaluer in vitro les activités biologiques de ces produits.

II.2 Méthodes analytiques et appareils

II.2.1 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.2.2 Point de fusion

Le point de fusion est l'une des propriétés caractéristiques de la matière qui fournit des informations essentielles sur la composition et la pureté des matériaux [1]. La mesure du point de fusion des produits obtenus ainsi que les produits de départ s'est faite à l'aide d'un Fusiomètre BÜCHI Melting point B-540.

II.2.3 Spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-Vis)

La spectrophotométrie d'absorption ultra-violette visible est à la fois une méthode d'analyse quantitative et qualitative. Elle repose essentiellement sur le phénomène d'absorption d'énergie lumineuse par une substance.

Les spectres UV-vis ont été enregistrés dans la région 400-1200 nm avec un appareil JASCO V-650. Les cellules sont en deux, avec un trajet optique de 1 cm.

II.2.4 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

La spectroscopie infrarouge (IR) est une technique analytique permettant de déterminer la présence ou l'absence des groupes fonctionnels. Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés dans la région 4000-500 cm^{-1} avec un spectromètre du type JASCO FT/IR-4200 en mode réflexion totale atténuée (ATR). Les transmissions reportées sont exprimées en nombre d'ondes (cm^{-1}).

II.2.5 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique permettant d'identifier la structure des composés organiques et de certains types de matériaux inorganiques.

Les spectres (RMN) du proton ^1H , du carbone ^{13}C et du phosphore ^{31}P ont été enregistrés sur un appareil Bruker Avance 500 MHz à la température ambiante, en utilisant comme solvant le diméthylsulfoxyde-déutérié (DMSO- d_6) et le tétraméthylsilane (TMS) comme référence. 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 Spectroscopie de masse (SM)

La spectrométrie de masse (SM) donne une information structurale sur la molécule à analyser et elle permet aussi de connaître la masse moléculaire d'une molécule à partir du pic moléculaire. Les spectres de masse ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Apex-IV Bruker en utilisant une analyse d'ionisation par électrospray (ESI). Les pics de masse sont exprimés en unité de masse par charge élémentaire m/z .

II.3 Méthodes d'évaluation des activités biologiques

II.3.1 Activité antioxydante

A l'origine, le terme antioxydant était utilisé pour désigner spécifiquement une substance qui empêche ou ralentit le phénomène d'oxydation qui est l'un des plus importants processus de production des radicaux libres dans les aliments et les systèmes vivants, ces radicaux libres sont responsables des dommages cellulaires, notamment sur l'ADN, et peuvent favoriser des maladies [2].

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des aliments et des systèmes biologiques. Ces méthodes peuvent être divisées en deux catégories selon leur mécanisme : soit par le transfert d'atome d'hydrogène (Hydrogen Atom Transfert) HAT [3,4], soit par le transfert d'un simple électron « Single Electron Transfert (SET) » [5]. Le plus souvent pour avoir une indication plus ou moins précise sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester, il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires.

Dans ce travail pour évaluer l'activité antioxydante des molécules synthétisées on a choisi six méthodes : DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, phenanthroline et Inhibition du blanchiment du β -carotène. Le choix de ces méthodes est basé sur leurs fiabilités et leurs rapidités ainsi la disponibilité des réactifs et des équipements du laboratoire.

II.3.1.1 Matériels et réactifs

II.3.1.1.1 Instrument utilisé

Tous les tests ont été réalisés en *triplicata*, dans des microplaques à 96 puits de volume 250 µl pour chaque puits, à l'aide d'un lecteur de microplaques (EnSpire Multimode Plate Reader perkin, USA).

II.3.1.1.2 Réactifs et Solvants

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, nous avons utilisé les réactifs, regroupés dans le tableau II.1. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme antioxydants standard pour la comparaison de l'activité et le méthanol a été utilisé comme contrôle négatif.

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

<i>Test</i>	<i>Réactifs</i>	<i>Formule brute</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
β-carotene	β-carotène	C ₄₀ H ₅₆	536.87
	linoleicacid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	820.44
	Monopalmitate de polyoxyéthylènesorbitane (Tween 40)	C ₆₂ H ₁₂₂ O ₂₆	1283.63
CUPRAC	Acetate d'ammonium	C ₂ H ₇ NO ₂	77.08

	chlorure de cuivre(II)	$\text{Cu Cl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	170.48
	Neocupronin	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2$	208.26
FRAP	Acide trichloroacétique(TCA)	$\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$	163.39
	Ferricyanure de potassium	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	329.24
	Chlorure de fer	FeCl_3	162.2
	Hydrogénophosphate de sodium	Na_2HPO_4	141,96
	Hydrogénophosphatedisodique	Na_2HPO_4	141.96
Phenanthroline	Benzo[b][1,10]phenanthroline-7-ol (Phenanthroline)	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$	246.26
	Chlorure de fer	FeCl_3	162.2
Standards	Hydroxytoluène butylé (BHT)	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	220.35
	Butylatedhydroxyanisole(BHA)	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$	254.46

II.3.1.2 Activité de piégeage du radical DPPH

Le test DPPH est l'une des méthodes les plus courantes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante, car il est simple, rapide et non coûteux.

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical stable de couleur violette en solution. Lorsqu'il est réduit en présence d'une substance réductrice (par un mécanisme combinant le transfert d'un atome d'hydrogène et le transfert d'électrons), la couleur de la solution devient jaune. Plus la substance est antioxydante plus la coloration violette initiale va disparaître. On apprécie ce changement de couleur grâce à un enregistrement à la longueur 517 nm (à l'aide d'un spectrophotomètre (Figure II. 1) [6,7].

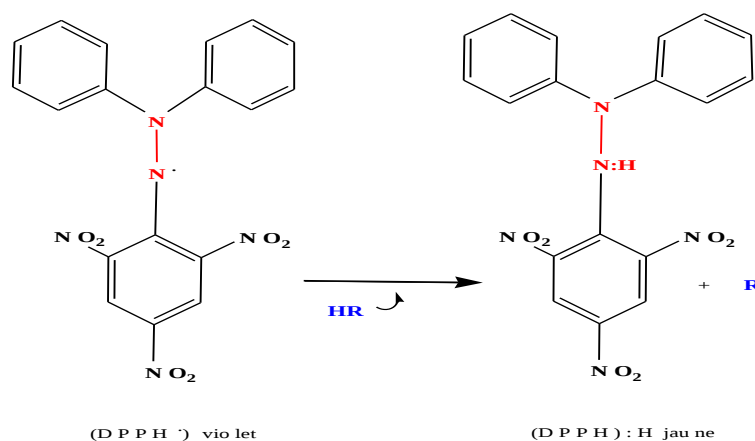


Figure II. 1 : Réduction du radical DPPH $\cdot$ par R-H, où (RH) est un composé capable de céder un H au radical DPPH

L'activité de piégeage des radicaux libres des molécules synthétisées et des standards (BHA et BHT) a été réalisée par le test DPPH selon la méthode de *Blois et al* avec de légères modifications [8]. 160 μ L de solution de DPPH dans le méthanol (10^{-4} M) ont été ajoutés à 40 μ L de solutions d'échantillons dans le méthanol à différentes concentrations. Ensuite, le mélange réactionnel a été incubé pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité. Le pourcentage d'effet de piégeage de DPPH a été calculé à l'aide de 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 sauf 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 (μ g/mL) est calculée et comparée à celle du BHT et BHA.

II.3.1.3 Activité de piégeage du radicale ABTS

Le test ABTS est basé sur la mesure de la capacité d'un antioxydant à réduire le radical ABTS $^{\cdot+}$ « 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ». Ce radical cationique est formé facilement par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) pour donner une solution colorée en vert-bleue [9].

L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical cationique entraîne la réduction de ce radical et une diminution de l'absorbance. Cette réduction s'accompagne par le passage de la solution d'une couleur vert-bleue à une solution non colorée, l'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 734 nm. Une faible absorbance indique une meilleure activité anti radicalaire [10].

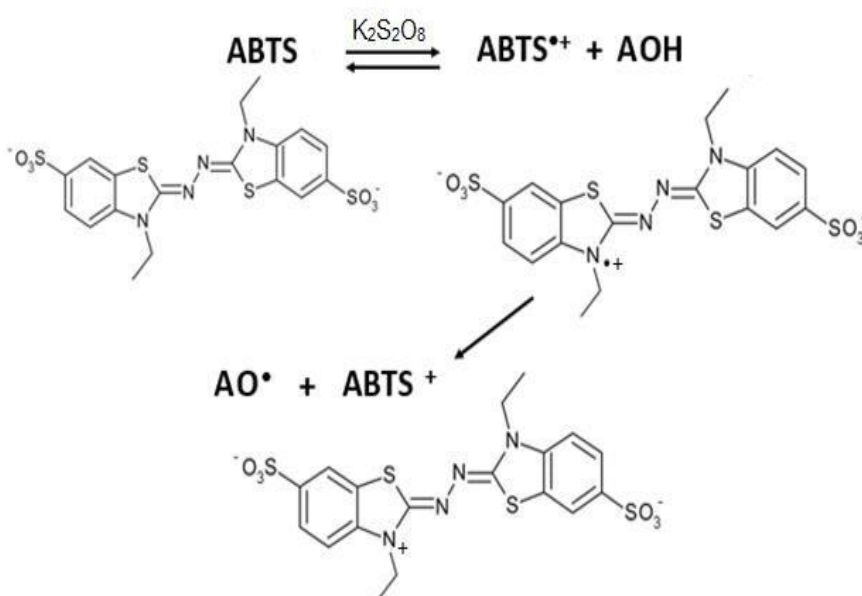


Figure II. 2 : Formation de l'ABTS•⁺ par échange d'électron en présence du persulfate de potassium et réduction du radical formé par la molécule antioxydante en donnant un H•

L'activité de piégeage des ABTS•⁺ de nos molécules a été testée selon la méthode de *Re et al* [9]. L'ABTS•⁺ a été produit en mélangeant 7 mM d'une solution aqueuse d'ABTS avec 2,45 mM de persulfate de potassium, le tout a ensuite été stocké dans l'obscurité à température ambiante pendant 16 h avant l'utilisation. La solution d'ABTS•⁺ a été diluée pour obtenir une absorbance de $0,703 \pm 0,025$ à 734 nm avec de l'éthanol ou de l'eau. Ensuite, 160 µL de la solution d'ABTS•⁺ ont été ajoutés à 40 µL de solution d'échantillon ou de solution standard préparée dans le méthanol à différentes concentrations. Après une incubation de 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm. La capacité de piégeage de l'ABTS•⁺ a été calculée en appliquant la formule similaire à celle du DPPH.

II.3.1.4 Activité inhibitrice de peroxydation des lipides (le blanchiment de Beta-carotène)

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité d'un antioxydant à inhiber la dégradation oxydative du β -carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique. L'oxydation de ce dernier génère des radicaux libres (hydroperoxydes). Ces radicaux libres oxyde le β -carotène et entraîne la disparition de sa couleur jaune ; On suit cette perte de couleur (Le blanchissement du β -carotène) à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur 470 nm. [11,12].

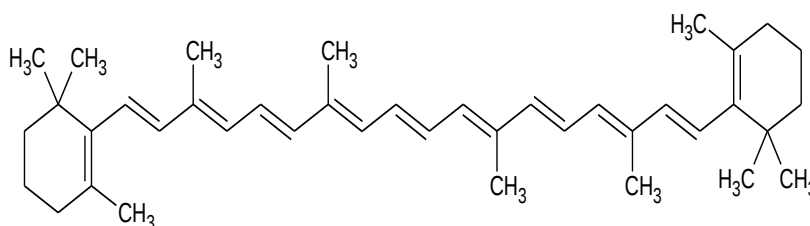


Figure II. 3 : Structure de la molécule du β -carotène

L'activité de blanchiment du β -carotène a été évaluée selon le protocole décrit par Marco *et al* [13]. 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 dans le vide, 50 mL d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés sous agitation vigoureuse. L'absorbance de la solution a ensuite été ajustée entre 0,8-0,9 nm. 160 μ L de cette solution ont été ajoutés à 40 μ L d'échantillon et d'étalons à différentes concentrations. Le système d'émulsion a ensuite été incubé pendant 2 h à 50 °C. L'absorbance a été lue et enregistrée à 470 nm avant et après l'incubation de deux heures ($t = 0$ min et $t = 120$ min). Le pourcentage d'inhibition des produits testés a été déterminé à l'aide de la formule suivante

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

II.3.1.5 Activité réductrice de l'ion cuprique(CUPRAC)

Le test CUPRAC (cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basé sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproéne (NC), cuivre (Cu^{+2})NC₂- Cu^{+2} . 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 Figure II. 4 [14].

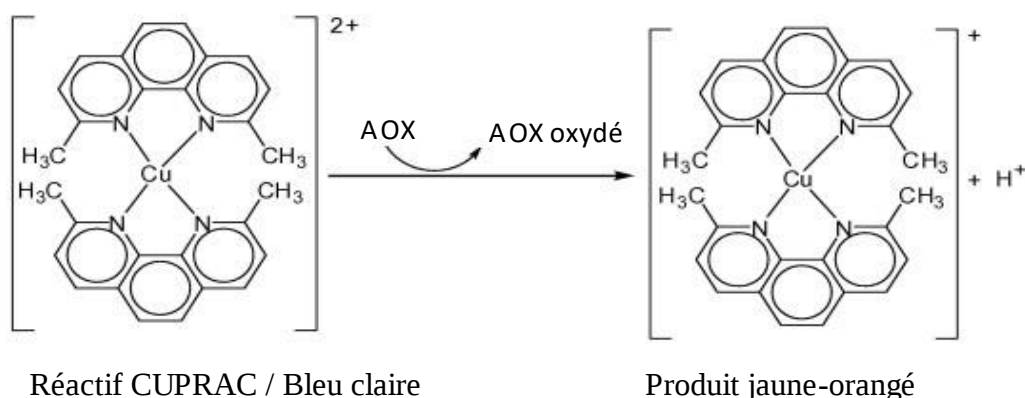


Figure II. 4 : Réaction de CUPRAC par une molécule antioxydante

L'activité antioxydante par réduction cuprique a été évaluée selon la méthode d'*Apak et al* [14]. Brièvement, 40 μL de produits synthétisés à différentes concentrations ont été ajoutés à 60 μL de solution tampon d'acétate d'ammonium (1 M, pH 7,0), 50 μL de solution de chlorure de cuivre (II) (0,01M préparée à partir de $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) et 50 μL de solution de néocuproïne ($7,5 \times 10^{-3}$ M). Le mélange a été incubé pendant 60 min à température ambiante. L'absorbance de la solution a été mesurée à 450 nm. Les résultats ont été calculés comme $A_{0,5}$ ($\mu\text{g/mL}$) correspondant à la concentration indiquant 0,50 de l'absorbance.

II.3.1.6 Activité réductrice de l'ion ferrique (FRAP)

La méthode FRAP c'est une méthode colorimétrique fondée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{+3}) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en ion ferreux (Fe^{+2}) en présence d'un composé antioxydant donneur d'électrons, Ceci se traduit par le changement de la couleur jaune du ferricyanure de potassium à une couleur bleue/verte (Figure II. 5), l'intensité de cette coloration est suivie par un spectrophotomètre à 700 nm. [15].

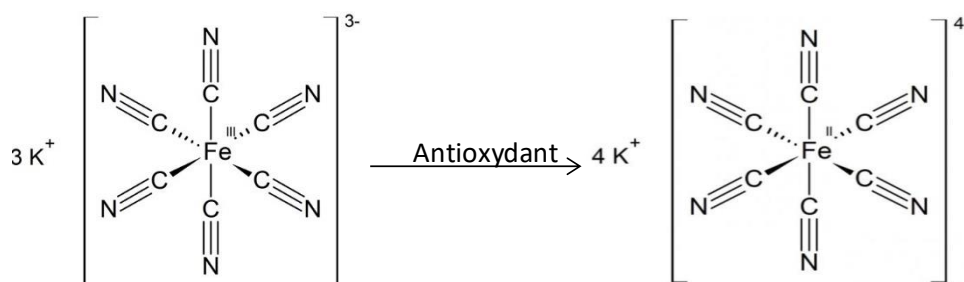


Figure II. 5 : Réaction de test FRAP (FerricReducing-Antioxydant Power)

L'activité du pouvoir antioxydant réducteur a été évaluée selon la méthode d'Oyaizu *et al* [16]. Un mélange réactionnel contenant 10 μL de solutions d'échantillons et d'étalons à différentes concentrations, 40 μL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 50 μL d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 %) a été incubé à 50 $^{\circ}\text{C}$ pendant 20 min, puis 50 μL d'acide trichloracétique CCl_3COOH (10 %) a été ajoutés. Les solutions obtenues ont été mélangées avec de l'eau distillée (40 μL) et 10 μL de chlorure ferrique FeCl_3 (0,1 %). L'absorbance a été mesurée à 700 nm. Les résultats ont été exprimés en $A_{0,5}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en fonction de la concentration, indiquant une intensité d'absorbance de 50 %

II.3.1.7 Activité de la Phénanthroline

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 $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$ [17].

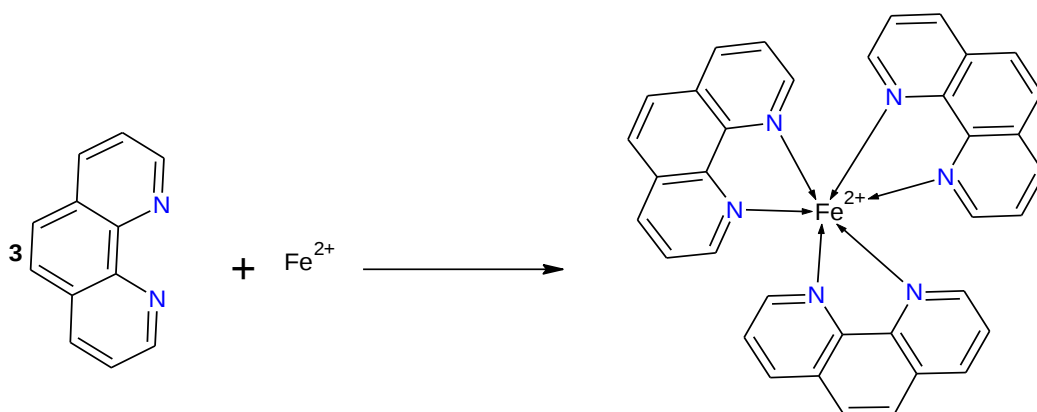


Figure II. 6 : Réaction de la 1,10 phénanthroline avec le Fe^{3+} après son oxydation en Fe^{2+} par un antioxydant

Pour évaluer le test antioxydant à l'O-phénanthroline, nous avons utilisé le protocole décrit par Szydłowska-Czerniaka *et al* [17]. Un volume de 10 μL d'échantillons et de solutions étalons à différentes concentrations (3,125-200 $\mu\text{g/mL}$) a été ajouté à 50 μL de FeCl_3 (0,2 %). Ensuite, 30 μL de phénanthroline (0,5%) et 110 μL de méthanol ont été ajoutés au mélange. La solution obtenue a été incubée pendant 20 min à 30 $^{\circ}\text{C}$, et l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Les résultats ont été exprimés en valeurs $A_{0,50}$ ($\mu\text{g/mL}$). 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.

II.3.2 Activité anti-enzymatiques

II.3.2.1 Matériels et réactifs

II.3.2.1.1 Instrument utilisé

Tous les tests ont été réalisés en *triplicata*, dans des microplaques à 96 puits de volume 250 µl pour chaque puits, à l'aide d'un lecteur de microplaques (EnSpire Multimode Plate Reader perkin, USA).

II.3.2.1.2 Réactifs utilisés

Pour l'évaluation de l'activité anti-enzymatique, nous avons utilisé les réactifs, regroupés dans le tableau II.2. La galantamine et l'acarbose ont été utilisés comme des standards pour la comparaison de l'activité et le méthanol a été utilisé comme contrôle négatif.

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

Activité	Réactifs	Formule brute	M (g/mol)
Antidiabétique	p-nitrophényl- α - d – glucopyranoside	C ₁₂ H ₁₅ NO ₈	301.25
	Acarbose	C ₂₅ H ₄₃ NO ₁₈	645,60
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
Tampon de phosphate	Sodium phosphate dibasicdihydrate	Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	177.99
	Sodium phosphate monobasicdihydrate	NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	156.01

II.3.2.2 Activité inhibitrice de l' α -glucosidase (antidiabétique)

Le diabète est une pathologie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique avec des perturbations du métabolisme glucidique, lipidique et protidique. L'une des approches thérapeutiques efficace pour gérer le diabète consiste à diminuer l'hyperglycémie postprandiale. Ce processus est réalisé généralement en retardant l'absorption du glucose par l'inhibition des enzymes qui hydrolysent les carbohydrates dans l'intestin, à savoir l' α -amylase et l' α -glucosidase [18]. Celles-ci sont des cibles importantes pour découvrir de nouveaux agents pour le traitement du diabète type II [19].

Le test de détermination du pouvoir inhibiteur de l'enzyme α -glucosidase est basé sur la mesure de la libération de *p*-nitrophénol (*p*-NP) dont l'enzyme catalyse la dégradation du *p*-nitrophényl- α -D glucopyranoside (*p*-NPG) en α -D-glucopyranoside et en *p*-nitrophénol (*p*-NP). Ce dernier absorbe à 405 nm, qui permet d'évaluer l'activité enzymatique de l' α -glucosidase [20]. En présence d'inhibiteur, l'activité enzymatique de l' α -glucosidase diminue ou est inhibée. Cela est exprimé par diminution de la dégradation du substrat *p*-NPG [21].

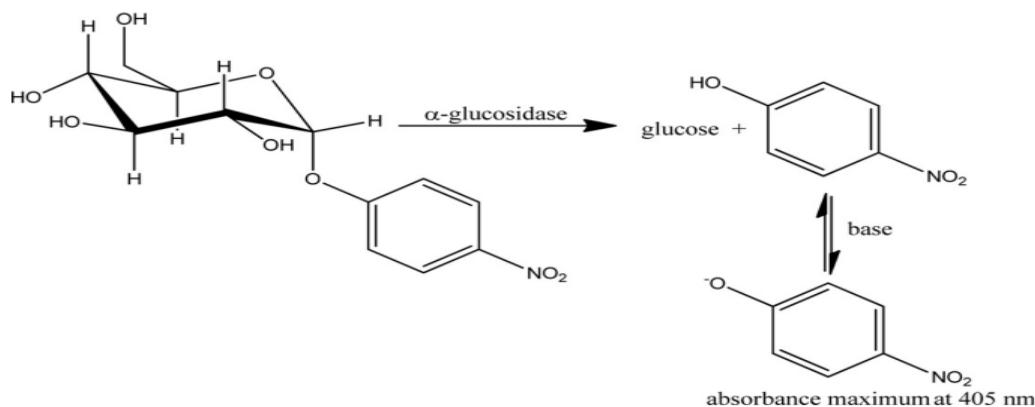


Figure II. 7 : la dégradation du *p*-nitrophényl- α -D glucopyranoside (*p*-NPG) en α -D-glucopyranoside et en *p*-nitrophénol (*p*-NP) par l'enzyme α -glucosidase.

L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase a été réalisée selon une méthode adaptée par *Lordan et al* [22] avec quelques modifications. Un volume de 50 μL de diverses concentrations d'échantillons et de solutions standard et 50 μL d'une solution de *p*-nitrophényl- α - d -glucopyranoside 5 mM préparée dans un tampon phosphate (pH = 6,9) ont été incubés à 37 °C pendant 10 min. Ensuite, 100 μL de solution d' α -glucosidase (0,1 U/mL) préparée dans un tampon phosphate (pH = 6,9) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé pendant 30 minutes à 37 °C. L'absorbance a été mesurée à 405 nm (0 min et 30 min) à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits. L'acarbose a été utilisé dans cette expérience comme

un contrôle positif, alors que le milieu réactionnel dépourvu d'inhibiteur représente le contrôle négatif.

L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase a été calculée à l'aide de la formule II.3 et les résultats ont été donnés sous forme de valeurs IC 50 ($\mu\text{g/mL}$) correspondant à la concentration montre 50 % d'inhibition.

$$I \% = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}} \right) \times 100 \quad [\text{II.3}]$$

Où : I% : le pourcentage d'inhibition, Abs : absorbance.

$\text{Abs}_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance du contrôle négatif et $\text{Abs}_{\text{échantillon}}$, est l'absorbance de l'échantillon.

II.3.2.3 Activité anticholinestérase (anti-Alzheimer)

Les activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) ont été évaluées selon la méthode d'*Ellman et al* [23] avec de légères modifications. Cette méthode est basée sur l'hydrolyse de l'acétylthiocholine (ATC) et le butyrylthiocholine (BTC) par l'AChE ou BChE respectivement. L'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure de butyrylthiocholine ont été utilisés comme substrats de la réaction avec le DTNB (5,5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) pour la mesure de l'activité cholinestérasique. L'hydrolyse du substrat a été surveillée spectrophotométriquement par la formation d'anion jaune de 5-thio-2-nitrobenzoate résultant de la réaction de DTNB avec la thiocholine, libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine et du chlorure de butyrylthiocholine, à une longueur d'onde de 412 nm.

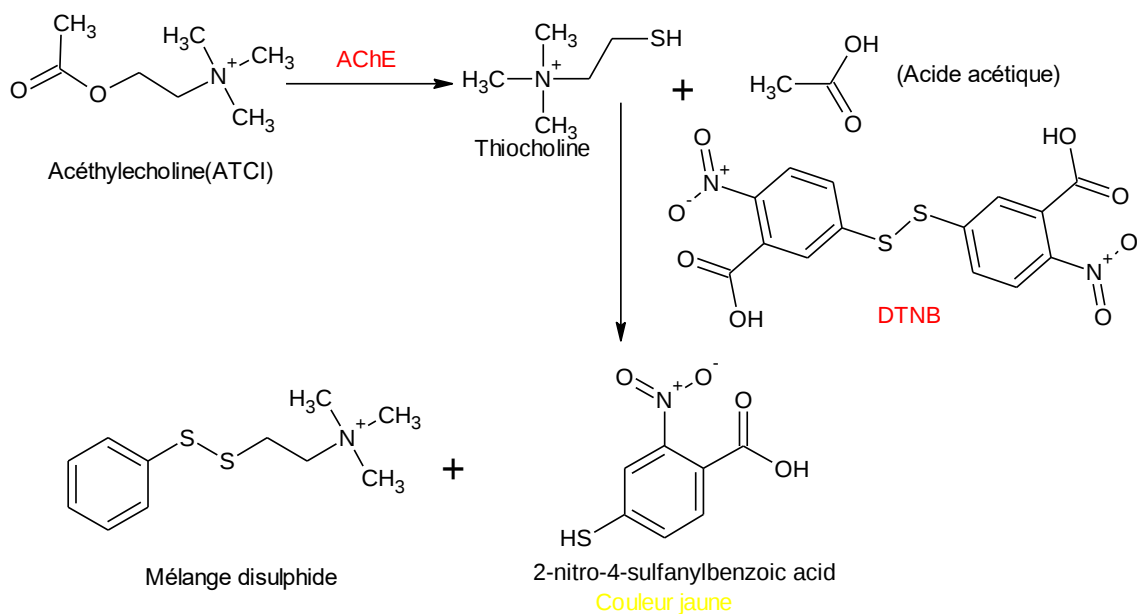


Figure II. 8 : Mécanisme d'action de la méthode d'Ellman

Brièvement, 150 μL de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH = 8,0), 10 μL des échantillons ou des solutions étalons dissoutes dans le méthanol à différentes concentrations (3,125-50 $\mu\text{g/mL}$) et 20 μL de solution d'AChE ou de BChE dans le tampon ont été mélangés et incubés pendant 15 min à 25 $^{\circ}\text{C}$, 10 μL de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés. Ensuite, la réaction a été initiée par l'ajout de 10 μL d'iodure d'acétylthiocholine (0,5 mM) ou de 10 μL de chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM). L'absorbance de la solution a été mesurée à 412 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits. La galantamine a été utilisée comme composé de référence.

Le pourcentage d'inhibition I (%) a été déterminé à l'aide de la formule II.4 et les résultats ont été donnés sous forme de valeurs IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) correspondant à la concentration d'inhibition de 50 %.

$$I \% = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100 \quad [\text{II.4}]$$

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.3.3 Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ écart type (SD) de trois mesures parallèles. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel GraphPad prism (logiciel, San Diego, CA, USA). Les valeurs d' IC_{50} et $A_{0.50}$ ont été comparées par une analyse

ANOVA unidirectionnelle, suivie d'un test post hoc de Tuckey. Pour la détermination des taux de signification ($n=3$), Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque la valeur de P était inférieure à 0,05 ($p \leq 0,05$).

Références bibliographiques:

- [1] L. Gattermann, H.E.I Nrichwieland, W. McCartney, Laboratory methods of organic chemistry, University of Edinbur, New York, the macmillan company, (1937).
- [2] M. Bubonja-Sonje, J. Giacometti, M. Abram, Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols, Journal of Food Chemistry. 127 (2011) 1821-1827.
- [3] D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, Journal of agricultural and food chemistry. 53 (2005) 1841–1856.
- [4] R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, Journal of agricultural and food chemistry. 53 (2005) 4290–4302.
- [5] F. Shahidi, Y. Zhong, Measurement of antioxidant activity, Journal of functional foods. 18 (2015) 757–781.
- [6] 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, journal of Phytochemical Analysis. 13 (2002) 8–17.
- [7] U.M. Acuña, D.E. Atha, J. Ma, M.H. Nee, E.J. Kennelly, Antioxidant capacities of ten edible North American plants , journal of Phytotherapy Research. 16 (2002) 63–65.
- [8] M.S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature. 181 (1958) 1199–1200.
- [9] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, journal of Free Radical Biology and Medicine. 26 (1999) 1231–1237.
- [10] M.B. Arnao, Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case, Journal of Trends in Food Science and Technology. 11 (2000) 419–421.
- [11] E. Portes, Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes: Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d’Origine Naturelle. Thèse de doctorat en chimie organique, Université de Bordeaux. (2008).

- [12] J.E. Swanson, R.S. Pararker, Biological effect of carotenoids in humans. In Cadenas E, Packer L (eds). Handbook of Antioxidants. New York : Marcel Dekker, inc, (1996).
- [13] G.J. Marco, A rapid method for evaluation of antioxidants, Journal of the American Oil Chemists' Society. 45 (1968) 594–598.
- [14] 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, Journal of agricultural and food chemistry. 52 (2004) 7970–7981.
- [15] 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
- [16] 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.
- [17] A. Szydlowskaczerniak, C. Dianoczki, K. Recseg, G. Karlovits, E. Szlyk, Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric ion spectrophotometric methods, Journal of Talanta. 76 (2008) 899–905.
- [18] J.Wu, S.Shi, H.Wang, S.Wang, Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes, A review, Journal of Carbohydrate Polymers. 144 (2016) 474–494.
- [19] M A A .Maiga, Etude de la chimie et des activités biologiques de six (6) plantes utilisées dans le traitement traditionnel du diabète : *Allium cepa* ; *Allium sativum*; *Daucus carota*; *Eucalyptus globulus*; *Psidium guajava* et *Solanum melongena*, Thèse de doctorat, Université de Mali. (2014).
- [20] M.A.HADJ, Contribution à l'étude in vitro de l'effet des extraits de feuilles de *Retama raetam* sur l'activité de l' α -amylase, Thèse de doctorat, université de Tlemcen, Algérie. (2012).
- [21] M. Mosihuzzman, S.Naheed, S.Hareem, S.Talib , G.Abbas et M .Israr, Studies on α -glucosidase inhibition and anti-glycation potential of *Iris loczyi* and *Iris unguicularis*, Journal of Life Sciences. 92 (2013) 187–192.

- [22] S. Lordan, T.J. Smyth, A. Soler-Vila, C. Stanton, R.P. Ross, The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts, *Journal of Food Chemistry*.141 (2013) 2170–2176.
- [23] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Journal of Biochemical Pharmacology*. 7 (1961) 88–95.

CHAPITRE III

Synthèse et caractérisation.

III.1 Introduction

Après une brève description des différents dérivés phosphoniques et phosphiniques, de leurs propriétés biologiques et de leurs diverses voies de synthèse décrites dans la littérature, notre but sera le développement et la synthèse des nouveaux dérivés d' α -aminophosphonates et d' α -aminophosphinates et l'évaluation de leurs activités biologiques.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse et la caractérisation des deux nouvelles molécules appartenant à la famille des acides α -aminophosphoniques et des acides α -aminophosphiniques via la réaction de Kabachnik–Fields à multicomposant, ou communément appelée "one pot",

Dans ce chapitre nous décrivons le procédé appliqué pour la synthèse des molécules ciblées, ensuite nous discutons les 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, RMN¹H, ¹³C et ³¹P, ainsi que la spectroscopie de masse.

III.2 Synthèse des molécules ciblées

III.2.1 Réactifs et solvants utilisés

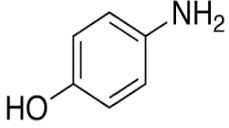
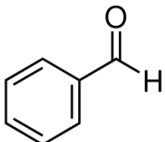
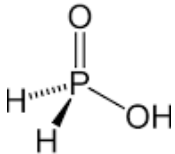
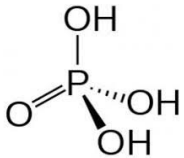
Tous les produits chimiques employés dans ce travail sont des produits commercialisés de type, *Sigma-Aldrich* ou *Fluka*, ils sont utilisés sans purification préalable.

Les caractères physicochimiques principaux des solvants et des réactifs utilisés sont regroupés dans le tableau III. 1 et III. 2.

Tableau III. 1 : *Caractères physicochimiques principaux des solvants utilisés*

<i>Solvants</i>	<i>Formule brute</i>	<i>M (g/mol)</i>	<i>Pureté</i>	<i>T d'ébullition</i>
<i>L'eau distillée</i>	H ₂ O	18.00		100°C
<i>Acide chlorhydrique</i>	HCl	36.46	36%	61°C
<i>Ethanol</i>	C ₂ H ₆ O	46.07	99.9%	79 °C
<i>Méthanol</i>	CH ₄ O	32.04	99.9%	65°C
<i>DMSO</i>	C ₂ H ₆ OS	78.13	99.5%	85 °C

Tableau III. 2 : Caractères physicochimiques principaux des réactifs utilisés

Réactifs	Pureté	Formule brute	M(g/mol)	Densité	Structure chimique
4-aminophenol (4AP)	98%	C ₆ H ₇ NO	109.14	-	
Benzaldéhyde	99 %	C ₇ H ₆ O	106.12	1.04	
Acide hypophosphoreux	50 %	H ₃ PO ₂	65.99	1.23	
Acide phosphoreux	50 %	H ₃ PO ₃	81.99	1.65	

III.2.2 Synthèse des molécules ciblées :

De nombreuses stratégies ont été développées pour synthétiser des acides α -aminophosphoniques et des α -aminophosphiniques. Chacune de ces stratégies possède une certaine limite d'utilisation. La réaction de *Kabachnik-Fields* est l'une des plus simples approches les plus pratiques pour la synthèse de ce type de composés organophosphorés par hydrolyse des esters α -aminophosphonates et des esters α -aminophosphinates correspondants. Celle-ci implique la condensation de trois composants en une seule étape (*one-pot*) : une amine primaire, un composé carbonylé et un dialkylephosphite (Schéma III. 1) [1].

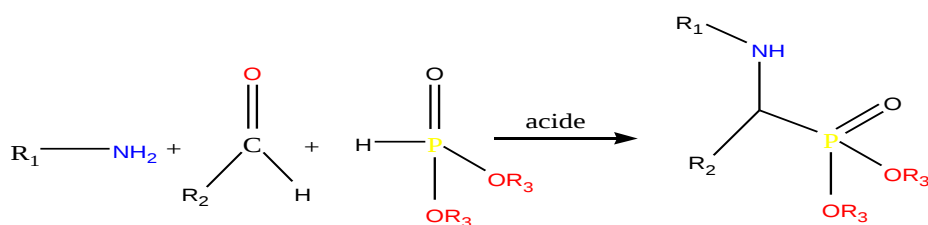


Schéma III. 1 : Schéma de la réaction à trois composants de Kabachnik-Fields utilisé pour la synthèse des α -aminophosphonates.

Dans notre travail on a choisi la méthode décrit par *Kabachnik-Fields* avec une légère modification. Cette modification est pour le but de préparer directement des acides α -aminophosphoniques et des acides α -aminophosphiniques sans passer par l'étape d'hydrolyse. En utilisant l'acide phosphoreux et l'acide hypophosphoreux au lieu du dialkylephosphite.

III.2.2.1 Synthèse de l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphinique (A) et l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphonique (B)

Dans un ballon à trois cols, le para-aminophénol (1 mmol) a été dissous dans 4 ml d'éthanol et de l'acide chlorhydrique concentré HCl (1 mmol). Ensuite, le benzaldéhyde (1 mmol) a été ajouté à la solution obtenue. Le mélange réactionnel a été placé dans une armoire à fumées et on y a ajouté de l'acide hypophosphoreux (1 mmol) ou de l'acide phosphoreux (1 mmol). Le mélange réactionnel a ensuite été porté à reflux pendant 5 heures à 70 °C. La progression de la réaction a été contrôlée par la chromatographie sur couche mince (CCM). Le mélange réactionnel a été évaporé et refroidi. Le produit brut obtenu a été filtré et récupéré avec un bon rendement. Le schéma III. 2, représente la séquence réactionnelle de la synthèse effectuée.

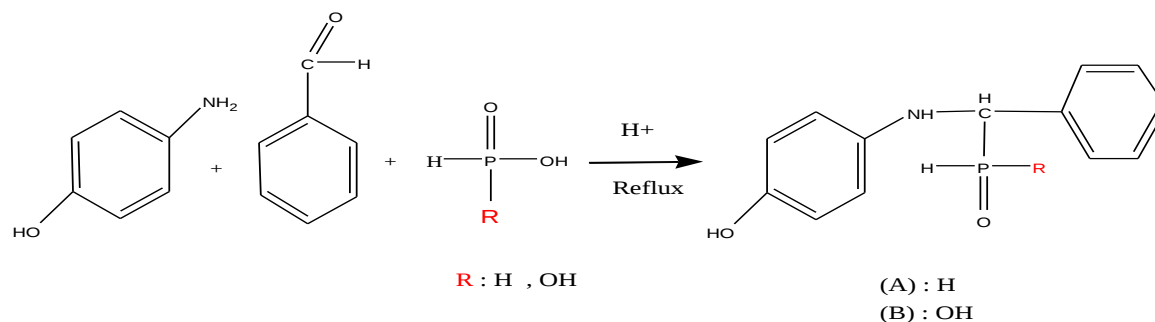


Schéma III. 2 : Séquence réactionnelle générale de synthèse de l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphinique (A) et l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphonique (B).

III.2.3 Mécanisme réactionnel

Le mécanisme réactionnel proposé pour la formation des acides synthétisés, est illustré par le Schéma III. 3

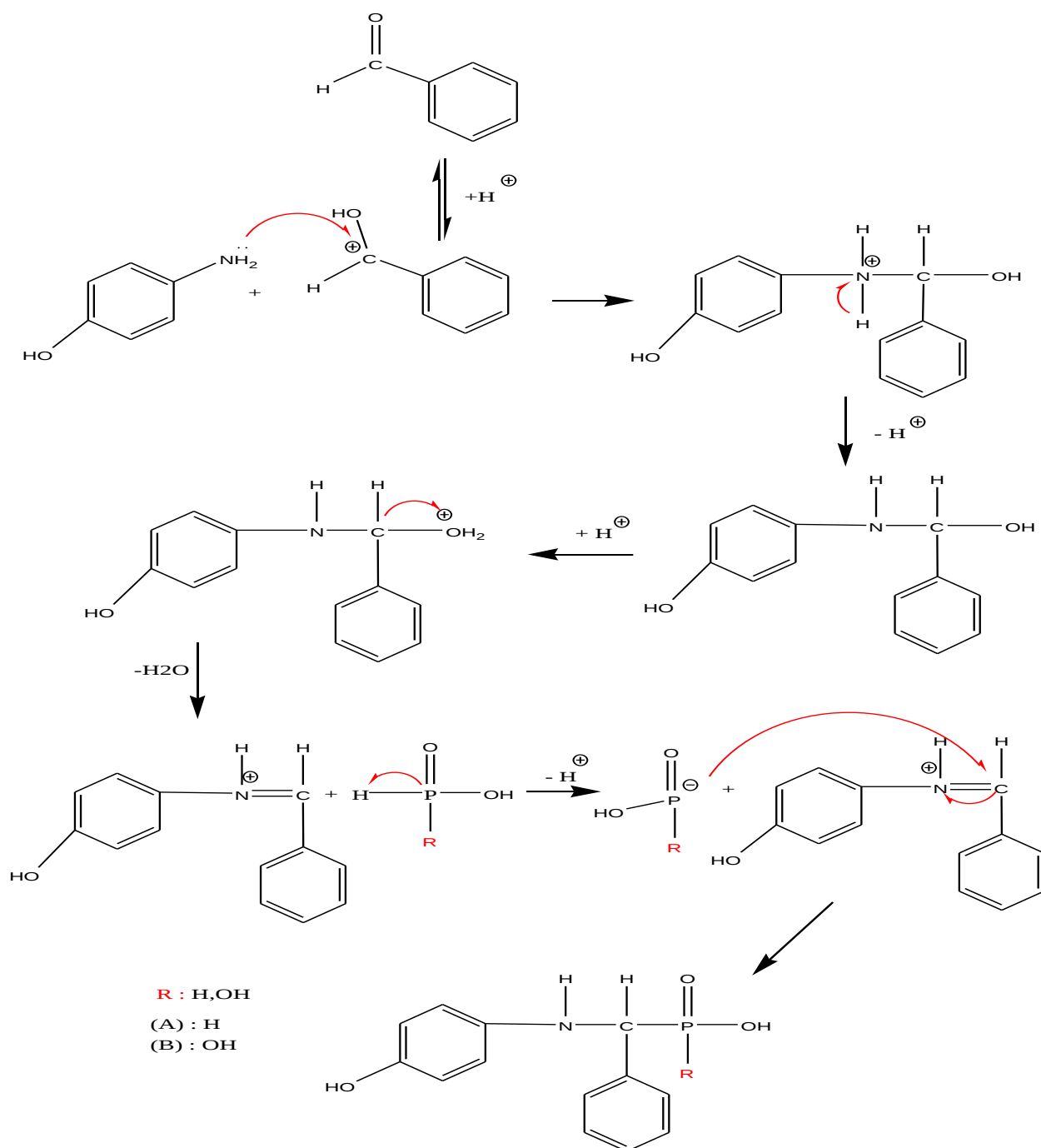


Schéma III. 3 : Mécanisme réactionnel proposé pour la formation de l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphinique (A) et l'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphonique (B)

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'évolution des réactions de synthèse a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM). On utilise des plaques de gel de silice 60 F254 (Merck) (40-63 μm). Comme éluant on a choisi après plusieurs essais un mélange de deux solvants méthanol / n-hexane de rapport de volume (3/2, V/V). La révélation des plaques sous une lampe ultra-violet (longueur d'onde 254 nm) permet d'estimer la fin et la nature des réactions soit : réversible ou irréversible et aussi la pureté des produits obtenus. Dans notre cas, l'apparition d'une nouvelle tâche, pour chaque produit synthétisé, différente de celle du produit de départ, indique l'obtention de nouveaux produits, alors que la disparition de l'un des produits de départ indique que la réaction est complète, elle est irréversible.

La CCM nous a permis aussi de déterminer le rapport frontal R_f , de chaque produit, 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. 3 : *Rapports frontaux des produits analysés par CCM*

Produit	R_f
(A)	0.52
(B)	0.46

Les résultats présentés dans le tableau III. 3, montrent que les deux acides synthétisés sont différents entre eux, les valeurs de R_f bien différentes révèlent la différence de polarité de ces composés,

III.3.1.2 La solubilité des produits synthétisés

La solubilité est la capacité d'un soluté à se dissoudre dans un solvant, pour former un mélange homogène. La solubilité des acides synthétisés a été testée dans des solvants à

polarités différentes, les résultats des tests de solubilité effectués sont regroupés dans le tableau III. 4.

Tableau III. 4 : *Solubilité des produits synthétisés dans les solvants organiques principaux et dans l'eau*

Solvant	(A)	(B)
H ₂ O	Insoluble	Insoluble
méthanol	peu soluble	peu soluble
éthanol	Insoluble	insoluble
Acétate d'éthyle	Insoluble	insoluble
DMSO	très soluble	très soluble
DMF	très soluble	très soluble
n-hexane	Insoluble	Insoluble
Ether de pétrole	Insoluble	Soluble

III.3.1.3 Points de fusion des produits synthétisés

Les résultats de la mesure de point de fusion des molécules synthétisées sont regroupés dans le tableau III. 5. Nous observons clairement que les points de fusion des produits synthétisés sont totalement différents aux celui de produits de départ. Ceci confirme que les produits obtenus ont des structures chimiques différentes à celles de produits de départs.

Tableau III. 5 : *Caractères principaux des produits synthétisés.*

	Formule brute	Masse Molaire (g/mol)	état	Couleur	Point de fusion (°C)	Rendement (%)
(A)	C ₁₃ H ₁₄ N O ₃ P	263.07	Poudre	Blanche	226	89
(B)	C ₁₃ H ₁₄ N O ₄ P	279.06	poudre	Jaune pale	230	85

III.3.2 Détermination des propriétés spectroscopiques des produits synthétisés

Dans le but de confirmer l'obtention des produits ciblés par les différentes procédures de synthèse exploités dans ce travail, on a appliqué les méthodes spectroscopiques : UV-Vis,

FT-IR, RMN et spectroscopie de masse pour la mise en évidence des propriétés spectrales de différents composés synthétisés.

III.3.2.1 Spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-Vis)

La spectrophotométrie UV-Vis nous a permis la mise en évidence des bandes d'absorption caractéristiques des produits synthétisés et celles des produits de départ, tous les spectres ont été enregistrés en DMSO, à la température ambiante sur des solutions de même concentration 10^{-4} mol.L⁻¹ dans des cuves en quartz de trajet optique de 1 cm sur le domaine d'ultraviolet visible allant de 200 à 800 nm.

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. 1, III. 2 représentent les spectres d'absorption UV-Visible du deux acides synthétisés et leur amine de départ.

On constate des différences bien distinguées entre les spectres des produits synthétisés et les spectres de l'amine de départ.

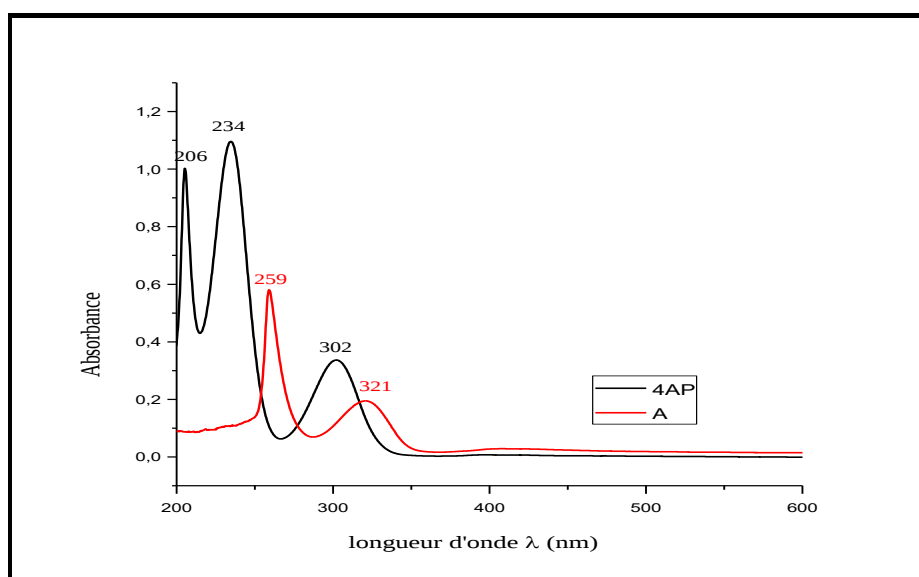


Figure III. 1 : Spectres UV-Vis de l'acide (A) et son amine de départ 4AP, enregistrés en DMSO à température ambiante dans une cuve de trajet optique $l = 1$ cm

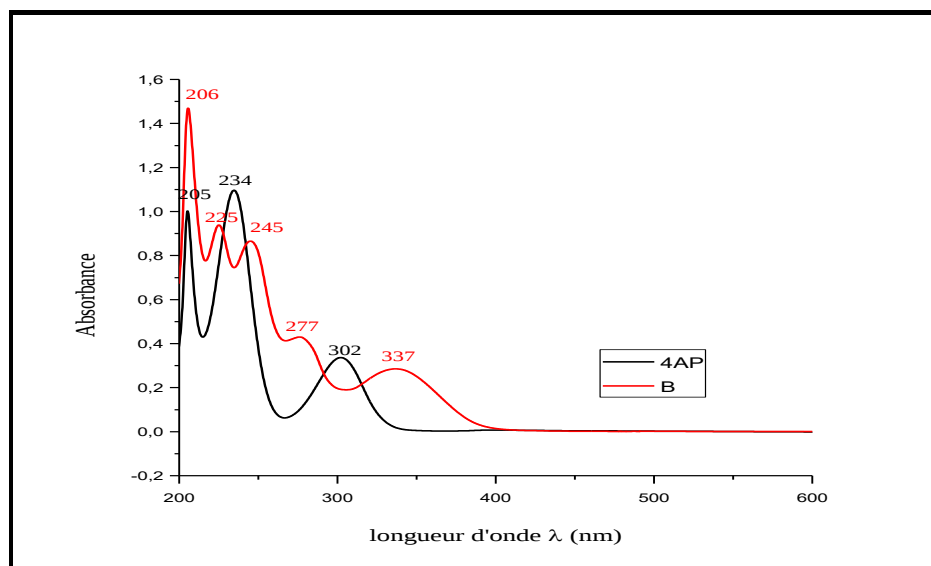


Figure III. 2 : Spectres UV-Vis de l'acide (B) et son amine de départ 4AP, enregistrés en DMSO à température ambiante dans une cuve de trajet optique $l = 1$ cm

- **UV-Vis des molécules synthétisées et leur amine de départ**

Le spectre UV-Vis enregistré pour l'amine **4AP** est caractérisé par trois bandes d'absorption : une bande d'absorption intense située aux alentours de 206 nm correspondant aux transitions électroniques ($\pi \rightarrow \pi^*$) du noyau aromatique, une bande d'absorption d'une forte intensité à $\lambda_{\max} = 234$ nm et une bande d'absorption d'intensité moyenne $\lambda_{\max} = 302$ nm attribuées aux transitions électroniques ($n \rightarrow \sigma^*$) des chromophores NH et au groupement phénolique OH respectivement.

Le spectre UV-Vis de l'acide phosphinique (A) présente deux bandes d'absorption bien définies et différentes de celles de l'amine, l'une d'intensité moyenne située à $\lambda_{\max} = 259$ nm attribuée aux transitions électroniques du noyau aromatique, et l'autre d'une faible intensité située à $\lambda_{\max} = 264$ nm. Alors que, le spectre de l'acide phosphonique (B) est caractérisé par cinq bandes d'absorption : deux bandes d'intensité moyenne situées à $\lambda_{\max 1} = 225$ nm et $\lambda_{\max 2} = 245$ nm, une bande très intense située à $\lambda_{\max 3} = 206$ nm et deux bandes larges situées à $\lambda_{\max 4} = 277$ nm et $\lambda_{\max 5} = 337$ nm.

La comparaison entre les spectres des produits synthétisés et celle de produit de départ (amine), montre la disparition des bandes d'absorption et l'apparition de nouvelles bandes sur les spectres des deux acides synthétisés bien différentes de celles de produit de départ. Ainsi que des déplacements bathochromes (augmentation de la longueur d'onde $\lambda_{\max}$) en général, et un effet hyperchrome (augmentation de l'absorbance), ces déplacements peuvent être

expliqués par la présence des groupements phosphonates et phosphinates 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'a conduit au changement des structures et des masses moléculaires des produits obtenus.

Les spectres UV-Vis ont été exploités selon la loi de *Beer-Lambert* pour caractériser les différentes molécules par leurs coefficients d'extinctions spécifiques (ϵ). Les valeurs des longueurs d'ondes (λ_{max}) et des coefficients d'extinctions spécifiques (ϵ) sont regroupées dans le tableau III. 6. La loi de Beer Lambert permet de calculer ϵ : **Abs = ϵ .l.C**

λ : Longueur d'onde exprimé en nm

ϵ : Coefficient d'absorption molaire exprimé en $\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$

Tableau III. 6 : Paramètres spectrales caractéristiques des spectres UV-Vis des produits de départ et des acides synthétisés enregistrés en DMSO à température ambiante.

	λ_{max} (nm)	Abs	C ($\text{mol}.\text{L}^{-1}$)	ϵ ($\text{mol}^{-1} .\text{L}.\text{cm}^{-1}$)
(A)	259	0.581	10^{-4}	5810
(B)	206	1.474	10^{-4}	14740

III.3.2.2 Spectroscopie infrarouge IR-TF

L'analyse des spectres IR s'est effectuée par comparaison des spectres caractéristiques des produits synthétisés avec ceux des produits de départ correspondants.

Les figures III. 3, III. 4 représentent les spectres IR des acides synthétisés (A), (B) et celle d'aminophénol correspondant, tandis que Le tableau III. 7, rassemble les principaux pics caractéristiques des vibrations IR des acides synthétisés et leur produit de départ correspondant, ainsi que leurs possibles attributions.

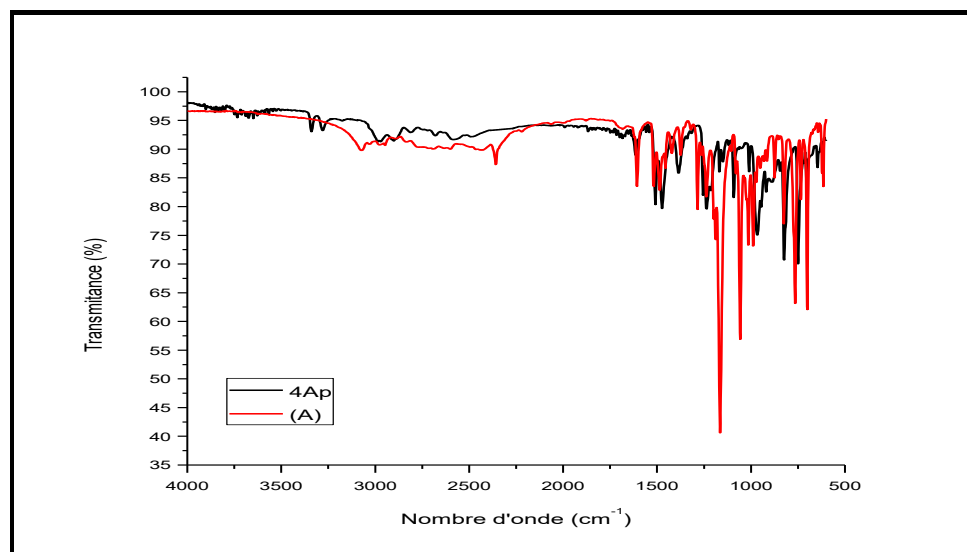


Figure III. 1 : Spectres infrarouge caractéristiques de l'acide (A) et son amine de départ 4aminophenol (4AP)

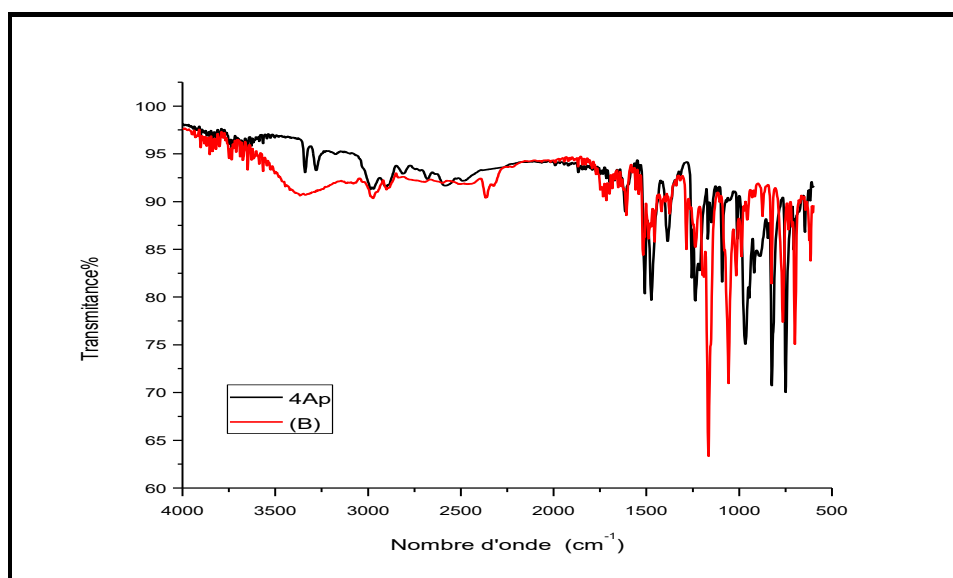


Figure III. 4 : Spectres infrarouge caractéristiques l'acide (B) et son amine de départ 4aminonol (4AP)

Les spectres FT-IR des deux composés synthétisés présentent des bandes dans la région de 3350 cm^{-1} et 3359 cm^{-1} qui peuvent être attribuées à la vibration d'étirement des groupes N-H, respectivement. Les bandes d'absorption observées entre 3100 et 2900 cm^{-1} sont dues aux groupes aromatiques et aliphatiques $\nu(\text{C-H})$, respectivement. Une forte bande à 1158 cm^{-1} et 1165 cm^{-1} a été observée, elle peut être attribuée aux fréquences d'étirement des

groupes $\nu(\text{P}=\text{O})$, respectivement. De même, les bandes d'absorption dans les régions de 984cm^{-1} et 989cm^{-1} sont attribuées aux groupes $\nu(\text{P}-\text{O}-\text{H})$.

La coordination de l'acide hypophosphoreux ou de l'acide phosphoreux avec le benzaldéhyde est également confirmée par l'apparition de nouvelles bandes dans la gamme $760\text{-}767\text{cm}^{-1}$ correspondant à la flexion P-C. En outre, La disparition des pics caractéristiques de l'amine primaire (NH_2) de l'aminophénol et du groupe carbonyle ($\text{C}=\text{O}$) du benzaldéhyde situés à 3075 et 3373cm^{-1} , respectivement et l'apparition des pics d'absorption caractéristiques des groupes P=O, P-C, P-O-H et P-H confirment l'interaction des différents réactifs et donc la formation des molécules proposées.

Tableau III. 7 : Principaux pics caractéristiques des vibrations IR des produits synthétisés et leurs produits de départ correspondant.

Attribution	Fréquences vibrationnelle (cm^{-1})	
	(A)	(B)
$\nu(\text{O}-\text{H})$	3645	3624
$\nu(\text{N}-\text{H})$	3350	3359
$\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{Ar}}$	3075	3065
$\nu(\text{C}-\text{H})_{\text{Alph}}$	2980	2970
$\nu(\text{P}-\text{H})$	2352	-----
$\nu(\text{C}-\text{C})_{\text{Ar}}$	1674	1674
$\nu(\text{P}=\text{O})$	1158	1165
$\nu(\text{C}-\text{N})$	1050	1057
$\nu(\text{P}-\text{OH})$	984	989
$\nu(\text{C}-\text{P})$	760	767

III.3.2.3 Spectrométrie de résonance magnétique RMN

Les molécules synthétisées sont caractérisées par la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN. Cette technique permis de confirmer les structures attendues des molécules analysées.

L'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphinique (A)

➤ RMN ^1H

Le spectre RMN ^1H correspondant aux déplacements chimiques de la molécule (A) est représenté par la figure III.5, il révèle les déplacements chimiques suivants : RMN ^1H (^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6)) , δ = 4.64 (d, J = 18.80 Hz, 1H, P-CH), 4.89 (s, H, PH), 5.93 (s, 1H, P-OH), 6.42 (d, 2H, Ar-H) 6.56 (d, 2H, Ar-H), 7.16-7.41 (m, 5H, Ar-H), 7.90 (s, 1H, NH), 9.44 (s, 1H, Ar-OH) ppm;

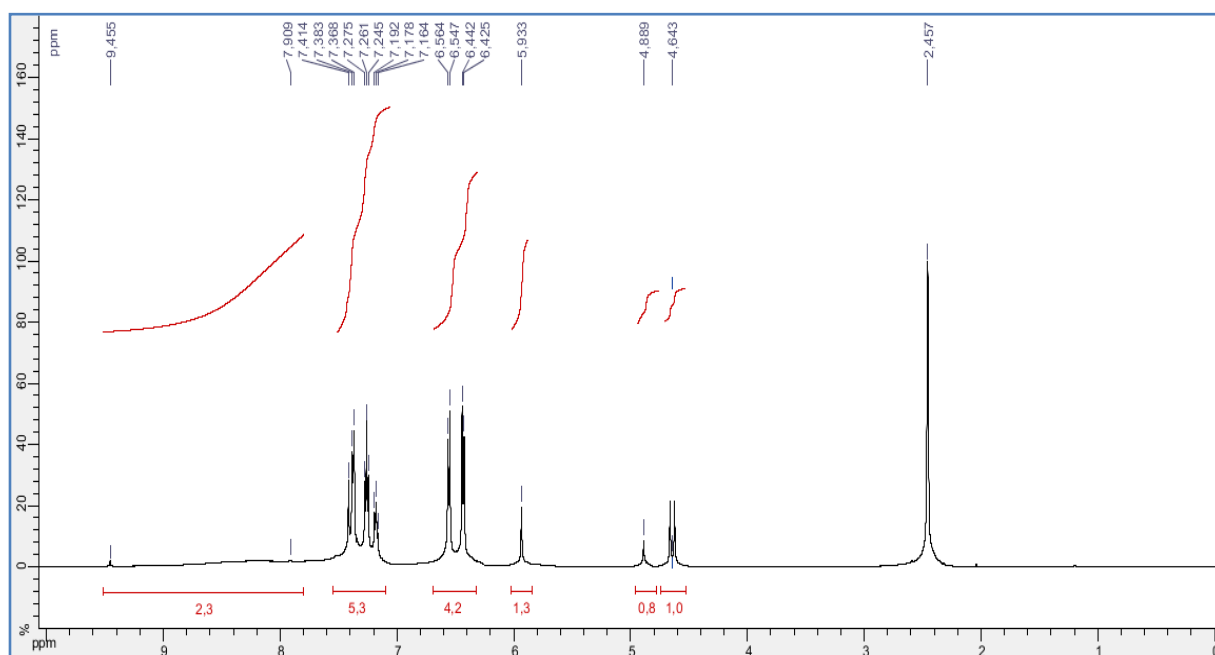


Figure III. 5 : Spectre RMN ^1H caractéristique de l'acide (A)

Les déplacements chimiques observés d'après l'analyse de l'acide (A) par RMN ^1H correspondent à la structure de la figure III. 6 :

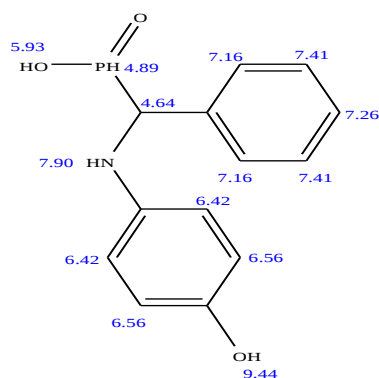


Figure III.6 : Structure proposée pour l'acide (A) d'après l'RMN ^1H

➤ **RMN ^{13}C**

Le spectre RMN ^{13}C correspondant aux déplacements chimiques de la molécule (A) est représenté par la figure III. 7, il révèle les déplacements chimiques suivants :

RMN ^{13}C (^{13}C {1H} NMR (101 MHz, DMSO- d_6)) δ = 58.7 (1C, **CH-P**), 115.8 (2C, **-C_{Ar}**), 115.9 (2C, **-C_{Ar}**), 127.6 (1C, **-C_{Ar}**), 128.5 (2C, **-C_{Ar}**), 128.7 (2C, **-C_{Ar}**) 136.6 (1C, **-C_{Ar}**), 139.8 (1C, **-C_{Ar}**), 149.9 (1C, **-C_{Ar}**) ppm.

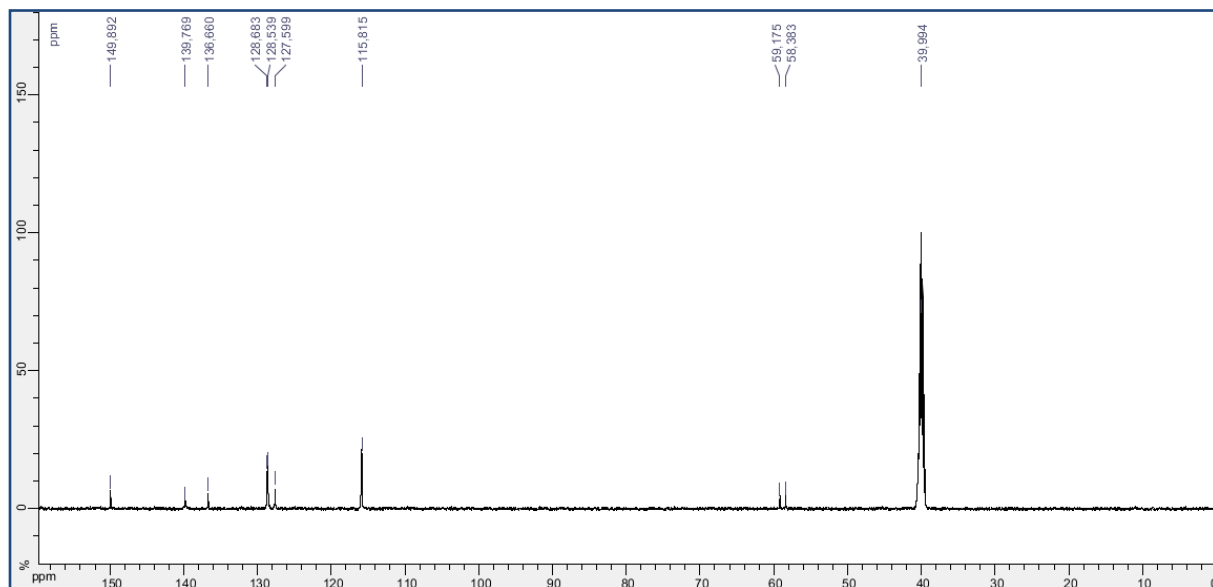


Figure III.2: Spectre RMN ^{13}C caractéristique de l'acide (A)

Les déplacements chimiques observés d'après l'analyse de l'acide (A) par RMN ^{13}C correspondent à la structure de la figure III. 8 :

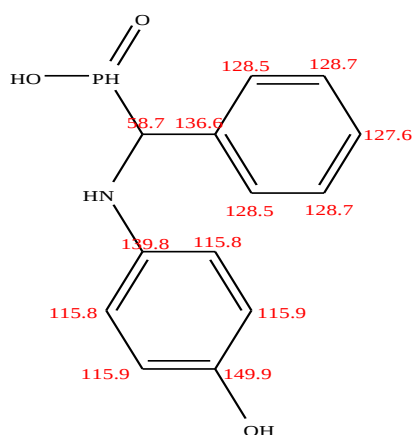


Figure III. 8 : Structure proposée pour l'acide (A) d'après l'RMN ^{13}C .

➤ RMN ^{31}P

Le spectre RMN ^{31}P correspondant aux déplacements chimiques de la molécule (A) est enregistré à l'aide d'un spectromètre ^{31}P {1H} NMR (202 MHz, DMSO- d_6), et représenté par la figure II. 9. On constate que ce spectre révèle un multiplet à $\delta = 40.24$ ppm confirmant ainsi la présence d'un atome de phosphore dans la molécule (A), ce qui correspond à la structure proposée.

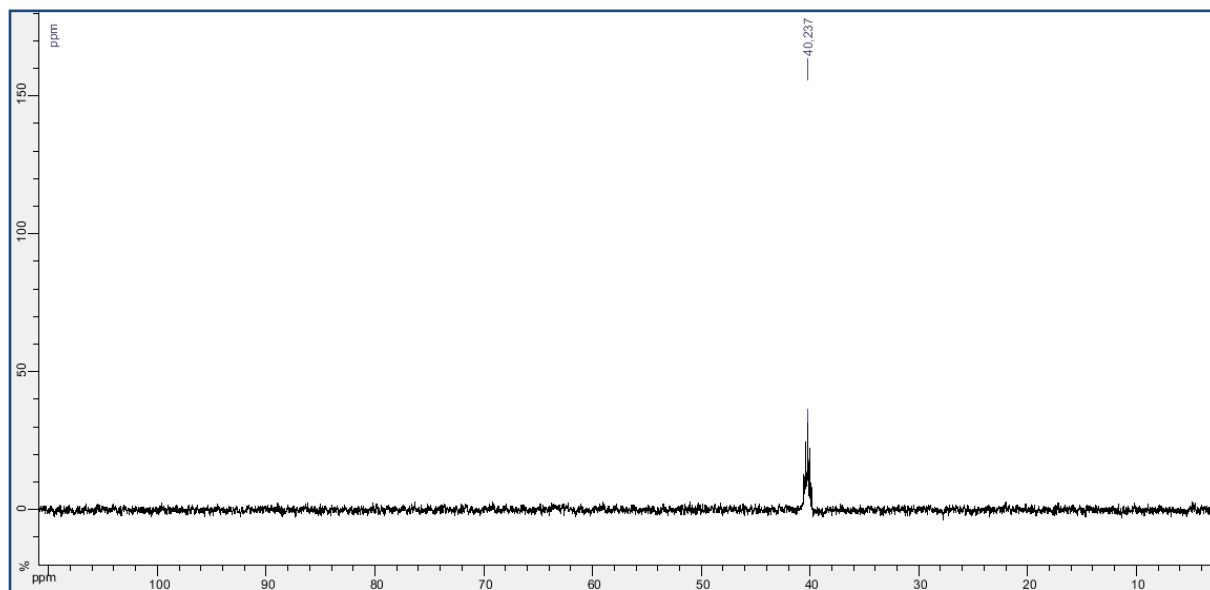


Figure III .9 : Spectre RMN ^{31}P caractéristique de l'acide(A)

L'acide [(4-hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphonique (B)

➤ RMN ^1H

Le spectre RMN ^1H correspondant aux déplacements chimiques de la molécule (B) est représenté par la figure III. 10, il révèle les déplacements chimiques suivants :

RMN ^1H (^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6)), $\delta = 4.43$ (d, $J = 24.50$ Hz, 1H, P-CH), 6.03 (s, 2H, P-OH), 6.43 (d, 2H, Ar-H), 6.82 (d, 2H, Ar-H), 7.14 (d, 2H, Ar-H), 7.30 (s, 1H, Ar-H), 7.45 (d, 2H, Ar-H), 7.86 (s, 1H, NH), 8.58 (s, 1H, Ar-OH) ppm.

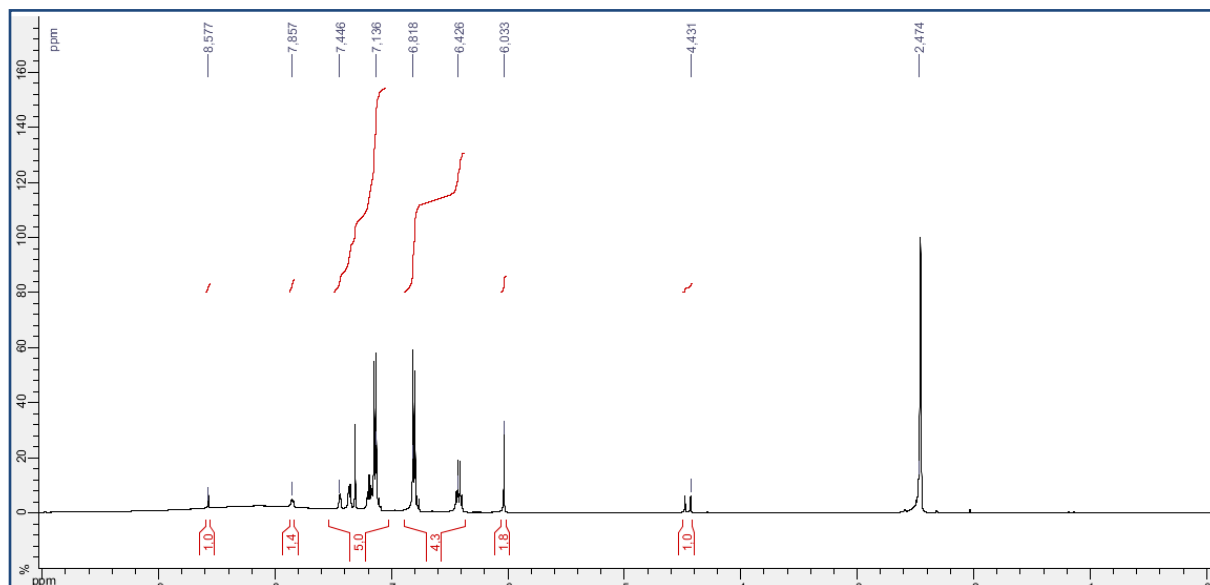


Figure III. 10 : Spectre RMN ^1H caractéristique de l'acide (B)

Les déplacements chimiques observés d'après l'analyse de l'acide (B) par RMN ^1H correspondent à la structure de la figure III. 11 :

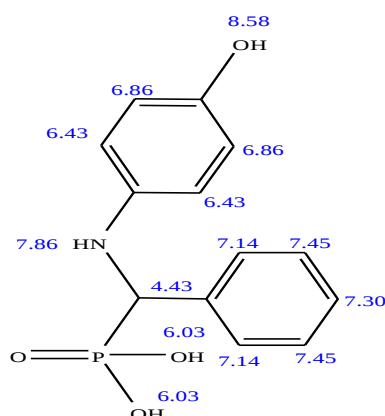


Figure III. 11 : Structure proposée pour l'acide (B) d'après l'RMN ^1H

➤ RMN ^{13}C

Le spectre RMN ^{13}C correspondant aux déplacements chimiques de l'acide (B) est représenté par la figure III. 12, il révèle les déplacements chimiques suivants :

RMN ^{13}C ($^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 57.6 (1C, CH-P), 115.3 (2C, - C_{Ar}), 115.9 (2C, - C_{Ar}), 127.0 (1C, - C_{Ar}), 128.1 (2C, - C_{Ar}), 128.7 (2C, - C_{Ar}) 134.2 (1C, - C_{Ar}), 140.4 (1C, - C_{Ar}), 146.9 (1C, - C_{Ar}) ppm.

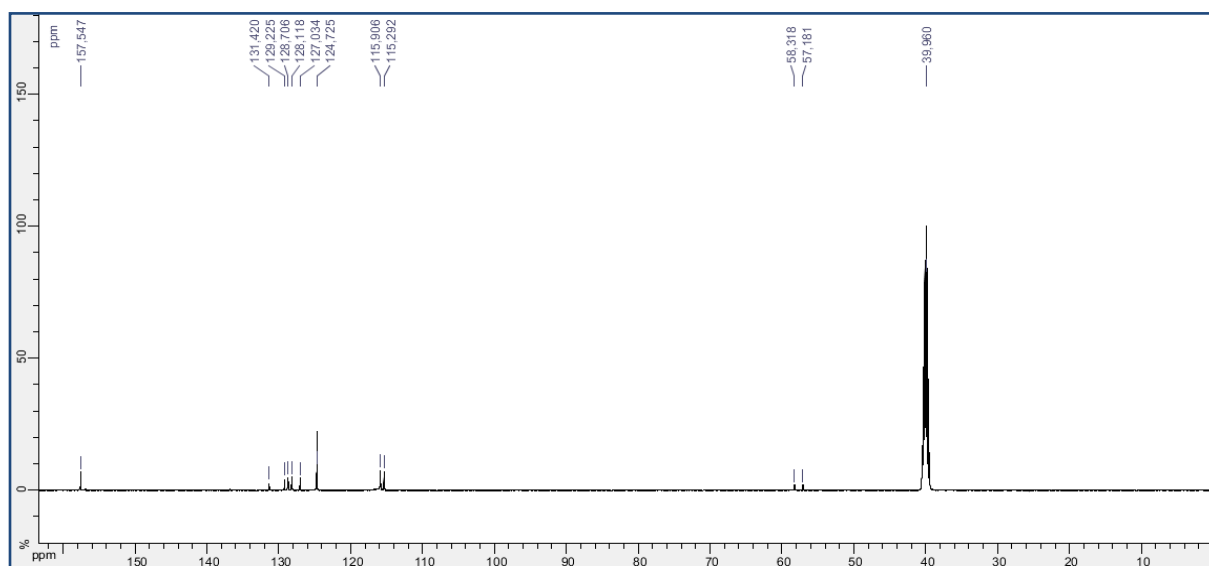


Figure III. 12 : Spectre RMN ^{13}C caractéristique de l'acide (B)

Les déplacements chimiques observés d'après l'analyse de l'acide (B) par RMN ^{13}C correspondent à la structure de la figure III. 13 :

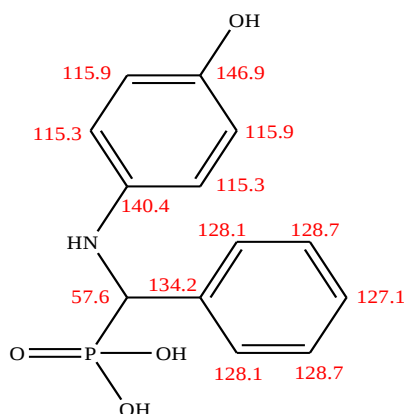


Figure III. 13 : Structure proposée pour l'acide (B) d'après l'RMN ^{13}C .

➤ RMN ^{31}P

Le spectre RMN ^{31}P correspondant aux déplacements chimiques de la molécule (B) est enregistré à l'aide d'un spectromètre ^{31}P { ^1H } NMR (202 MHz, DMSO- d_6), et représenté par la figure III. 14. On constate que ce spectre révèle un multiplet à $\delta = 40.21$ ppm confirmant ainsi la présence d'un atome de phosphore dans l'acide (B), ce qui correspond à la structure proposée.

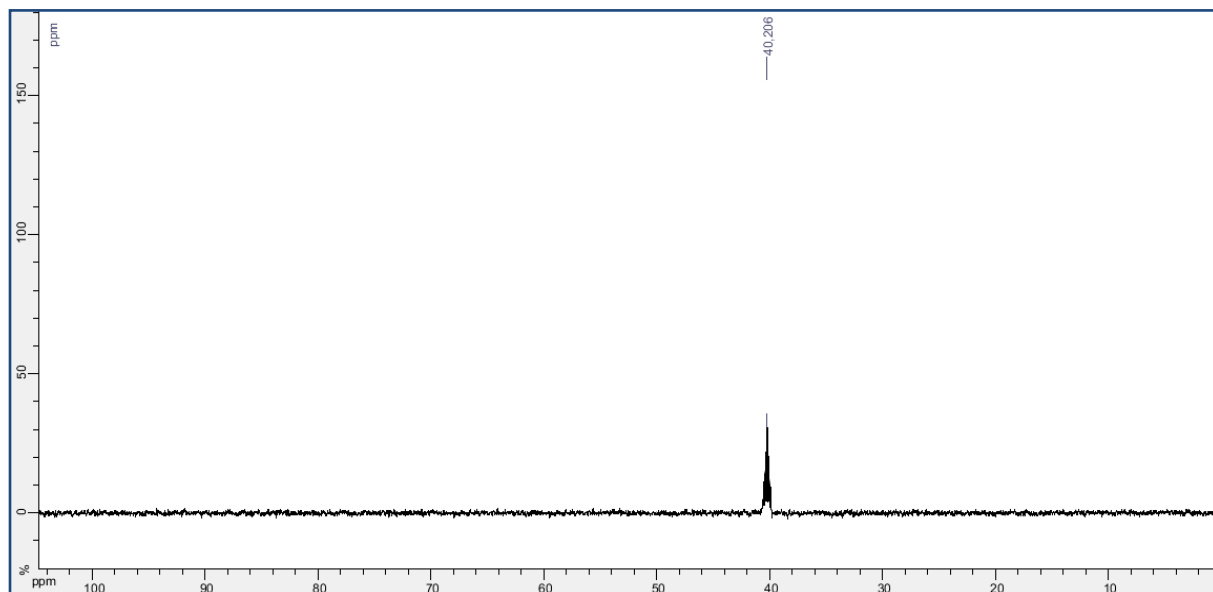


Figure III. 14 : Spectre $RMN^{31}P$ caractéristique de l'acide (B)

II.3.2.4 Spectroscopie de masse (SM)

La spectrométrie de masse (SM) donne une information structurale sur la molécule à analyser et elle permet aussi de connaître la masse moléculaire d'une molécule à partir du pic moléculaire.

L'interprétation du spectre de masse des acides synthétisés (A) et (B) présenté dans la figure II. 15 et la figure II. 16 respectivement permet de tirer les informations suivantes :

- Le pic moléculaire : $m/z = 263.07$ (M, 14.5%), 279.06 (M, 14.3%), c'est le pic le très important il correspond à l'ion de nombre de masse égal à la masse moléculaire de la molécule synthétisé (A) et (B) respectivement.
- Le pic de base : 262.06 (M-H, 100%). 278.06 (M-H, 100%), c'est le pic le plus intense du spectre de masse de la molécule synthétisé (A) et (B) respectivement. Il correspond à l'ion le plus abondant donc le plus stable.
- Les pics fragments : Ils correspondent aux différents ions fragments et on peut les cités dans la suite :

Le pic situé à $m/z = 264.07$ (M + H, 1.4%), correspond à l'ion $[C_{13}H_{14}N_1O_3P+H]$

Le pic situé à $m/z = 280.06$ (M + H, 6.1%), correspond à l'ion $[C_{13}H_{14}N_1O_4P+H]$

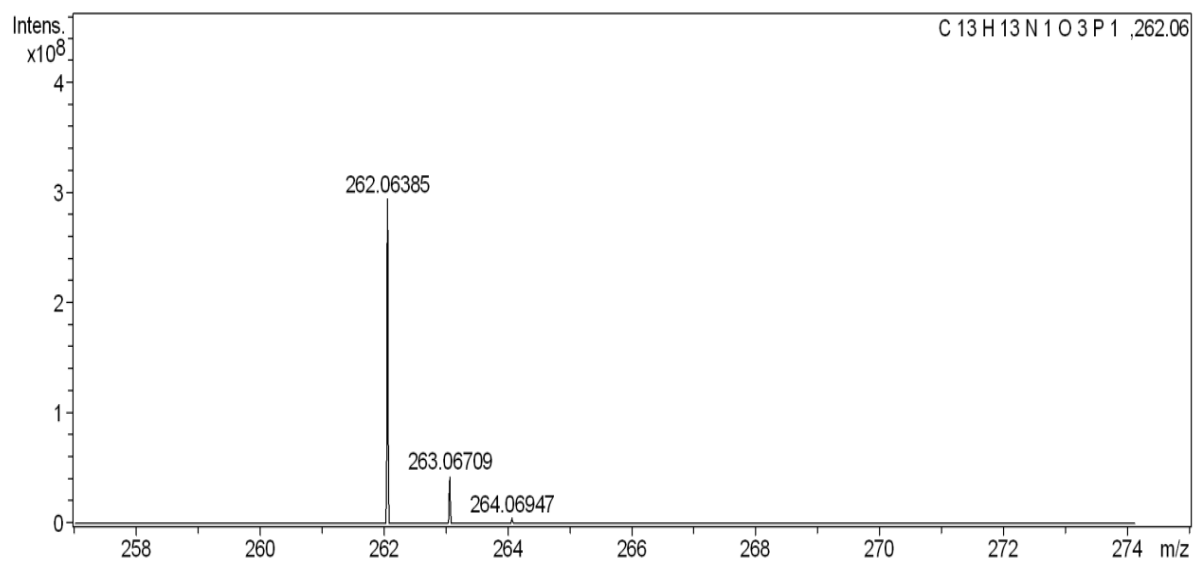


Figure II. 15 : *Spectre de masse de l'acide (A)*

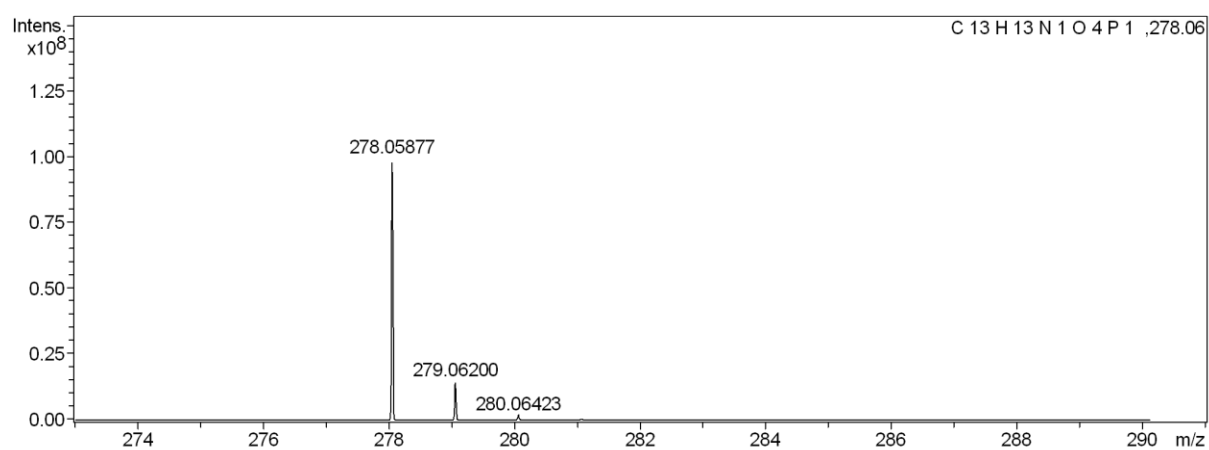


Figure II. 16 : *Spectre de masse de l'acide (B)*

Références bibliographiques

- [1] (a) M.I. Kabachnik, T.Y. Medved, New method for preparation of α -aminophosphonic acids, Doklady. Akademii Nauk SSSR. 83 (1952) 689-692. (b) M. I. Kabachnik, T. Y. Medved, New method for the synthesis of 1-aminoalkylphosphonic acids communication 1, Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR 2 (1953) 769–777. (c) T. Medved, M. I. Kabachnik, New method for the synthesis of 1-aminoalkylphosphonic and phosphinic acids Communication 4. Synthesis of (1-aminoalkyl)phenylphosphinic acids, Bulletin of the Academy of Sciences of USSR 3 (6) (1954) 893–900. (d) E.K. Fields, The synthesis of esters of substituted aminophosphonic acids, Journal of the American Chemical Society. 74 (1952) 1528–1531.

CHAPITRE IV

Activité biologique et pharmaceutique

IV.1 Introduction

Ce chapitre est consacré à l'évaluation *in vitro* des activités biologiques des molécules synthétisés y compris l'activité antioxydante par différentes méthodes ainsi que leur capacité anti-enzymatique notamment, leur activité antidiabétique, anti Alzheimer.

IV.2 Évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour estimer l'activité antioxydante *in vitro*. Certaines d'entre elles reposent sur la capacité réductrice d'un composé comme étant un indicateur significatif de son potentiel antioxydant, d'autres reposent sur la mesure d'une molécule à piéger les composés radicalaires [1].

L'activité antioxydante de nos molécules synthétisées a été évaluée par six différents tests *in vitro* : DPPH-, ABTS+, blanchiment du β -carotène/acide linoléique, CUPRAC, pouvoir réducteur et O-phénanthroline. Les résultats obtenus ont été exprimés en IC_{50} μ g/mL sauf pour les méthodes CUPRAC, pouvoir réducteur et O-phénanthroline qui ont été données en termes d'absorbance ($A_{0,50}$ μ g/mL). L'activité antioxydante des composés synthétisés a été comparée aux standards (BHA et BHT).

L' IC_{50} et l' $A_{0,50}$ ont été déterminés à partir des différentes concentrations testées. La molécule qui a un IC_{50} ou un $A_{0,50}$ plus faible présente une activité antioxydante élevée.

IV.2.1 Activité de piégeage du radical DPPH

L'activité de piégeage des radicaux libres des molécules synthétisées a été réalisée par le test DPPH selon la méthode de Blois *et al* [2].

Les résultats obtenus de cette activité sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (tableau IV. 1)

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

D'après les résultats obtenus, on peut constater que toutes les molécules testées possèdent une capacité anti-radicalaire significative dose dépendante 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 molécules synthétisés et des standards BHA et BHT utilisés.

Tableau IV. 1 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA

C (µg/ml) Molécule	Inhibition du radical DPPH (%)							
	0.39	0.78	1.56	3.1	6.25	12.5	25	IC ₅₀ (µg/ml)
(A)	8,35±0,30	19,92±1,71	43,06±0,30	69,91±1,81	86,58±0,20	88,25±0,10	89,70±0,10	2.10±0.06
(B)	7,07±0,44	15,17±0,20	34,27±0,78	63,89±0,35	88,89±0,17	89,01±0,20	89,82±0,70	2.42±0.02
BHA	-	0,09±2,33)	3,97±1,92	12,94±4,21	26,68±0,18	47,12±2,95	68,69±1,17	15,74 ±0,47
BHT	-	28,52±1,67	31,30±1,37	37,71±3,01	47,54±0,13	62,16±2,11	77,60±0,83	6,55±0,59

Sat : Saturé, - : Non Mesuré

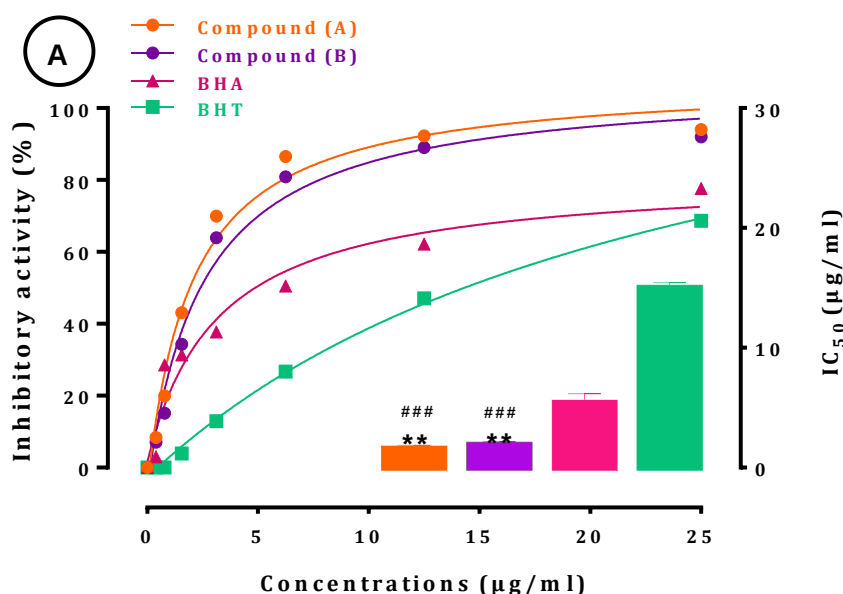


Figure IV. 1 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition et des concentrations inhibitrices IC_{50} du radical DPPH exprimées en $\mu g.mL^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA.

Pour mieux évaluer la capacité antioxydante de nos composés vis-à-vis du DPPH•, les résultats ont été exprimés en IC_{50} (Concentration d'inhibition à 50%) ; C'est la concentration du composé nécessaire à réduire de 50 % de radical libre (DPPH). Nous rappelons que plus la valeur d' IC_{50} est faible plus le composé a un potentiel antioxydant puissant [3].

Les valeurs IC_{50} sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des molécules testées et des standards (la figure IV.1)

Les valeurs des IC_{50} trouvées sont représentées dans le Tableau IV. 1 et dans la figure IV 1 sous forme d'histogrammes.

D'après les résultats obtenus dans ce test, il apparaît que les deux acides synthétisés (A) et (B) possèdent un pouvoir antioxydant supérieur à celui des standards BHT et BHA. L'activité antioxydante déterminée par la méthode DPPH suit l'ordre croissant suivant :

BHT (IC_{50} : 15.74 $\mu\text{g/mL}$) < BHA (IC_{50} : 6.55 $\mu\text{g/mL}$) < (B) (IC_{50} : 2.42 $\mu\text{g/mL}$) < (A) (IC_{50} : 2.10 $\mu\text{g/mL}$).

IV.2.2 Activité de piégeage du radical ABTS

L'activité de piégeage des $ABTS^{\bullet+}$ de nos molécules synthétisées a été testée selon la méthode de *Re et al* [4].

L'ensemble des résultats de cette activité antioxydante exprimée par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (IC_{50}) est regroupés dans le tableau IV. 2 ci-dessous :

Tableau IV. 2 : Pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS en fonction des concentrations des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA.

C($\mu\text{g/ml}$) Molécule	Inhibition du radical ABTS (%)							
	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
(A)	25.38 $\pm$ 0.94	34.77 $\pm$ 0.43	57.31 $\pm$ 0.31	91.16 $\pm$ 0.34	92.38 $\pm$ 0.15	93.94 $\pm$ 0.17	94.04 $\pm$ 0.08	1.31 $\pm$ 0.04
(B)	19.37 $\pm$ 0.75	29.33 $\pm$ 0.31	53.31 $\pm$ 1.18	94.24 $\pm$ 0.22	Sat	Sat	Sat	1.46 $\pm$ 0.03
BHT	-	35.61 $\pm$ 0.75	58.56 $\pm$ 3.22	75.57 $\pm$ 8.07	92.29 $\pm$ 1.60	93.15 $\pm$ 0.19	94.06 $\pm$ 0.63	1.55 $\pm$ 0.26
BHA	-	31.47 $\pm$ 1.60	34.13 $\pm$ 1.31	40.28 $\pm$ 2.88	49.71 $\pm$ 0.12	63.72 $\pm$ 2.02	78.52 $\pm$ 0.80	7.54 $\pm$ 0.67

Sat : Saturé, - : Non Mesuré

La figure IV. 2 représente les pourcentages d'inhibitions en fonction de la concentration des molécules synthétisées ainsi que celles de BHT et BHA, $I\% = f(C)$.

Selon cette figure, on peut constater que les pourcentages d'inhibitions augmentent avec l'augmentation de la concentration et que les molécules testées présentent une activité anti-radicalaire importante.

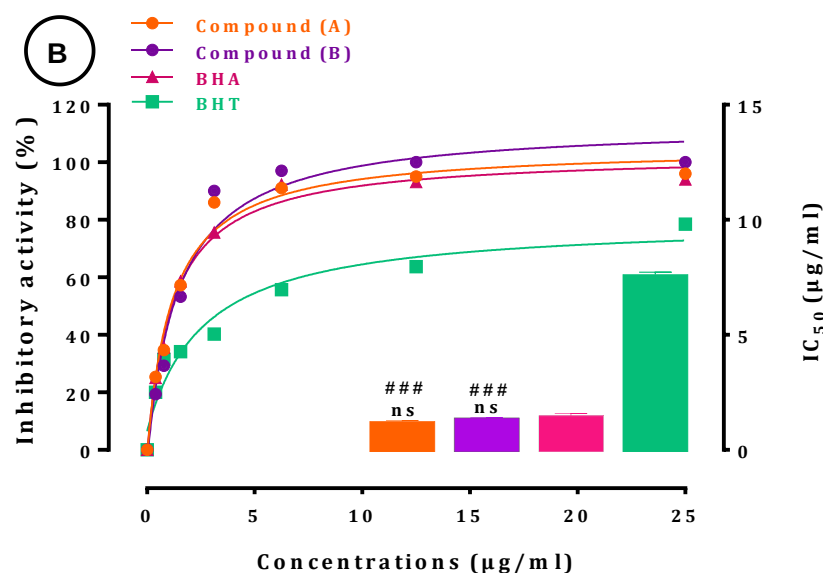


Figure IV. 2 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition et des concentrations inhibitrices IC_{50} du radical ABTS exprimées en $\mu g \cdot mL^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA.

La valeur de l' IC_{50} représente la concentration de l'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % du radical libre ABTS, cette valeur a été déterminée graphiquement en utilisant la régression linéaire du graphe du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration [5]. Plus la valeur d' IC_{50} est faible plus l'activité est importante. Les valeurs obtenues de l' IC_{50} pour les molécules étudiées et les standards sont représentées dans la figure IV. 2.

Les résultats du test $ABTS^{\cdot+}$ présentés dans la figure IV. 2 ont montré une forte activité antioxydante des deux molécules (A) et (B) où la valeur d' IC_{50} était très proche à la valeur d' IC_{50} présentée par le standard BHA et supérieur à celle du standard BHT.

Selon le paramètre IC_{50} , L'activité antioxydante déterminée par le teste ABTS, suit l'ordre croissant suivant :

$$BHT (IC_{50}: 7.54 \mu g/mL) < BHA (IC_{50}: 1.55 \mu g/mL) < (B) (IC_{50}: 1.46 \mu g/mL) < (A) (IC_{50}: 1.33 \mu g/mL)$$

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

L'activité de blanchiment du β -carotène des molécules synthétisées a été évaluée selon le protocole décrit par Marco et al [6].

Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique et le blanchiment de β -carotène des acides synthétisés et des standards BHT et BHA sont représentés dans le tableau IV. 3 ci-dessous.

Tableau IV. 3 : Pourcentage d'inhibition des molécules (A), (B) et standards BHT et BHA, par peroxydation du β -carotène

C(μ g/ml) Molécule	Inhibition dans le test de blanchissement acide linoléique/ β -carotène(%)							
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	IC ₅₀ (μ g/ml)
(A)	47.02 $\pm$ 0.58	56.68 $\pm$ 0.70	66.07 $\pm$ 0.09	70.90 $\pm$ 0.12	83.65 $\pm$ 0.79	90.13 $\pm$ 0.94	91.12 $\pm$ 0.41	3.18 $\pm$ 0.26
(B)	46.02 $\pm$ 0.58	58.02 $\pm$ 0.25	62.07 $\pm$ 0.09	69.79 $\pm$ 0.24	74.90 $\pm$ 0.12	83.65 $\pm$ 0.79	90.13 $\pm$ 0.94	3.85 $\pm$ 0.27
BHT	81.14 $\pm$ 0.84	86.09 $\pm$ 1.04	87.52 $\pm$ 4.24	91.67 $\pm$ 0.52	94.11 $\pm$ 0.42	94.41 $\pm$ 0.32	95.58 $\pm$ 0.19	1.24 $\pm$ 0.00
BHA	84.23 $\pm$ 1.14	90.11 $\pm$ 0.68	94.59 $\pm$ 0.77	96.09 $\pm$ 0.02	97.35 $\pm$ 1.08	99.59 $\pm$ 0.14	99.66 $\pm$ 0.52	1.26 $\pm$ 0.00

Sat : Saturé, - : Non Mesuré

D'après les résultats obtenus, on peut tracer les courbes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des molécules synthétisées ainsi que celle des standards utilisés BHT et BHA, $I\% = f(C)$, (figures IV. 3).

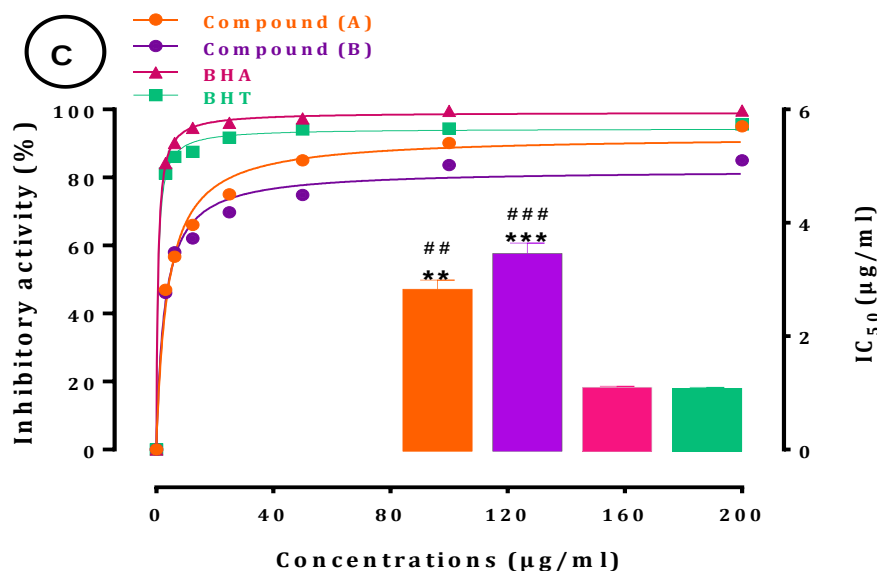


Figure IV. 3 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition et des concentrations inhibitrices IC₅₀ de blanchiment β -carotène exprimées en μ g.mL⁻¹, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) par les molécules (A), (B) et les standards BHT et BHA.

Cette figure montre que tous les produits testés présentent une augmentation progressive de l'activité avec l'augmentation de la concentration des molécules synthétisés et des standards BHA et BHT utilisés.

D'après cette figure, on peut aussi constater que les composés (A) et (B) atteignent rapidement à l'activité maximale à une très faible concentration.

Pour comparer l'efficacité inhibitrice des produits synthétisés avec celle des références (BHT et BHA), les IC_{50} sont calculés et représentés par la figure IV. 3 sous forme d'histogrammes.

Les résultats obtenus par la méthode β -carotène/acide linoléique montrent que les deux composés synthétisés ont une activité protectrice contre l'oxydation du β -carotène par les radicaux peroxydes élevée mais inférieure à celle des standards BHT et BHA. Le pouvoir inhibiteur de blanchiment du β -carotène augmente dans l'ordre suivant :

$$(B) (IC_{50}: 3.85 \mu g/mL) < (A) (IC_{50}: 3.16 \mu g/mL) < BHA (IC_{50}: 1.26 \mu g/mL) < BHT (IC_{50}: 1.24 \mu g/mL)$$

IV.2.4 Activité réductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)

L'activité antioxydante des molécules synthétisées et des standards (BHT, BHA) par réduction cuprique a été évaluée selon la méthode d'Apak *et al* [7].

Les résultats obtenus de cette activité sont représentés par les absorbances pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration à l'absorbance 0,5 ($A_{0.5}$) (tableau IV. 4)

Tableau IV. 3 : Pouvoir réducteur cuivrique(CUPRAC) exprimé en absorbance des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA

C (µg/mL) Molécule	Absorbances du test de la réduction du cuivre (CUPRAC)							
	0.39	0.78	1.56	3.125	6.25	12.5	25	$A_{0.50}(\mu g/mL)$
(A)	0,13±0.00	0,26±0.01	0,32±0.00	0,49±0.01	0,91±0.01	1,65±0.00	3,35±0.01	3.07±0.04
(B)	0,13±0.01	0,17±0.01	0,27±0.00	0,45±0.01	0,74±0.01	1,32±0.01	2,45±0.08	3.82±0.06
BHT	-	0,23±0,01	0,32±0,01	0,48±0,03	0,76±0,02	1,08±0,05	1,56±0,08	3,44±0,04
BHA	-	0,33±0,02	0,60±0,04	0,91±0,02	1,35±0,07	2,03±0,09	2,91±0,37	1,34±0,11

Sat : Saturé, - : Non Mesuré

Les résultats obtenus ont permis de tracer les courbes de variation des absorbances en fonction de la concentration des molécules testées : Absorption = f (c) (Figure IV. 4).

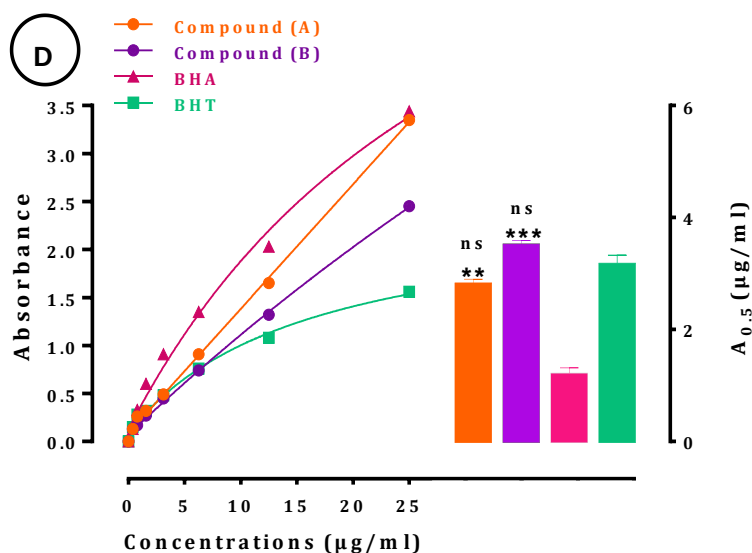


Figure IV.4 : Présentation graphique d'absorbance et des concentrations inhibitrices $A_{0.5}$ du exprimées en $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA déterminé par la méthode CUPRAC.

À partir de la Figure IV. 4, on constate que le pouvoir réducteur de tous les composés testés dépend de la concentration. L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique l'augmentation du pouvoir réducteur de l'antioxydant

L'activité antioxydante évaluée pour les produits synthétisés ainsi que les standards (contrôle positif) utilisés est exprimée en $A_{0.5}$ (concentration inhibitrice 50) ; $A_{0.5}$ est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5. Plus l' $A_{0.5}$ est faible plus la molécule est avec un potentiel antioxydant puissant.

L'ensemble des résultats de l'activité antioxydante exprimée en $A_{0.5}$ est représenté par la figure IV. 4 ci-dessus.

Selon le paramètre $A_{0.5}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure IV.4), le test CUPRAC, montrent que les molécules (A) et (B) ont d'activité proche de celle du standard BHT et inférieures à celle du standard BHA.

L'activité antioxydante établie par cette méthode suit l'ordre croissant suivant :

$$(B) (A_{0.5}: 3.82 \mu\text{g} / \text{mL}) < \text{BHT} (A_{0.5}: 3.44 \mu\text{g} / \text{mL}) < (A) (A_{0.5}: 3.07 \mu\text{g} / \text{mL}) < \text{BHA} (A_{0.5}: 1.34 \mu\text{g} / \text{mL})$$

IV.2.5 Activité réductrice de l'ion ferrique FRAP

L'activité antioxydante du pouvoir réducteur des molécules synthétisées et des standards (BHA, BHT) a été évaluée selon la méthode d'Oyaizu *et al* [8].

Les résultats du pouvoir réducteur des produits testés sont représentés par les absorbances en fonction des concentrations ainsi que les valeurs de la concentration à l'absorbance 0,5 dans le tableau IV. 5 et la figure IV. 5.

Tableau IV. 4 : Pouvoir réducteur des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA sur le fer, déterminé par la méthode FRAP

C(µg/mL) Molécule	Absorbances du test du Pouvoir réducteur de fer (FRAP)							
	0.78	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	A _{0.5} (µg/mL)
(A)	0.11±0.01	0.18±0.00	0.46±0.00	0.52±0.01	-	-	-	5.45±0.09
(B)	0.08±0.00	0.13±0.00	0.26±0.01	0.41±0.02	0.51±0.04	0.61±0.05	0.79±0.02	12.04±0.07
BHT	0.07±0.00	0.08±0.00	0.10±0.01	0.13±0.02	0.22±0.04	0.28±0.05	0.43±0.02	>50
BHA	0.09±0.00	0.11±0.01	0.18±0.02	0.36±0.04	0.78±0.07	1.74±0.07	3.53±0.19	8.41±0.67

Sat : Saturé, - : Non Mesuré

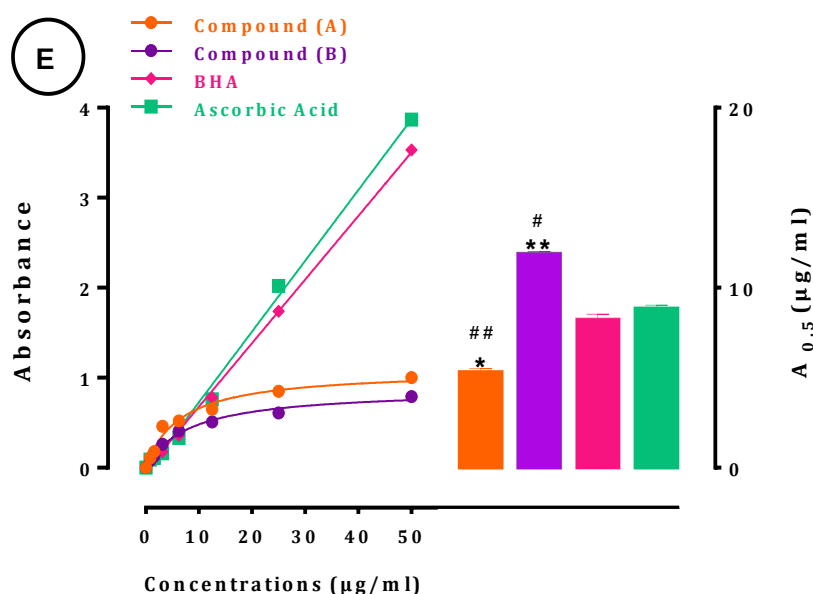


Figure IV. 5 : Présentation graphique d'absorbance et des concentrations inhibitrices A_{0.5} du exprimées en µg.mL⁻¹, (valeur moyenne ± S.D pour n=3) des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA déterminé par la méthode FRAP.

Nous remarquons d'après cette représentation graphique (Figure IV. 5), que les deux acides synthétisés (A) et (B) possèdent un pouvoir réducteur proportionnel à la concentration.

Les courbes de la figure IV. 5 ont été exploitées pour calculer les valeurs $A_{0,5}$ des produits synthétisés et comparé avec celles $A_{0,5}$ des standards utilisés BHT et BHA (Tableau IV. 5).

Les résultats obtenus par cette activité montrent que le composé (A) a le pouvoir réducteur le plus important ($A_{0,5}=5.45 \mu\text{g/ml}$) par rapport aux autres produits à testés.

Selon le paramètre $A_{0,5}$, L'activité antioxydante déterminée par le teste FRAP, suit l'ordre croissant suivant :

$$\text{BHT } (A_{0,5} : >50 \mu\text{g/mL}) < (\text{B}) (A_{0,5} : 12,04 \mu\text{g/mL}) < \text{BHA } (A_{0,5} : 8,41 \mu\text{g/mL}) < (\text{A}) (A_{0,5} : 5,45 \mu\text{g/mL}).$$

IV.2.6 Activité de la phénanthroline

Pour évaluer l'activité phénanthroline des molécules synthétisées et des standards, nous avons utilisé le protocole décrit par *Szydlowska-Czerniaka et al* [9].

La capacité réductrice des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA est exprimée par la variation de l'absorbance avec la concentration, l'ensemble des valeurs obtenues est représenté dans le tableau IV. 6 et la figure IV. 6.

Tableau IV. 5 : Pouvoir réducteur des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA sur le fer déterminé par la méthode de phénanthroline

C(μg/mL) Molécule	Absorbances du test du Pouvoir réducteur de fer (phénanthroline)							
	0,09	0,19	0,39	0,78	1,56	3,125	6,25	$A_{0,50}$ (μg/mL)
(A)	0,29±0,00	0,31±0,01	0,36±0,01	0,40±0,01	0,59±0,01	0,85±0,00	1,19±0,00	1,16±0,02
(B)	0,28±0,00	0,29±0,01	0,32±0,00	0,35±0,00	0,41±0,00	0,57±0,01	0,95±0,00	2,42±0,03
BHA	-	-	-	0,49±0,01	0,59±0,01	0,73±0,02	0,93±0,01	0,93±0,07
BHT	-	-	-	0,47±0,01	0,47±0,01	0,53±0,03	1,23±0,02	2,24±0,17

Sat : Saturé - : Non Mesuré

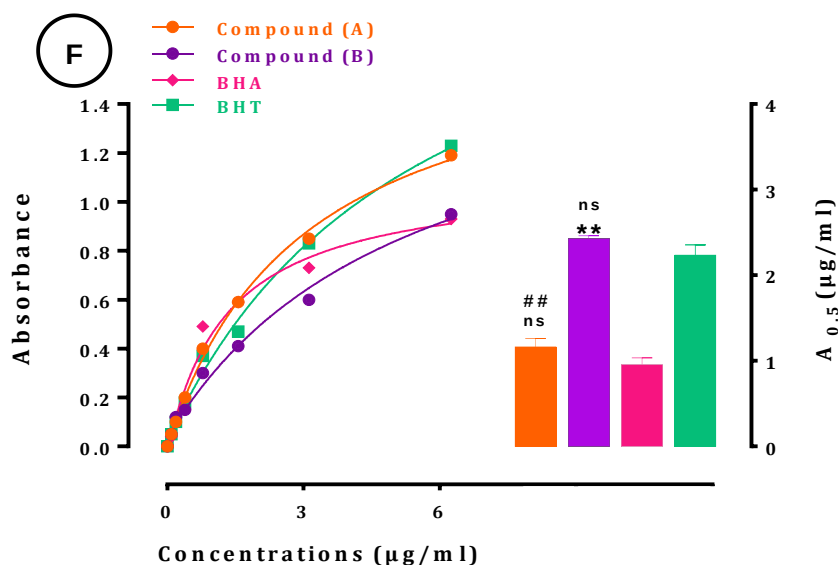


Figure IV. 6 : Présentation graphique d'absorbance et des concentrations inhibitrices $A_{0.5}$ du exprimées en $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) des molécules (A), (B) et des standards BHT et BHA déterminé par la méthode de phénanthroline.

D'après la courbe Absorption = f (c), il apparaît que le pouvoir réducteur de tous les composés testés dépend de la concentration. Il augmente avec l'augmentation de la concentration. On constate aussi que les deux acides synthétisés ont un potentiel réducteur élevé.

D'autre part, les valeurs $A_{0.5}$ des composés synthétisés et des standards ont également été calculées (figure IV. 6). Nous rappelons que la concentration effectrice $A_{0.5}$ est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5.

Enfin, l'effet de piégeage sur la phénanthroline de nos molécules testées augmente dans l'ordre suivant comme indiqué dans la Figure IV. 6 :

$$(B) (A_{0.5}: 2.42 \mu\text{g/mL}) < \text{BHT} (A_{0.5}: 2.24 \mu\text{g/mL}) < (A) (A_{0.5}: 1.16 \mu\text{g/mL}) < \text{BHA} (A_{0.5}: 0.93 \mu\text{g/mL})$$

Enfin et grâce aux résultats obtenus, nous constatons que tous les composés testés sont des agents antioxydants très puissants, car leur IC_{50} et leur $A_{0.5}$ sont tous inférieurs à 50 $\mu\text{g/mL}$. Et nous remarquons aussi que l'acide α -aminophosphinique synthétisé dans ce travail est l'antioxydant le plus puissant, comparé à l'acide α -aminophosphonique et même aux antioxydants standards les plus connus.

IV. 3 Activité anti-enzymatiques

IV. 3.1 Activité antidiabétique (anti-glucosidase)

Les inhibiteurs de l' α -glucosidase et de l' α -amylase sont utilisés pour soigner le diabète sucré car ils ralentissent la digestion des hydrates de carbone dans l'intestin grêle et diminuent donc l'augmentation rapide du taux de sucre dans le sang après un repas [10, 11]. L'effet inhibiteur des produits synthétisés sur l'enzyme α -glucosidase a été évalué selon la méthode de *Lordan et al* [12].

Les résultats sont regroupés dans le tableau IV. 7 et la figure IV. 7 ci-dessous. Elles ont été exprimées en pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (IC_{50}) par rapport à l'Acarbose utilisé comme contrôle positif.

Tableau IV. 6 : *L'inhibition de α -glucosidase (activité antidiabétique) par les molécules synthétisées (A), (B) et le standard acarbose.*

C (µg/ml) Molécule	pourcentage d'inhibition de α -glucosidase (%)							
	3,90	7,81	15.62	31.25	62.5	125	250	IC_{50} (µg/ml)
(A)	34.45±1.11	43.40±0.71	54.96±0.09	60.76±1,18	69.39±0.80	74.96±0.29	81.37±0.31	12.63±0.13
(B)	28.77±0.17	34.52±1.10	43.30±0.71	54.59±0.27	62.00±0.30	70.17±1.59	75.01±0,42	25.26±0.28
Acarbose	78,125	156, 25	312,5	625	1250	2500	5000	$IC_{50}\mu g/ml$
	27,43±2,18	38,91±3,20	54,86±1,79	67,29±2,63	80,19±1,66	85,54±0,45	91,05±0,72	275,43±1,59

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 l'acarbose $I\% = f(C)$ (figure IV. 7)

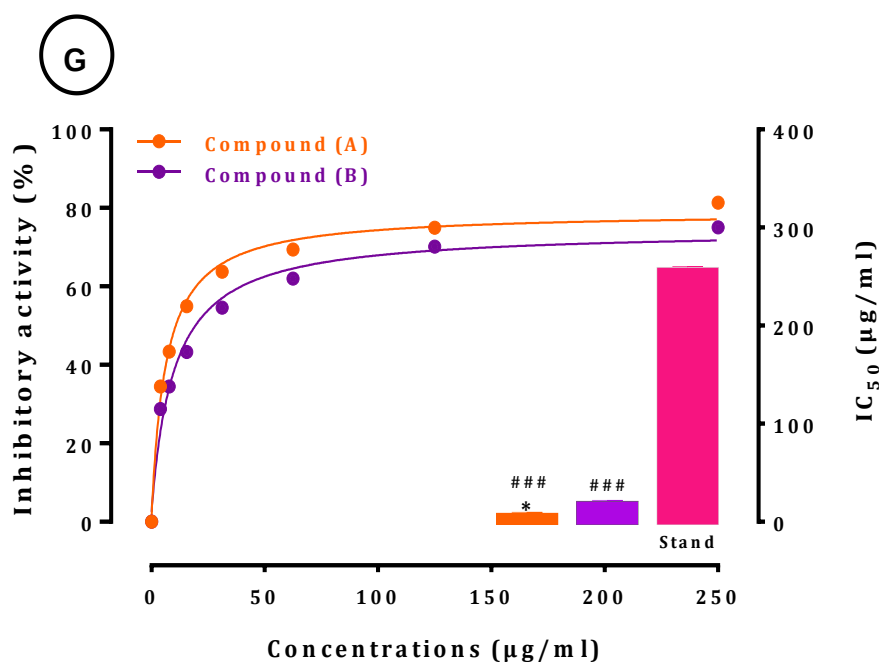


Figure IV. 7 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition et des concentrations inhibitrices IC_{50} du α -glucosidase exprimées en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) par les molécules (A), (B) et le standard acarbose.

D'après la présentation graphique, On constate que tous les produits testés montrent une certaine activité inhibitrice vis à vis de l'enzyme α -glucosidase de manière dose-dépendante.

De plus, la concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique (IC_{50}) est calculée et représentée dans la figure IV. 7 sous forme d'histogrammes.

Les résultats obtenus montrent que les deux acides synthétisés (A) et (B) ont présenté l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase la plus élevée avec des valeurs IC_{50} de 12,63 $\mu\text{g/mL}$ et 25,26 $\mu\text{g/mL}$, respectivement, encore plus élevées que l'acarbose (la valeur IC_{50} est de 275,43 $\mu\text{g/mL}$).

IV.3.2 Activité Anti-Alzheimer (anti-cholinestérase)

Les cholinestérases (ChE) jouent un rôle essentiel dans la régulation de la transmission cholinergique. L'inhibition des ChE est considérée comme un objectif thérapeutique émergent et utile pour les troubles neurodégénératifs via la restauration des niveaux d'acétylcholine dans le cerveau (par exemple, la maladie d'Alzheimer) [13]. L'activité anticholinestérasique des molécules testées a été évaluée en utilisant une combinaison de deux méthodes complémentaires : les tests d'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (BChE) et de l'acétylcholinestérase (AChE) [14].

Le pouvoir anti-Alzheimer des produits testés a été exprimé en pourcentages d'inhibition de l'AChE et le BChE pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (IC_{50}) des acides synthétisés comparée à celle de la galantamine utilisée comme contrôle positif. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure IV. 8 et IV. 9.

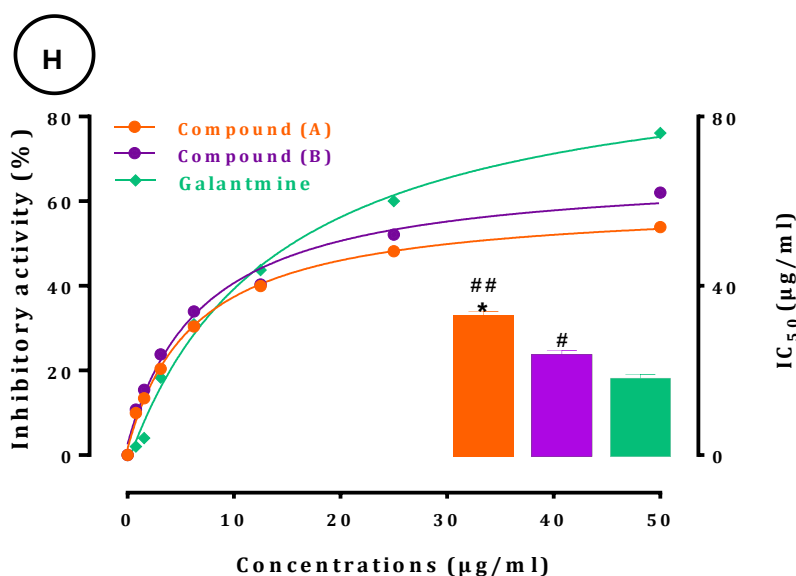


Figure IV. 8 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition et des concentrations inhibitrices IC_{50} d'acétylcholinestérase exprimées en $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) par les molécules (A), (B) et le standard galantamine.

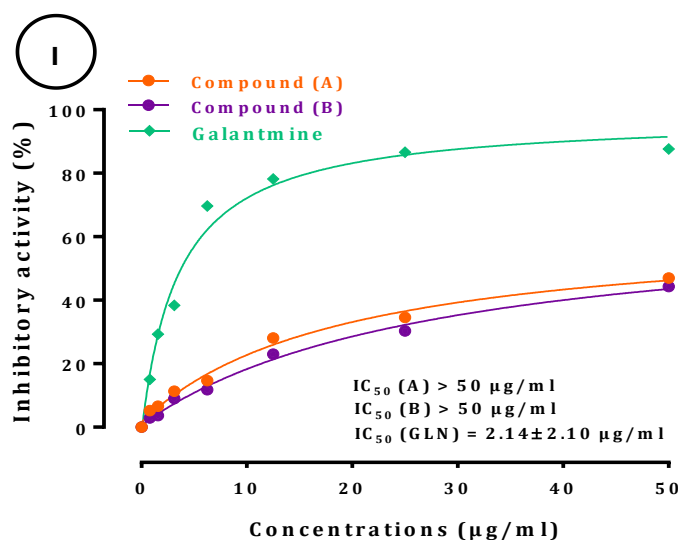


Figure IV. 9 : Présentation graphique du pourcentage d'inhibition et des concentrations inhibitrices IC_{50} du butyrylcholinestérase exprimées en $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, (valeur moyenne $\pm$ S.D pour $n=3$) par les molécules (A), (B) et le standard galantamine.

D'après la courbe $I\% = f(c)$ (figure IV. 8, IV. 9), il apparaît que l'activité inhibitrice de la BChE et de l'AChE des molécules synthétisées et de la galantamine a également augmenté avec l'augmentation de la concentration.

Les résultats obtenus ont montré que les deux acides synthétisées (A) et (B) présentaient une activité inhibitrice de la BChE modérée avec des valeurs IC_{50} de $36,71 \pm 0,95$ et $26,56 \pm 1,32$ $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Cette activité inhibitrice de la BChE est inférieure à celle de standard galantamine ($IC_{50} = 18,01 \pm 1,99$ $\mu\text{g/mL}$) alors qu'ils présentent une activité faible contre l'enzyme AChE.

Références bibliographique :

- [1] J. Javanmardi, C. Stushnoff, E. Locke, J.M. Vivanco, Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions, *Food chemistry*, 83(2003) 547-550
- [2] M.S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* 181 (1958) 1199–1200.
- [3] D. Prakash, S. Suri, G. Upadhyay, B.N. Singh, Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 58 (2007) 18–28.
- [4] 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.
- [5] S. Y. Qusti, A. N. Abo-khatwa, M. A. Bin lahwa, Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the Holly Quran, *European journal of biological sciences*. 2 (2010) 40-51
- [6] G.J. Marco, A rapid method for evaluation of antioxidants *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45 (1968) 594–598.
- [7] 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, *Journal of agricultural and food chemistry*. 52 (2004) 7970–7981.
- [8] 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.
- [9] A. Szydlowskaczerniak, 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.
- [10] C. Lankatillake, T. Huynh, D.A. Dias, Understanding glycaemic control and current approaches for screening antidiabetic natural products from evidence-based medicinal plants, *Plant Methods* 15 (2019) 2–35.
- [11] S.P. Patil, A. Goswami, K. Kalia, A.S. Kate, Plant-derived bioactive peptides: a treatment to cure diabetes, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 26 (2020) 955–968.

- [12] S. Lordan, T.J. Smyth, A. Soler-Vila, C. Stanton, R.P. Ross, The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts, *Food Chemistry*. 141 (2013) 2170–2176.
- [13] C. Bensouici, A. Kabouche, A. Karioti, M. Ozturk, M.E. Duru, A.R. Bilal, Z. Kabouche, Compounds from *Sedum caeruleum* with antioxidant, anti-cholinesterase, and antibacterial activities, *Pharmaceutical biology*. 54 (2016) 174–179.
- [14] 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.

CHAPITRE V

Modélisation Moléculaire

V.1 Introduction

La modélisation moléculaire est un ensemble de méthodes physiques théorique et de techniques informatiques [1] visant à prédire virtuellement le comportement des molécules chimiques [2]. La modélisation moléculaire implique l'utilisation des méthodes de calculs théoriques (mécanique moléculaire, dynamique moléculaire, mécanique quantique ou semi empirique, etc.) pour déterminer la représentation graphique de la géométrie ou des configurations moléculaires et pour évaluer ses propriétés physico-chimiques [3].

Dans ce travail la modélisation moléculaire a été faite par deux méthodes : La première c'est la 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 deuxième méthode est la modélisation empirique par la méthode d'amarrage moléculaire ("*docking*") à fin d'estimer l'affinité entre (l' α -glucosidase, l'AChE, la BChE et la protéase principal du SARS-CoV-2) et les molécules testées et pour analyser les interactions intermoléculaires impliquées.

V. 2 Théorie de la fonctionnelle de la densité "DFT"

De nos jours, la théorie de la fonctionnelle de la densité ou DFT est devenue un outil très pratique et puissant pour l'étude de la réactivité des molécules organiques, et pour déterminer la corrélation entre les propriétés moléculaires de ces molécules et leurs activités biologiques [4,5]. La DFT est l'une des méthodes de calcul de propriétés chimiques la plus utilisées en chimie théorique, car elle présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre, d'être prédictive sur l'ensemble des matériaux et enfin d'être utilisable sur des systèmes de très grandes tailles [6].

Les calculs de chimie quantique des acides synthétisés ont été effectués en utilisant le programme GAUSSIAN 09 W [7], et les résultats obtenus ont été visualisés à l'aide du programme GausView 5.0.8 [8]. L'optimisation géométrique des composés synthétisés a été réalisée par la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT), en utilisant les fonctions d'échange hybride à trois paramètres de Becke avec les fonctionnelles de corrélation Lee-Yang-Parr (B3LYP) avec la base 6-31 ++ (d,p) [9].

De plus, les paramètres chimie quantiques tels que le gap énergétique (ΔE_{GAP}), l'énergie d'ionisation (I), l'affinité électronique (A), les moments dipolaires (μ), la dureté (η), la mollesse (σ), l'électronégativité (χ) et l'électrophilicité (ω) ont été calculés à partir de l'énergie de la plus

haute orbitale moléculaire occupée (E_{HOMO}) et de l'énergie de la plus basse orbitale moléculaire inoccupée (E_{LUMO}) en utilisant les équations suivantes [10-12] :

$$\text{Energie gap : } \Delta E_{GAP} = E_{LUMO} - E_{HOMO} \quad [V.1]$$

$$\text{Le potentiel d'ionisation (I) : } I = -E_{HOMO} \quad [V.2]$$

$$\text{L'affinité électronique (A) : } A = -E_{LUMO} \quad [V.3]$$

$$\text{Dureté moléculaire : } \eta = (E_{LUMO} - E_{HOMO}) / 2 \quad [V.2]$$

$$\text{La mollesse moléculaire : } \sigma = 1 / \eta \quad [V.3]$$

$$\text{Electronégativité : } \chi = -(E_{HOMO} + E_{LUMO}) / 2 \quad [V.4]$$

$$\text{Indice d'électrophilicité : } \omega = \chi^2 / 2 \eta \quad [V.5]$$

V.2.1 Analyse par la théorie de la fonctionnelle de la densité

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 Optimisation des géométries moléculaires de l'acide (A) et l'acide (B)

Les structures moléculaires optimisées de l'acide [(4-Hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphinique (A), et l'acide [(4-Hydroxy-phénylamino)-phényl-méthyl] phosphonique (B) au niveau B3LYP/6-31G++(d, p), ainsi que la numérotation des atomes avec le modèle moléculaire boules-bâtonnets sont représentées par la figure V.1. Ces structures optimisées nous permettent de lancer notre calcul en vue de la détermination des paramètres descripteurs de nos différentes molécules.

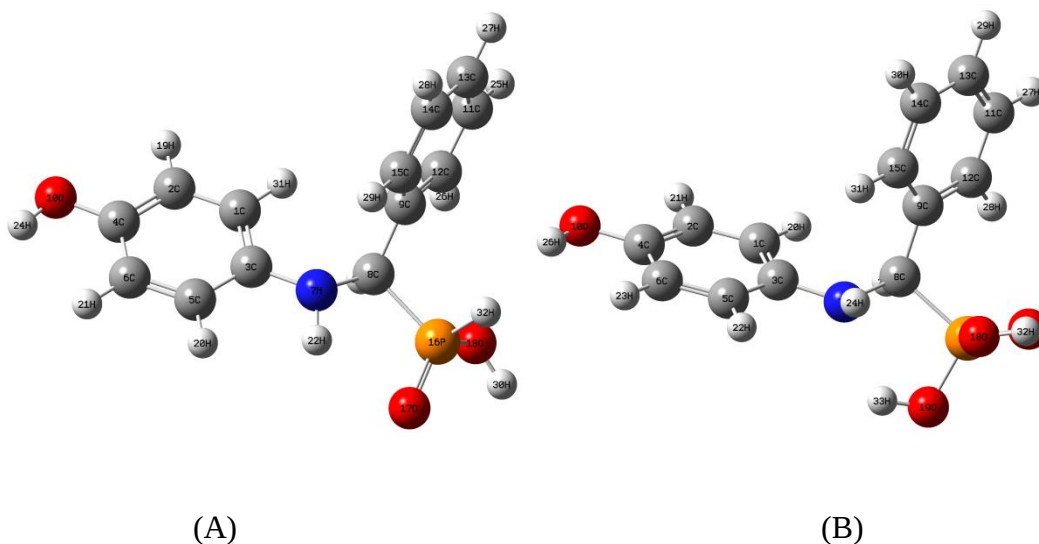


Figure V. 1 : Structures moléculaires optimisées de l'acide (A) et l'acide (B).

Les valeurs énergétiques totales calculées pour les structures optimales de (A) et (B) sont respectivement de - 30630.2165 eV, - 32678.20889 eV, ce qui indique que (B) est plus stable et moins réactif que (A), ce qui peut expliquer l'activité biologique accrue de (A) par rapport à (B). La figure V. 1 montre clairement que le remplacement du groupe fonctionnel hydroxyle (OH) du groupe phosphonique de (B) par un atome d'hydrogène dans (A) entraîne quelques modifications des paramètres géométriques de (A).

V.2.1.2 Orbitales moléculaires frontières et descripteurs de réactivité globale

Les énergies des orbitales HOMO, LUMO et l'écart énergétique ΔE_{GAP} des molécules (A) et (B) ont été calculés par la DFT avec la base 6-31G++ (d, p) et leurs valeurs sont indiquées dans le tableau V. 2. Les distributions des densités électroniques des orbitales moléculaires frontières pour les deux structures optimisées sont illustrées par la figure V. 2.

Les orbitales moléculaires frontières (FMO), y compris la plus haute orbitale moléculaire occupée (HOMO) et la plus basse orbitale moléculaire inoccupée (LUMO) jouent un rôle essentiel dans l'étude des relations structure-activité d'une molécule [13,14], 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 à donner un électron, alors que le LUMO en tant qu'accepteur d'électrons représente la capacité à accepter un électron [15].

Les résultats de l'analyse énergétique des FMO ont révélé que l' E_{HOMO} de l'acide (A) est plus élevé que celui de l'acide (B), ce qui signifie que (A) offre plus d'électrons que (B). Ce résultat peut donc être la preuve de l'activité antioxydante élevée de (A) par rapport à (B). En outre, la déstabilisation du niveau LUMO s'est avérée plus faible. Par conséquent, il pourrait s'agir d'un meilleur médicament donneur d'électrons que les autres.

La valeur calculée de ΔE_{GAP} peut clarifier les interactions d'échange de charge dans la molécule. L'écart énergétique (ΔE_{GAP}) représente l'énergie nécessaire pour exciter les électrons d'une molécule. En outre, les molécules peuvent être très réactives chimiquement, instables et facilement excitées lorsque le ΔE_{GAP} est plus petit, alors qu'elles peuvent être très stables et moins réactives chimiquement si le ΔE_{GAP} est très grand [16]. Par conséquent, le ΔE_{GAP} des molécules synthétisées devient : $\Delta E_{\text{GAP}} ((A) = 4.67110892) < \Delta E_{\text{GAP}} ((B) = 5.097783676)$, ce qui signifie que le (A) est plus réactif que le (B). Ce résultat peut confirmer l'activité antioxydante et antidiabétique élevée de l'acide (A) par rapport à l'acide (B).

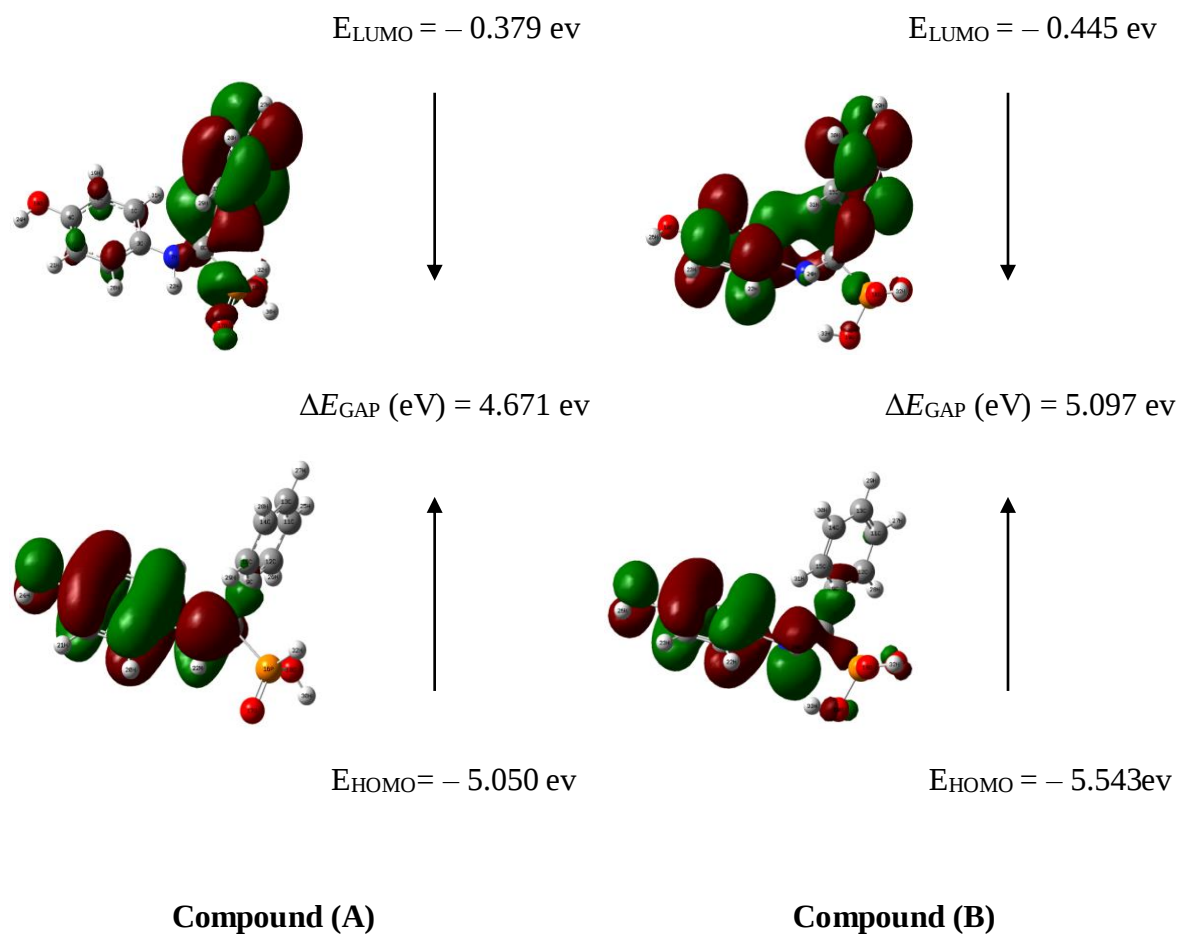


Figure V. 2 : *Distribution de la densité électronique totale des orbitales moléculaires frontières des molécules (A) et (B)*

Les énergies des FMO (LUMO et HOMO) ont été utilisées pour déterminer les descripteurs de réactivité chimique des composés étudiés notamment l'énergie d'ionisation, la dureté (η), le potentiel chimique (μ), la mollesse (S), l'électronégativité (χ) et l'indice d'électrophilicité (ω). Les valeurs obtenues de tous ces paramètres sont rassemblés dans le tableau V. 1

Tableau V. 1 : Les indices de réactivité chimique globale des molécules (A) et (B).

Quantum chemical parameters	A	B
E_{Tot} (eV)	– 30630.2165	– 32678.20889
E_{HOMO} (eV)	– 5.05043584	– 5.543506408
E_{LUMO} (eV)	– 0.37932692	– 0.445722732
ΔE_{GAP} (eV)	4.67110892	5.097783676
Energie d'ionisation (I)	5.05043584	5.543506408
Affinité électronique (A)	0.37932692	0.445722732
Moment dipolaire μ (Dyble)	4.821700	4.814800
Dureté moléculaire η (eV)	2.33555446	2.54889184
Mollesse moléculaire σ	0.428163855	0.392327357
Electronégativité χ (eV)	2.71488138	2.99461457
Indice d'électrophilicité ω	1.57790817	1.75914024

D'autre part, la réactivité chimique et la stabilité des molécules peuvent être évaluées en mesurant leur dureté et leur mollesse. Les molécules dures sont décrites par les valeurs les plus élevées de ΔE_{GAP} , tandis que les molécules molles sont exprimées par les valeurs les plus faibles de ΔE_{GAP} .

En général, la capacité des molécules à capter les électrons est démontrée par l'indice d'électrophilie (ω), qui est un autre outil efficace permettant d'examiner la réactivité des molécules organiques. La réduction des valeurs de l'indice d'électrophilie augmente la capacité des molécules à accepter les électrons. Ce résultat indique que l'acide (B) est un meilleur électrophile que l'acide (A), qui agit comme un bon électrodonneur et un nucléophile plus réactif.

En outre, la réactivité chimique d'une molécule peut être évaluée en mesurant son moment dipolaire (μ). En général, lorsque le moment dipolaire (μ) est plus petit, le composé devient plus stable ou moins réactif. D'après le tableau V. 1, le moment dipolaire (μ) (en valeur absolue) de l'acide (A) est plus élevé que celui de l'acide (B). Ce résultat indique que (A) est moins stable et plus réactif que (B). Ce résultat confirme que l'acide α -aminophosphinique est la molécule la plus réactive.

Evidemment, les présences de l'atome d'hydrogène dans la structure du (A) au lieu du groupe fonctionnel hydroxyle (-OH) du groupe phosphonique dans le (B) ont une influence sur la stabilité et la réactivité de la molécule.

V.2.1.3. Surface du potentiel électrostatique moléculaire

Les cartes du potentiel électrostatique moléculaire (MEP) sont un moyen efficace de déterminer et de comprendre les régions de réactions électrophiles et nucléophiles [17]. Pour les interactions enzyme-substrat et médicament-récepteur, le potentiel électrostatique peut être considéré comme un moyen approprié d'examiner les processus basés sur la reconnaissance entre deux molécules[18].

Les potentiels électrostatiques moléculaires ont été calculés à la géométrie optimisée avec la méthode B3LYP et la base 6-31G ++ (d, p) et peuvent être utilisés pour estimer les régions réactives des attaques électrophiles et nucléophiles pour les molécules étudiées.

Les différentes valeurs du potentiel électrostatique à la surface sont indiquées par des couleurs différentes. Les augmentations de potentiel sont classées comme suit : rouge < orange < jaune < vert < bleu. Les régions de la molécule avec des valeurs positives du potentiel électrostatique sont indiquées par une couleur bleue et sont associées à la réactivité électrophile, inversement les régions de la molécule avec des valeurs négatives du potentiel électrostatique sont indiquées par les couleurs rouge et jaune et sont associées à la réactivité nucléophile. Les couleurs verte et grise correspondent à un potentiel intermédiaire situé entre les deux extrêmes (rouge et bleu foncé). Les couleurs jaune et bleu clair divisent la différence entre la couleur moyenne (vert) et les extrêmes (rouge/bleu foncé).

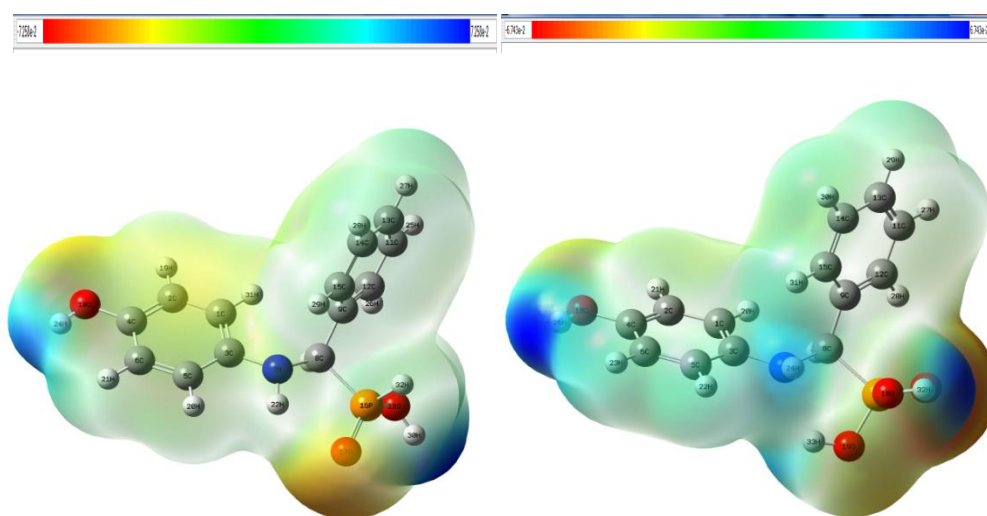


Figure V. 3 : *Potentiel électrostatique moléculaire MEP des acides (A) et (B)*

Les cartes MEP 3D calculées pour les deux molécules au moyen de la méthode DFT sont présentées dans la figure V.3. L'examen des cartes MEP obtenues montre que les zones jaunes et rouges sont situées sur les atomes O10, O17 pour la molécule (A) et sur les atomes O10, O17, O30 pour la molécule (B), ce qui prouve que ces atomes sont les sites probables des réactions électrophiles. Inversement, les couleurs verte et bleue sont observées dans la région des atomes de carbone et d'hydrogène, qui représentent les sites positifs désignés pour les réactions nucléophiles.

V.3 Docking Moléculaire

Le criblage virtuel par docking (amarrage ou arrimage) moléculaire est une nouvelle approche permet de prédire l'affinité d'un très grand nombre de ligands à visée thérapeutique donnée, plus simple à mettre en place, plus rapide à un coût moins cher que les criblages expérimentaux. Actuellement, ces approches sont devenues des étapes indispensables et essentiels dans de nombreux programmes utilisés dans la découverte de nouveaux médicaments [19].

V.3.1 Analyse par le docking moléculaire

Les calculs docking ont été réalisés avec le programme iGMDOCK version 2.1 pour prédire l'activité biologique des composés synthétisés et afin d'évaluer les interactions et les différentes liaisons formées entre les ligands synthétisés et les protéines ciblées. Les structures chimiques en 3D de (A) et (B) ont été générées et optimisées par Gaussian 09. Pour cette étude les structures cristallines des enzymes choisis (l' α -glucosidase, l'AChE, la BChE et la protéase principal du SARS-CoV-2) obtenues à partir de la base de données des protéines PDB (PDB ID : 5ZCB, 4EY6, 4BDS, 6LU7 respectivement) avec une boîte de maillage de 30×30×30 Å³ ont été sélectionnées comme récepteurs. Le logiciel *Accelry's Discovery Studio Visualizer* a été employé pour étudier le score d'affinité d'amarrage prédit des molécules synthétisées contre les enzymes ciblées et le diagramme d'interactions intermoléculaires 2D/3D entre le récepteur et les molécules étudiées.

V.3.2 Résultats du docking moléculaire

V.3.2.1 Résultats du docking moléculaire avec l' α -glucosidase

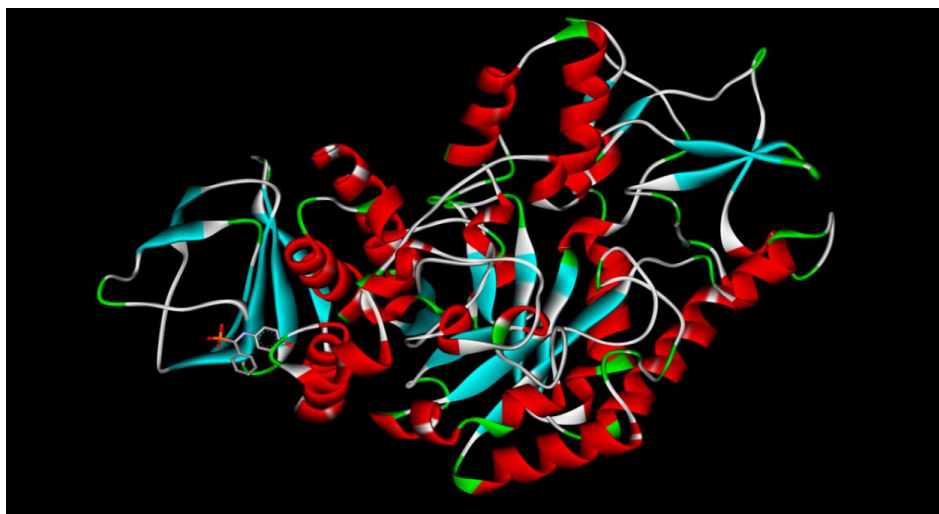
Le docking moléculaire entre les ligands synthétisés et le récepteur α -glucosidase a été exécuté pour définir la conformation appropriée des acides synthétisés dans le récepteur et

les forces secondaires qui en résultent entre ces molécules et les acides aminés actifs de récepteur.

La figure V. 4 représente les structures cristallines des meilleurs modes d'amarrage des complexes (A)-(alpha-glucosidase) et (B)-(alpha-glucosidase). D'après la figure V.4 Nous pouvons observer que le ligand préfère se lier dans la poche interne de l'enzyme alpha-glucosidase .



(A)



(B)

Figure V. 4 : *Visualisation des meilleures poses de docking des molécules (A) et (B) avec l'alpha-glucosidase*

Le paramètre le plus important parmi les paramètres obtenus à partir de l'interaction des molécules (A) et (B) avec les enzymes est l'énergie de liaison (the Binding energy), qui présente l'activité biologique la plus élevée de la molécule dont la valeur numérique est la plus négative. On utilise ce paramètre pour expliquer les résultats des calculs de docking des molécules étudiées. Les autres paramètres obtenus sont expliqués par l'interaction des molécules avec l'enzyme ciblé.

Les résultats du docking moléculaire des acides synthétisés sont rapportés dans le (Tableau V. 2) qui présente l'énergie d'interaction et les différentes interactions entre le ligand et l'enzyme ciblé.

Tableau V. 2 : *Résultats du docking moléculaire des inhibiteurs étudiés (A) et(B) avec l'alpha-glucosidase*

<i>Ligand</i>	<i>Binding energy in kcal/mol</i>	<i>Interactions</i>
(A)	- 87.87	Elc: ARG197 and HIS326 H-bonds: ARG197, GLU256, TRP288, HIS326 and ASP327 vdW: TYR63, PHE163 and ASP327
(B)	-88.10	Elc: HIS529 H-bonds: LYS453, SER455, PHE459, HIS529 and PRO532 vdW: LYS453, ASN454, PHE459, HIS529 and ASN530

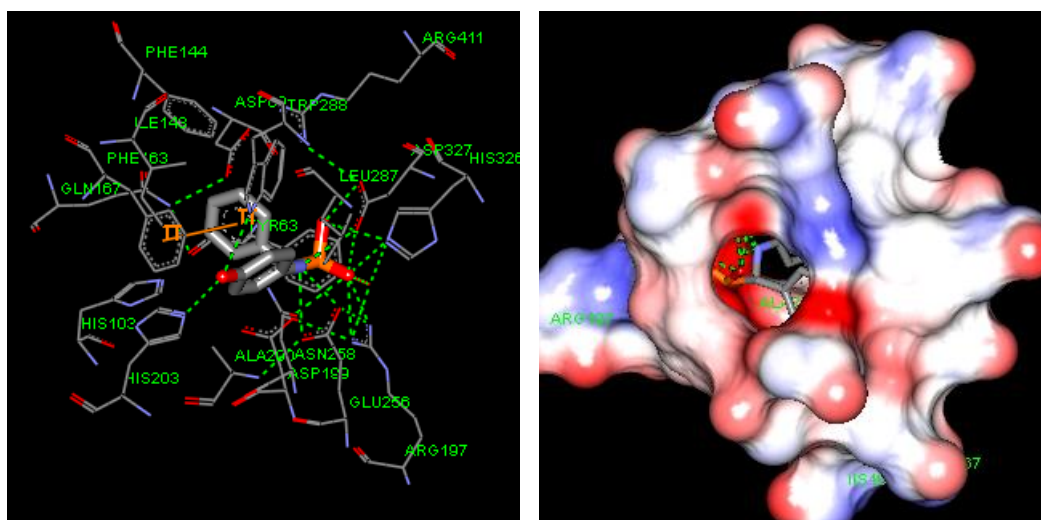
Elc: electrostatic interactions, **H-bonds:** hydrogen bonding and **vdW:** van der Waals force

Ces résultats montrent que les deux ligands (A) et (B) représentent, du point de vue énergétique, une bonne affinité avec les résidus du site actif avec une énergie de -87.87,-88.10 kcal/mol respectivement.

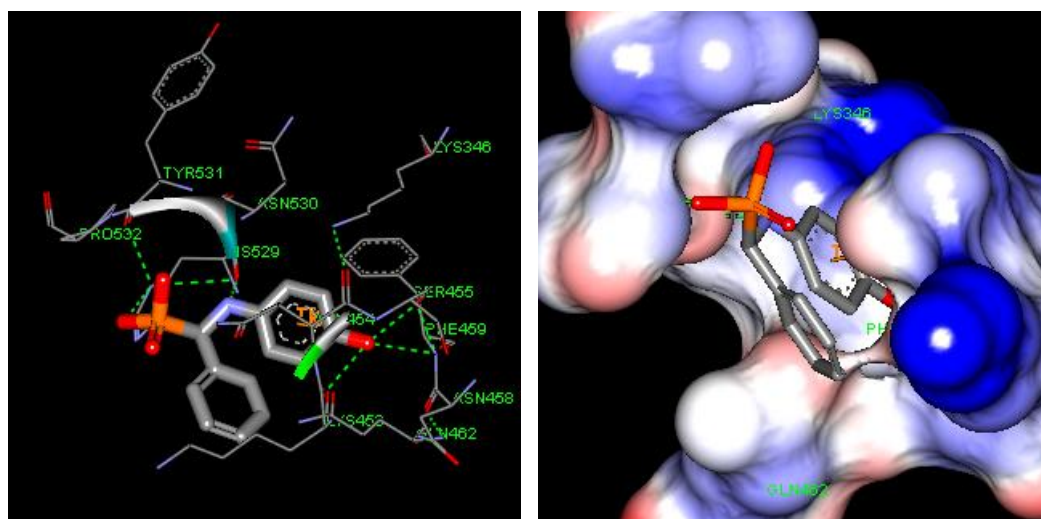
On outre, dans les calculs de docking moléculaire, le plus important élément affectant les activités biologiques des molécules est les diverses interactions des molécules formées avec les enzymes. Lorsque ces interactions augmentent, les valeurs d'activité biologique des molécules augmentent [56]. Parmi ces différentes interactions on trouve ; les liaisons hydrogène, les interactions hydrophiles et hydrophobes, les liaisons halogènes et les liaisons pi-pi.

Généralement, les interactions hydrophiles impliquent des liaisons H tandis que les interactions hydrophobes incluent des forces de *van der Waals* [8].

Les résultats obtenus par amarrage moléculaire indiquent que tous les dérivés interagissent avec l'enzyme α -glucosidase par la formation de différentes interactions de liaisons hydrogènes, Van der Waals et de liaisons électrostatiques.



(A)



(B)

Figure V. 5 : À gauche : Diagrammes d'interaction en 3D des inhibiteurs étudiés (A) et (B) avec l' α -glucosidase. À droite : les inhibiteurs étudiés à l'intérieur des sites actifs avec les interactions.

Tableau V. 3 : *Distribution d'énergie des différentes interactions entre les inhibiteurs étudiés et l'alpha-glucosidase*

Ligand	van der Waals forces	hydrogen bonding	electrostatic interactions
(A)	- 51.51	- 36.88	- 0.51
(B)	-62.13	-22.63	-3.34

La figure V. 5 et le tableau V. 3 illustrent la présentation détaillée des interactions des ligands (A) et (B) avec l'alpha-glucosidase. Ces resultats montre que l'acide phosphinique (A) se lie à l'enzyme alpha-glucosidase par des liaisons H avec les acides aminés ARG197, GLU256, TRP288, HIS326 et ASP327 et par des forces de van der Waals avec les acides aminés TYR63, PHE163 et ASP327 et par des liaisons électrostatiques avec deux acides aminés ARG197 et HIS326 Tandis que l'acide phosphonique (B) interagit par des liaisons H avec les acides aminés LYS453, SER455, PHE459, HIS529 et PRO532, et par des forces de van der Waals avec les acides aminés LYS453, ASN454, PHE459, HIS529 et ASN530 et par des liaisons électrostatiques avec l'acide aminé HIS529 .

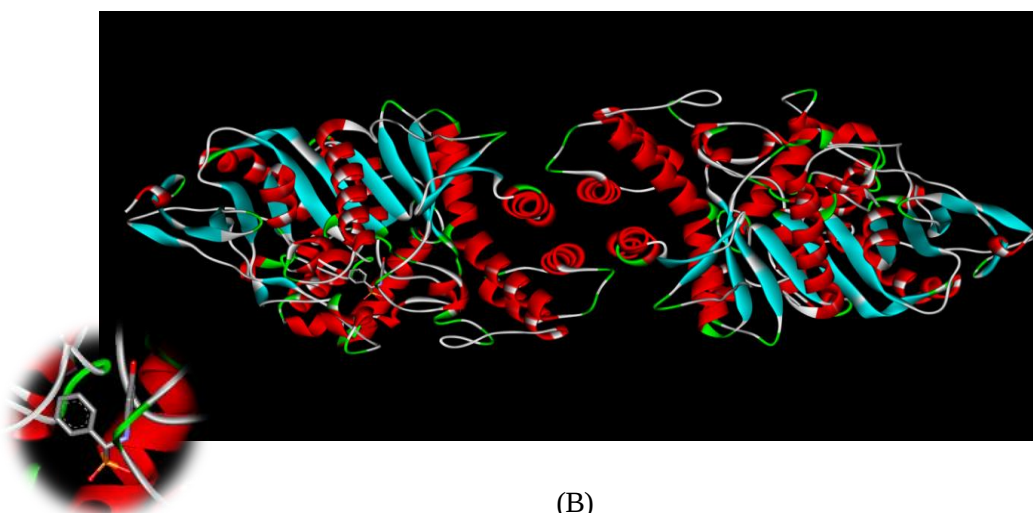
V.3.2.2 Résultats du docking moléculaire avec l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase

Une étude de docking moléculaire a été réalisée afin d'explorer les interactions des acides synthétisés dans les sites actifs de l'acétylcholinestérase (4EY6) et la butyrylcholinestérase (4BDS). 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 d'amarrage des inhibiteurs étudiés (A) et (B) avec l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase sont représentées dans les figures V. 6 et V.7 respectivement. D'après les figures V. 6 et V. 7, on peut observer que les deux ligands préfèrent se lier dans la poche interne des deux enzymes AChE et BChE.



(A)

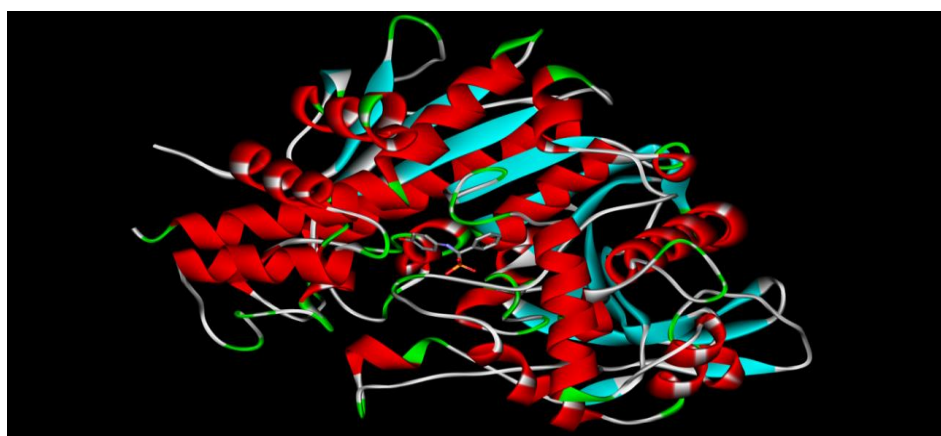


(B)

Figure V. 6 : *Visualisation des meilleures poses de docking des molécules (A) et (B) avec l'acétylcholinestérase .*



(A)



(B)

Figure V. 7 : *Visualisation des meilleures poses de docking des molécules (A) et (B) avec la butyrylcholinestérase.*

Les résultats du docking moléculaire des acides synthétisés sont rapportés dans le (Tableau V. 4) qui présente l'énergie d'interaction et les interactions formés entre le ligand et l'enzyme.

Tableau V. 4 : Résultats du docking moléculaire des inhibiteurs étudiés (A) et(B) avec l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase

Targeted Enzymes	Ligand	Binding energy in kcal/mol	Interactions
<i>Acetylcholinesterase</i>	(A)	- 97.08	H-bonds: ARG475, TYR479, ASN490, GLU491 and GLN499 vdW : ARG475, TYR479, GLU491 and PRO498
	(B)	- 100.34	H-bonds: TYR124, SER125, GLU202, TYR337 and GLY448 vdW: TRP86, GLY121, TYR337 and HIS447
<i>Butyrylcholinestera se</i>	(A)	- 75.26	H-bonds: PRO285and TRP430 vdW: TRP82,ALA328,PHE329, TYR332 and TRP430
	(B)	- 92.96	Elc: ARG242 H-bonds: ARG242, SER287and ASN397 vdW : PRO230,TRP231,GLU238, ARG242, LEU286, SER287, and VAL288

Elc: electrostatic interactions, **H-bonds:** hydrogen bonding and **vdW:** van der Waals forc

D'après ces résultats obtenus et du point de vue énergétique, il montre que nos ligands représentent, une bonne affinité avec les résidus du site actif ainsi qu'une bonne corrélation entre les résultats expérimentaux et théoriques.

En plus, Les résultats obtenus par amarrage moléculaire indiquent que les deux ligands interagissent avec les deux enzymes par la formation de diverses interactions de liaisons hydrogènes et Van der Waals et des interactions électrostatiques. Ces différents 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.

A partir des diagrammes d'interaction en 2D et en 3D présentés dans les Figures V. 8 et V.9, et les résultats regroupés dans le tableau V. 5 ci-dessous, nous pouvons observer que le

ligand (A) se lie à avec l'acétylcholinestérase par des liaisons hydrogènes avec les acides aminés ARG475, TYR479, ASN490, GLU491 et GLN499, et des liaisons de type Van der Waals avec l'ARG475, TYR479, GLU491 et PRO498 avec une énergie égale à $E = -72.32$ kcal/mol. Ainsi, le ligand (B) forme des liaisons d'hydrogènes avec les acides aminés : TYR124, SER125, GLU202, TYR337 et GLY448, et des interactions de type forces de vdW avec les acides aminés : TRP86, GLY121, TYR337 et HIS447 avec une énergie égale à $E = -80.63$ kcal/mol.

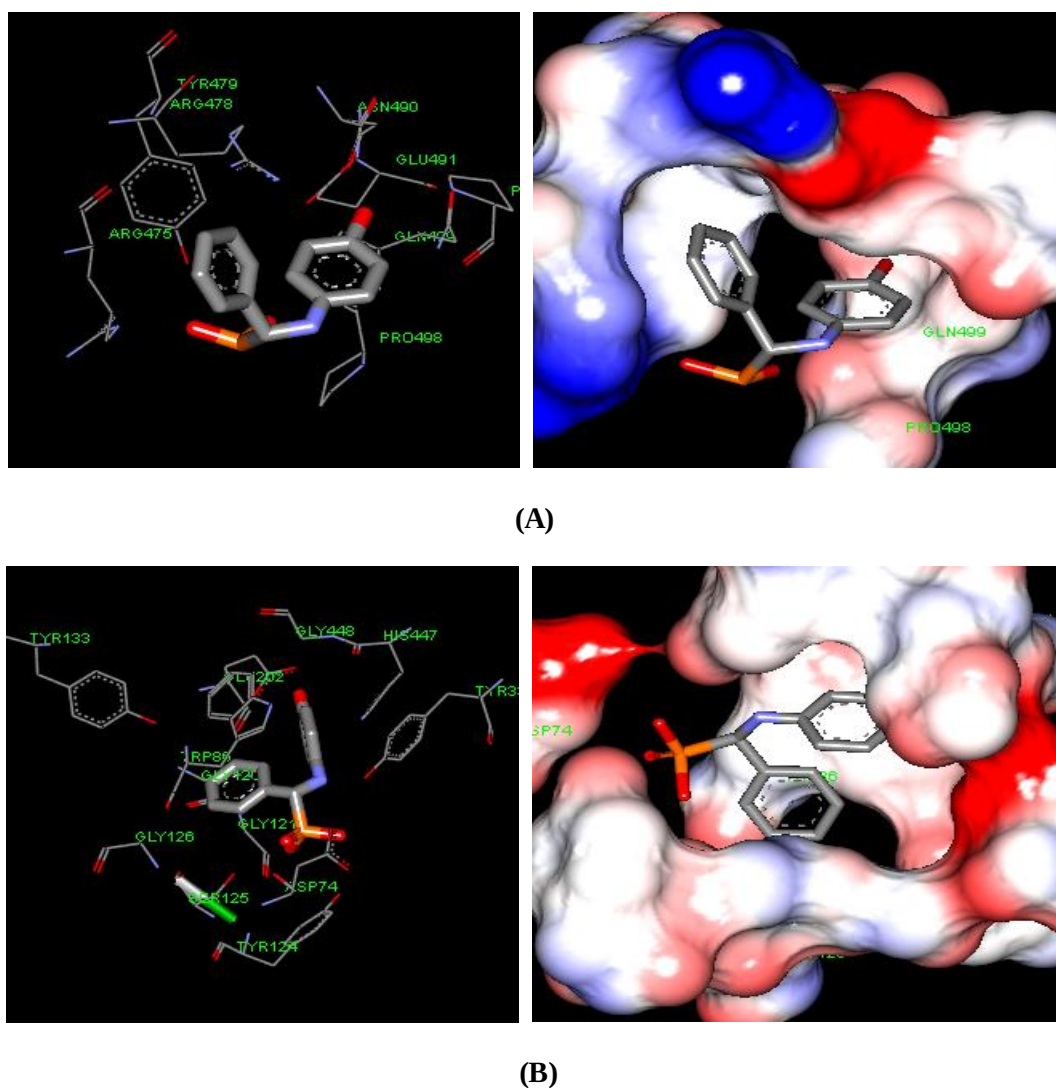


Figure V. 8 : À gauche : Diagrammes d'interaction en 3D des inhibiteurs étudiés (A) et (B) avec l'acétylcholinestérase. À droite : les inhibiteurs étudiés à l'intérieur des sites actifs avec les interactions.

En suit dans le cas de butyrylcholinestérase, le ligand (A) interagit par des liaisons H avec deux acides aminés PRO285 et TRP430 et par des forces de van der Waals avec acides aminés TRP82, ALA328, PHE329, TYR332 et TRP430 avec une énergie de -67.72 kcal/mol ,

tandis qu'le ligand (B) se connecte avec certains acides aminés : ARG242, SER287 et ASN397 par des liaisons H et avec les acides aminés PRO230, TRP231, GLU238, ARG242, LEU286, SER287 et VAL288 par des forces de van der Waals (figure V. 9) avec une énergie de -74.14 kcal/mol (Tableau V. 5).

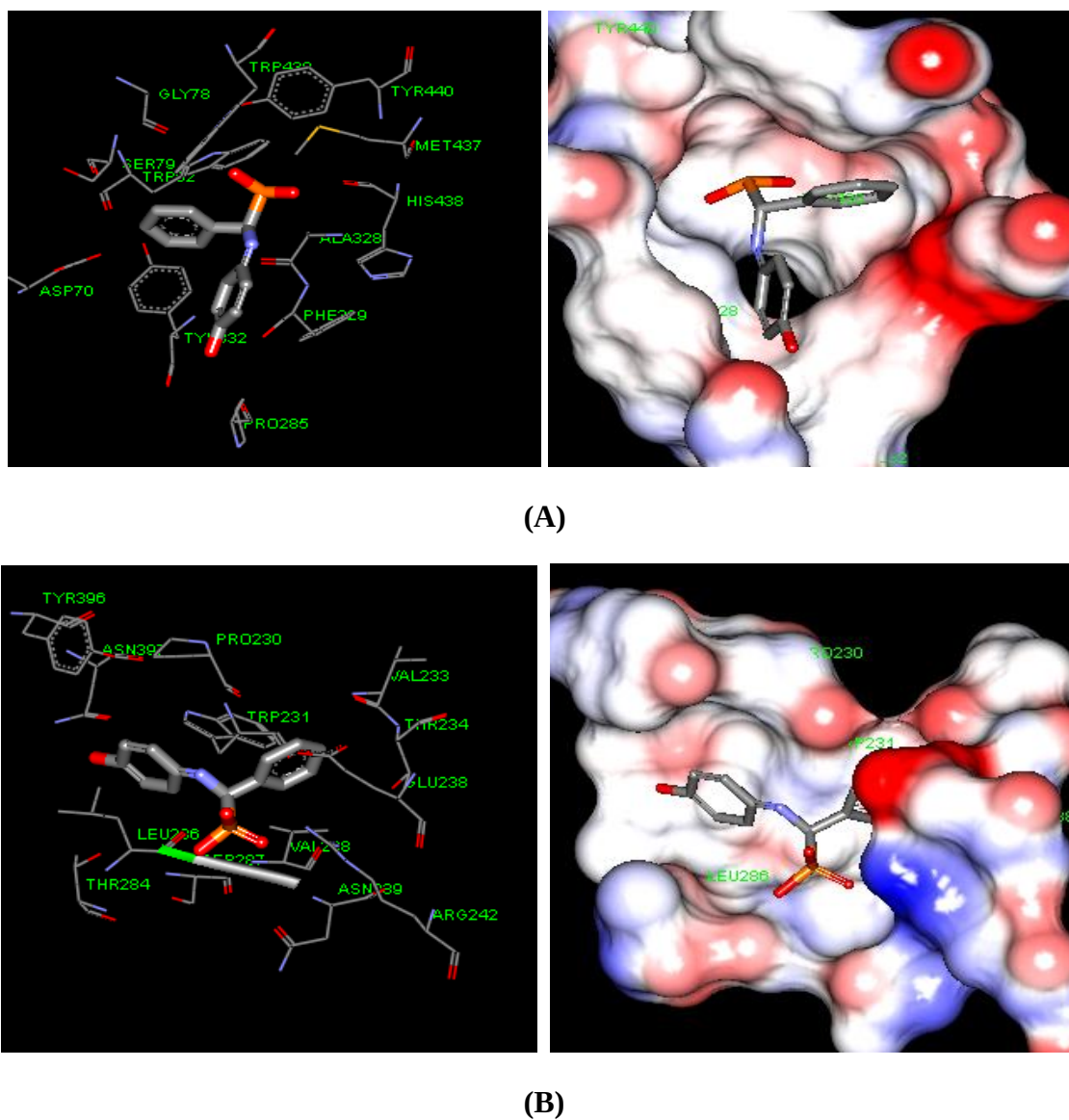


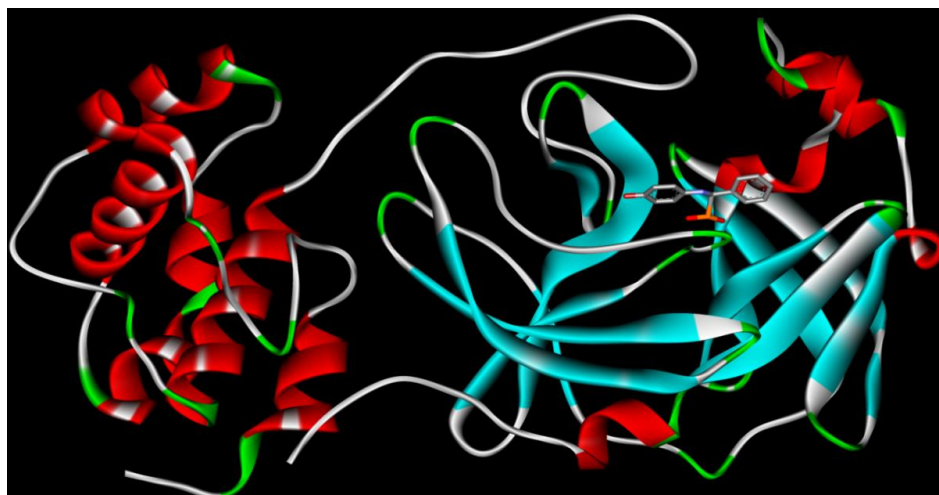
Figure V. 9 : À gauche : Diagrammes d'interaction en 3D des molécules (A) et (B) avec la butyrylcholinesterase. À droite : les inhibiteurs étudiés à l'intérieur des sites actifs avec les interactions.

Tableau V. 5 : *Distribution d'énergie des différentes interactions entre les inhibiteurs étudiés et l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase*

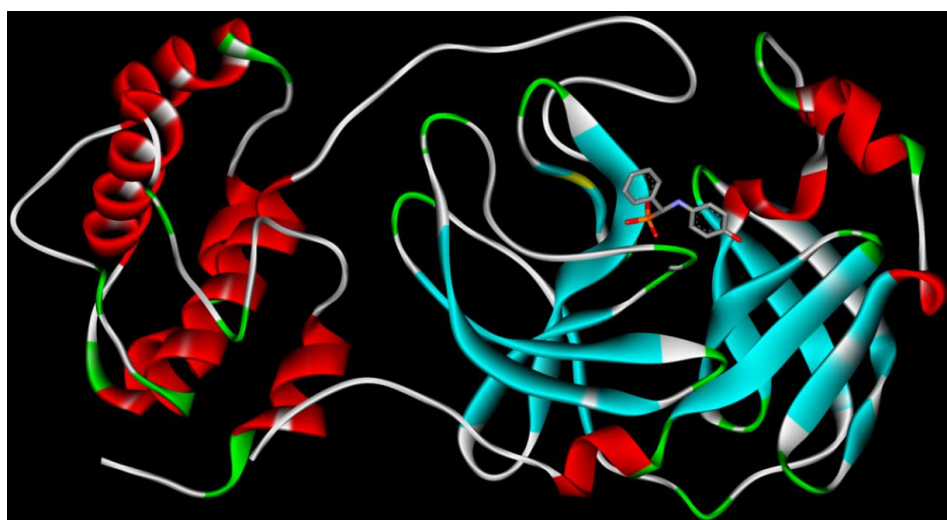
<i>Targeted Enzymes</i>	<i>Ligand</i>	<i>van der Waals forces</i>	<i>Hydrogen bonding</i>	<i>electrostatic interactions</i>
<i>Acetylcholinesterase</i>	<i>(A)</i>	- 72.32	- 23.00	- 1.76
	<i>(B)</i>	- 80.63	- 21.11	1.40
<i>Butyrylcholinesterase</i>	<i>(A)</i>	- 67.72	- 7.54	0.00
	<i>(B)</i>	- 74.14	- 16.07	- 2.47

V.3.2.3 Résultats du docking moléculaire avec la protéase principale du SARS-CoV-2

L'activité inhibitrice des molécules testées contre la protéase principale du SARS-CoV-2 (Mpro) est basée sur la formation de complexes stables et la formation de différentes interactions entre eux. La figure V. 10 montre les meilleures positions d'amarrage des inhibiteurs étudiés avec la Mpro. Les diagrammes d'interaction 3D calculés des inhibiteurs étudiés et leurs positions dans les sites de liaison de la Mpro sont également présentés dans la figure V. 11.



(A)



(B)

Figure V. 10 : Visualisation des meilleures poses de docking des molécules (A) et (B) avec la protéase principale du SARS-CoV-2

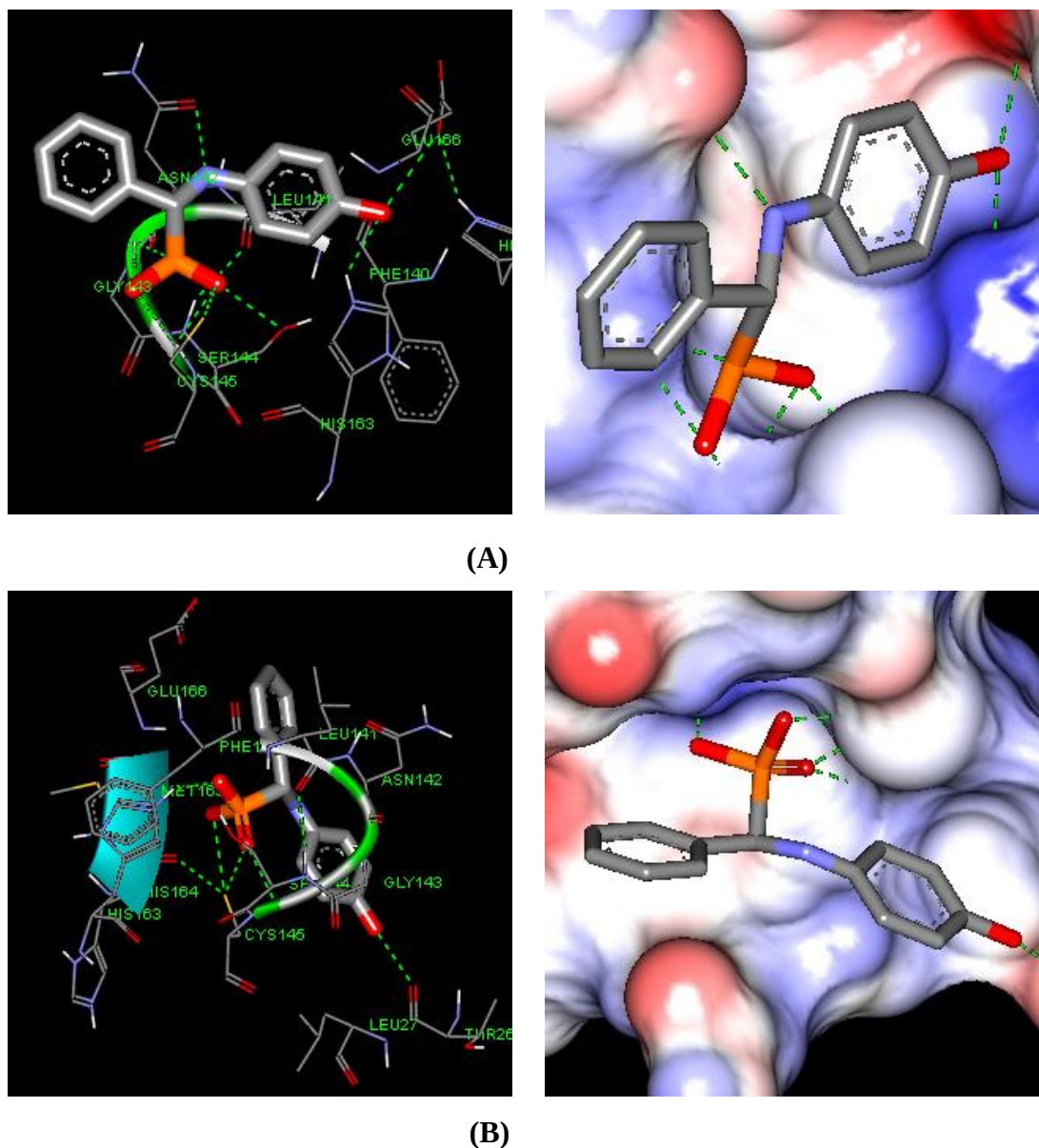


Figure V. 11 : À gauche : Diagrammes d'interaction en 3D des molécules (A) et (B) avec la protéase principale du SARS-CoV-2 : À droite : les inhibiteurs étudiés à l'intérieur des sites actifs avec les interactions.

L'interaction des composés ancrés avec la Mpro a montré une forte affinité. Les valeurs calculées de l'énergie de liaison des ligands étudiés et de certains médicaments tels que la chloroquine et l'hydroxychloroquine ont été démontrées dans le tableau V. 6. Une analyse plus approfondie de la liaison de ces composés avec la Mpro a révélé que l'acide α -aminophosphonique présentait une affinité de liaison plus élevée, comme l'indique son énergie de liaison inférieure de -99,99 (kcal/mol), suivi de l'acide α -aminophosphinique, de

l'hydroxychloroquine et de la chloroquine avec une énergie de liaison de -96,23, -86,66 et -79,45 (kcal/mol), respectivement.

Tableau V. 6 : Résultats du docking moléculaire des inhibiteurs étudiés (A) et (B) avec la protéase principale du SARS-CoV-2.

<i>Ligand</i>	<i>Binding energy in kcal/mol</i>	<i>Interactions</i>
(A)	- 96.23	H-bonds: ASN142, GLY143, SER144, CYS145, HIS163, GLU166, and HIS172 vdW: PHE140, LEU141, ASN142 and GLU166 Elc: HIS163
(B)	- 99.99	H-bonds: THR26, SER144, CYS145 and HIS163 vdW: LEU141, ASN142, GLY143, SER144 and GLU166

Elc: electrostatic interactions, **H-bonds:** hydrogen bonding and **vdW:** van der Waals forces

La figure V. 12 montre les diagrammes de liaison-interaction en 2D des inhibiteurs étudiés avec la protéase principale du SARS-CoV-2 et les types d'interactions impliqués.

La figure V. 12 et le tableau V. 6 montrent que le ligand (A) interagit par des liaisons H avec HIS163, GLY143, CYS145, des liaisons électrostatiques avec HIS163 et par des liaisons de van der Waals avec PHE140, LEU141, ASN142 et GLU166. En revanche, le ligand (B) forme des liaisons H avec HIS164, CYS143 et HIS163, et une interaction Pi-soufre entre l'anneau phénolique du ligand et HIS41. Il se plie également par des forces de van der Waals avec LEU141, ASN142, GLY143, SER144 et GLU166.

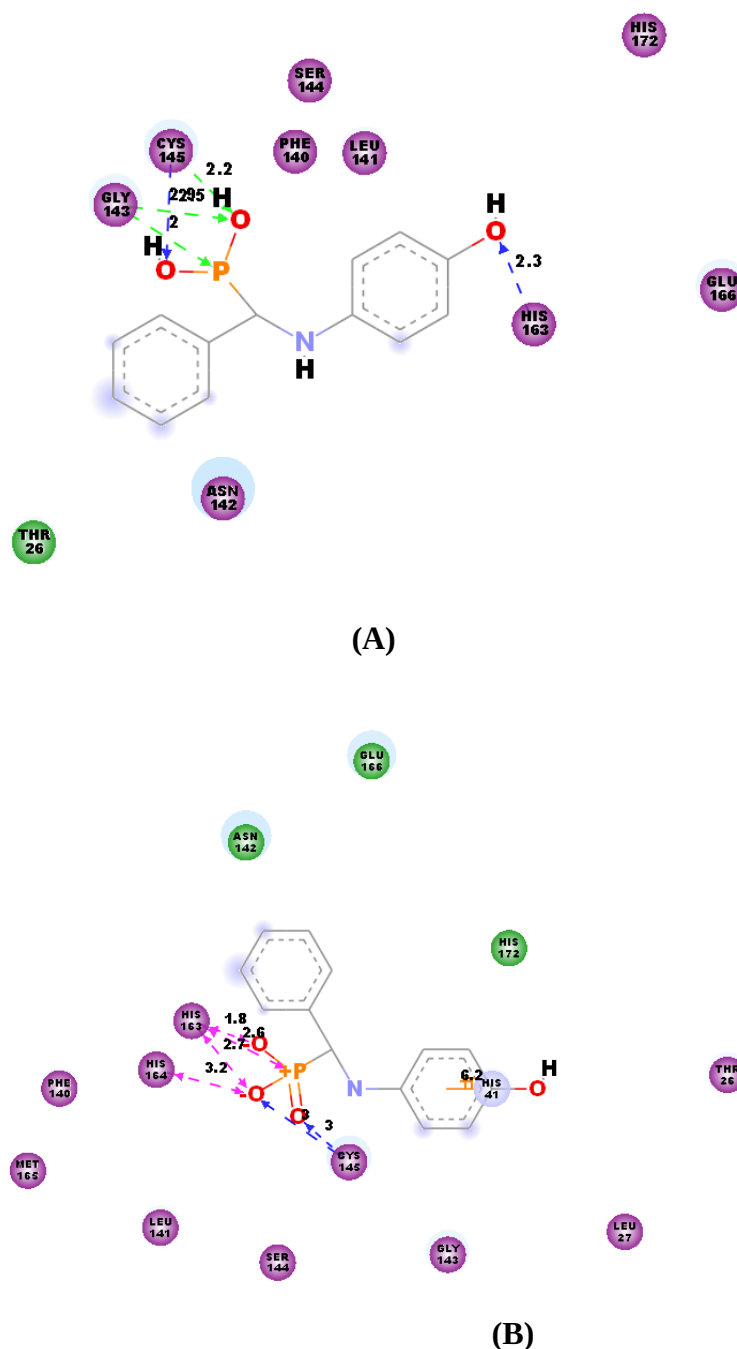


Figure V.12 : Diagrammes d'interaction en 2D des inhibiteurs étudiés avec la protéase principale du SARS-CoV-2

La distribution de l'énergie d'interaction des inhibiteurs étudiés entre les forces de van der Waals, la liaison hydrogène et les interactions électrostatiques est présentée dans le tableau V. 7. Nous observons que les forces de van der Waals ont l'énergie la plus négative, ce qui indique que ce type d'interaction est le plus dominant dans les complexes formés.

Tableau V. 7 : *Distribution d'énergie des différentes interactions entre les inhibiteurs étudiés et la protéase principale du SARS-CoV-2.*

<i>Ligand</i>	<i>van der Waals forces</i>	<i>hydrogen bonding</i>	<i>electrostatic interactions</i>
(A)	- 61.73	- 33.59	- 0.91
(B)	- 70.61	- 25.45	- 3.93

Nos résultats suggèrent que ces composés sont de puissants inhibiteurs de Mpro et qu'ils pourraient donc être utilisés pour le traitement du COVID-19, mais pour confirmer et valider ces résultats, des études in vitro et in vivo sont encore nécessaires.

Références bibliographique :

- [1] T. Uto, Y. Kodama, T. Miyata, and T. Yui, Molecular dynamics simulations of theoretical cellulose nanotube models, *Carbohydrate Polymers*. 190 (2018) 331–338.
- [2] W. Schommers, Chapter 2 - Theoretical and Computational Methods, in *Basic Physics of Nanoscience*, W. Schommers, Ed. Elsevier. (2019) 91–202.
- [3] B. G. Kwon and K. Moon, Physicochemical properties of styrene oligomers in the environment *Sci. Total Environ* .683 (2019) 216–220, Sep.
- [4] N. Houas, S. Chafaa, N. Chafai, S. Ghedjati, M. Djenane, S. Kitouni, Synthesis, characterization, DFT study and antioxidant activity of (2-hydroxy-naph-thalen-1-yl) methyl 2-hydroxyphenyl amino phosphonic acid, *Journal of Molecular Structure*. 1247 (2022) 131-322.
- [5] I. Haddadi, A. Hellal, I. Kirouani, H. Layaida, C. Bensouici, Microwave-assisted synthesis, DFT theoretical study and biological activities evaluation of two phosphonylated m-toluidine derivatives, *Journal of Molecular Structure*. 1251 (2022) 131-948.
- [6] C. Pisani, R. Dovesi, C. Roetti, Hartree-Fock ab initio treatment of crystalline systems, Springer Science & Business Media. 48 (2012).
- [7] M. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, Ga. Petersson, gaussian 09, Revision d. 01, Gaussian, Inc., Wallingford CT. 201 (2009).
- [8] R. Dennington, T. Keith, J. Millam, GaussView, Version 5, Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, (2009).
- [9] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Physical Review B*. 37 (1988) 785–789.
- [10] W. Kohn, L.J. Sham, Quantum density oscillations in an inhomogeneous electron gas, *Physical Review*. 137 (1965) A1697.
- [11] M. Arivazhagan, V.P. Subhasini, Quantum chemical studies on structure of 2-amino-5nitropyrimidine, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* . 91 (2012) 402–410.
- [12] M.S. Masoud, A.E. Ali, M.A. Shaker, G.S. Elasala, Synthesis, computational, spectroscopic, thermal and antimicrobial activity studies on some metalurate complexes, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 90 (2012) 93–108.

- [13] A.M. Asiri, M. Karabacack, M. Kurt, K.A. Alamry, Synthesis, molecular conformation, vibrational and electronic transition, isometric chemical shift, polarizability and hyperpolarizability analysis of 3-(4-Methoxy-phenyl)-2-(4-nitro-phenyl)-acrylonitrile: a combined experimental and theoretical analysis, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 82 (2011) 444–455.
- [14] B. Kosar, C. Albayrak, Spectroscopic investigations and quantum chemical computational study of (E)-4-methoxy-2-[(p - tolylimino) methyl]phenol, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 78 (2011) 160–167.
- [15] 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.
- [16] S. Fliszár, *Charge Distributions and Chemical Effects*, Springer, New York. (1983).
- [17] F.J. Luque, J.M. Lopez, M. Orozco, Perspective on electrostatic interactions of a solute with a continuum. A direct utilization of ab-initio molecular potentials for the prevision of solvent effects, *Theoretical Chemistry Accounts*. 103 (2000) 343–345.
- [18] Y. Li, Y. Liu, H. Wang, X. Xiong, P. Wei, F. Li, Synthesis, crystal structure, vibration spectral, and DFT studies of 4-aminoantipyrine and its derivatives, *Molecules*. 18 (2013) 877–893.
- [19] 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 Chemistry*. 28 (2017) e21408.

CONCLUSION

GENERALE

Conclusion générale

Dans ce travail, deux nouveaux acides α -aminophosphinique (A) et α -aminophosphonique (B) ont été synthétisés selon la réaction à trois composants de Kabachnik-Fields (one -pot) avec de bons rendements, qui sont respectivement de 89% et 85%.

La pureté des deux acides synthétisés a été vérifiée par CCM. Ensuite, les molécules obtenues ont été caractérisées par la mesure de leurs points de fusion et par les méthodes spectrales UV-Vis, ATR-FTIR, RMN de ^1H , ^{13}C et ^{31}P et spectroscopie de masse (SM).

La spectrophotométrie UV-Vis a permis de différencier et de confirmer l'obtention de nouveaux produits par le déplacement significatif de leurs bandes d'absorption par rapport aux celles caractéristiques des produits de départ.

La spectroscopie infrarouge ATR-FTIR indique la disparition des pics caractéristiques des amines primaires et l'apparition de nouveaux pics caractérisant les groupements phosphinates ou phosphonates (P=O, P-OH, P-C, P-H).

L'analyse des produits synthétisés par la spectroscopie de résonance magnétique RMN de ^1H , ^{13}C et ^{31}P et la spectroscopie de masse confirme les structures attendues.

L'évaluation de l'activité antioxydante des molécules synthétisées a été examinée *in vitro* par six différents tests : DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, phenanthroline et inhibition du blanchiment du β -carotène.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante obtenus révèlent que les molécules synthétisées possèdent une capacité antioxydante efficace et prometteuse avec des valeurs de l' IC_{50} comparables aux celles des standards BHT et BHA. En outre, l'acide α -aminophosphinique présente une activité antioxydante plus élevée que celle de l'acide α -aminophosphonique. Dans ce contexte, les valeurs de l' IC_{50} de l'activité antioxydante déterminées par les différentes méthodes sont classées par ordre croissant comme suit :

- ✓ **Test DPPH** : BHT (IC_{50} : 15.74 $\mu\text{g/mL}$) < BHA (IC_{50} : 6.55 $\mu\text{g/mL}$) < B (IC_{50} : 2.42 $\mu\text{g/mL}$) < A (IC_{50} : 2.10 $\mu\text{g/mL}$)
- ✓ **Teste ABTS** : BHT (IC_{50} : 7.54 $\mu\text{g/mL}$) < BHA (IC_{50} : 1.55 $\mu\text{g/mL}$) < B (IC_{50} : 1.46 $\mu\text{g/mL}$) < A (IC_{50} : 1.33 $\mu\text{g/mL}$)

- ✓ **Test β -carotène/acide linoléique :** B (IC_{50} : 3.85 $\mu\text{g/mL}$) < A (IC_{50} : 3.18 $\mu\text{g/mL}$) < BHA (IC_{50} : 1.26 $\mu\text{g/mL}$) < BHT (IC_{50} : 1.24 $\mu\text{g/mL}$)
- ✓ **Test CUPRAC:** B ($A_{0.5}$: 3.82 $\mu\text{g/mL}$) < BHT ($A_{0.5}$: 3.44 $\mu\text{g/mL}$) < A ($A_{0.5}$: 3.07 $\mu\text{g/mL}$) < BHA ($A_{0.5}$: 1.34 $\mu\text{g/mL}$)
- ✓ **Teste FRAP:** BHT ($A_{0.5}$: >50 $\mu\text{g/mL}$) < B ($A_{0.5}$: 12,04 $\mu\text{g/mL}$) < BHA ($A_{0.5}$: 8,41 $\mu\text{g/mL}$) < A ($A_{0.5}$: 5,45 $\mu\text{g/mL}$)
- ✓ **Test phénanthroline:** B ($A_{0.5}$: 2.42 $\mu\text{g/mL}$) < BHT ($A_{0.5}$: 2.24 $\mu\text{g/mL}$) < A ($A_{0.5}$: 1.16 $\mu\text{g/mL}$) < BHA ($A_{0.5}$: 0.93 $\mu\text{g/mL}$)

Ensuite, les effets anti-Alzheimer et antidiabétiques des molécules synthétisées ont été estimés *in vitro* en évaluant leur inhibition de l'acétyl/butyrylcholinestérase et de l' α -glucosidase, respectivement.

Les molécules testées montrent un pouvoir inhibiteur très important envers la l'acétyl/butyrylcholinestérase, et l' α -glucosidase. Donc on peut dire que les deux acides synthétisés ont une bonne et prometteuse activité anti-Alzheimer et antidiabétique.

Les paramètres de la chimie quantique tels que E_{LUMO} , E_{HOMO} , η et A obtenus par la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) sont en bon accord et se corrélient avec les valeurs des résultats expérimentaux.

Les calculs d'amarrage moléculaire "docking" ont été exécuté afin d'estimer l'affinité des molécules testées vis-à-vis l' α -glucosidase, l'AChE, la BChE et la protéase principal du SARS-CoV-2 et pour analyser les interactions intermoléculaires impliquées. Les résultats *in silico* obtenus révèlent que les acides α -aminophosphinique et α -aminophosphonique synthétisés représentent une bonne affinité à inhiber l' α -glucosidase, l'AChE, la BChE et la protéase principale du SARS-CoV-2 et peuvent se lier à ces enzymes au moyen de divers types d'interactions intermoléculaires avec les résidus des sites actifs, notamment les forces van der Waals, les interactions électrostatiques et liaisons d'hydrogènes.

PERSPECTIVES

Les perspectives envisagées au terme de ce travail de thèse peuvent être présentées comme suit :

Compléter la synthèse de la série des phosphinates et phosphonates à partir d'aminophénols substitués par des groupements actifs en positions ***ortho***, ***meta*** et ***para***

L'étude de l'activité biologique et pharmaceutique de ces deux familles, il serait intéressant de faire d'autres tests biologiques *in vitro* et *in vivo* telles que l'activité anti-inflammatoire, antivirale, anticancéreuse, anti tumorale...etc, pour valoriser le travail.

L'étude de toxicité des molécules synthétisées par des tests *in vitro* et *in vivo* pour confirmer leurs propriétés thérapeutiques et leur disposition à être administrés chez l'être humain

ملخص : في هذا العمل، تم إصطناع اثنين من أحماض ألفا-أمينوفوسفونيك (أ) وأمينوفوسفونيك (ب) جديدين من خلال تفاعل "كاباتشنيك" ثلاثي المكونات وحيد المرحلة مع عوائد جيدة. تم استخدام الأشعة فوق البنفسجية المرئية و الأشعة تحت الحمراء و الرنين المغناطيسي و المطياف الكتلي لتحديد المركبات التي تم الحصول عليها في المختبر، كما تم أيضا تقييم خواصهما المضادة الأكسدة و المضادة للسكري و المضادات للزهايمر. أيضا تم تحديد المعلمات الكيميائية الكمية في الأشكال الهندسية المحسنة باستخدام نظرية الكثافة الوظيفية لفهم العلاقة بين النشاط البيولوجي للمركبات التي تم فحصها و بنيتها الجزيئية. في الأخير تم تدعيم الدراسة التجريبية بدراسة طريقة الالتحام الجزيئي لتقدير التقارب بين (إنزيم ألفا-جلوكوزيداز ، وإنزيم الأسيتيل كولينستريز و البتيريل كولينستريز و البروتياز الرئيسي لفيروس كورونا المستجد) و المركبات التي تم فحصها. بينت الدراسة التجريبية و النظرية أن الجزيئات المحضرة تملك نشاطا بيولوجيا هاما و خواصا صيدلانية متميزة و واعدة.

الكلمات المفتاحية : حمض ألفا-أمينوفوسفونيك؛ حمض ألفا-أمينوفوسفونيك؛ إصطناع عضوي؛ مضادات الأكسدة؛ مضادات السكري؛ مضادات الزهايمر؛ الالتحام الجزيئي؛ كوفيد-19؛ DFT .

Abstract : In this work, two new α -aminophosphinic (**A**) and α -aminophosphonic (**B**) acids were synthesized through a one-pot three-component reaction of Kabachnik-Fields with good yields. The UV-Vis, FT-IR, NMR and mass spectroscopies have been used to identify the obtained compounds and confirm their structures. The achieved molecules were screened *in vitro* for their antioxidants, anti-diabetic and anti-Alzheimer's activities. Also, the quantum chemical parameters have been determined at the optimized geometries using the density functional theory (DFT) method to understand the correlation between the biological activity of the investigated compounds and their molecular structures. Finally, the molecular docking study was used to estimate the affinity between (α -glucosidase, AChE, BChE and SARS-CoV-2 main protease) and the investigated compounds. The experimental and theoretical results show that the synthesized molecules possess important biological activities and promising pharmaceutical properties.

Keywords: α -aminophosphinic acid; α -aminophosphonic acid; Synthesis; Antioxidant; Anti-diabetic; Anti-Alzheimer's; Molecular docking; COVID-19; DFT. .

Résumé : Dans ce travail, deux nouveaux acides α -aminophosphinique (**A**) and α -aminophosphonique (**B**) ont été synthétisés via la réaction à trois composants en une seule étape de Kabachnik-Fields avec de bons rendements. Les spectroscopies UV-Vis, FT-IR, RMN et la spectroscopie de masse ont été utilisées pour identifier les composés obtenus et confirmer leurs structures. Les molécules obtenues ont été examinées *in vitro* pour leurs activités antioxydantes, antidiabétiques et anti-Alzheimer. En outre, les paramètres chimiques quantiques ont été déterminés aux géométries optimisées à l'aide de la méthode de la théorie fonctionnelle de la densité (DFT) pour comprendre la corrélation entre l'activité biologique des composés étudiés et leurs structures moléculaires. Enfin, l'étude de docking moléculaire a été utilisée pour estimer l'affinité entre l' α -glucosidase, l'AChE, le BChE et la protéase principale du SARS-CoV-2 et les molécules testées. Les résultats expérimentaux et théoriques montrent que les molécules synthétisées possèdent des activités biologiques importantes et des propriétés pharmaceutiques prometteuses.

Mots clés : Acid α -aminophosphinique ; Acid α -aminophosphonique ; Synthèse ; Antioxydant ; Antidiabétique, Anti-Alzheimer ; Docking moléculaire ; COVID-19 ; DFT.