

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biochimie

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème

*Etudes comparative des activités biologiques des
dérivé de chromène synthétiser*

Présenté par :

- KHALED Meriem
- KENANA Nessrine

Devant le jury composé de :

- Présidente : BOUGUERIA Hassiba
- Examineur: CHEKROUD
- Promotrice : MERZOUGI Soraya

Centre université Mila
Centre université Mila
Centre université Mila

Année Universitaire: 2021/2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciement

*Je remercie tout d'abord **ALLAH** le tout puissant de m'avoir donné la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*On tient à remercier très sincèrement **Dr. MERZOUGI Soraya** enseignante au Centre Universitaire de Mila. notre promotrice d'avoir accepté de nous encadrer, nous la remercions également pour sa disponibilité, sa patience et pour son degré d'implication dans ce travail. Nous vous remercions aussi pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail. Nous vous prions, d'accepter dans notre reconnaissance et de notre sincère respect.*

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui vont juger notre travail le témoignage de notre haute considération, de notre profonde

Président: Dr . BOUGUERIA Hassiba

Et L'examineur : Dr . CHEKROUD

*Nous avons eu la chance d'effectuer ce travail de recherche dans le Laboratoire d'analyses à ferjiwa avec le **Dr Merouh H**, nous le remercions pour son aimable accueil et son soutien.*

Nous adressons notre remerciements A toute l'équipe de laboratoire de Biologie au niveau du Centre université A. Elhafidh Boussouf Mila

Un Grand MERCI à tous nos enseignants de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie qu'ont participé à notre formation



Dédicace

A mes parents et ma famille qui ont toujours cru en moi et qui m'ont souvent soutenu Moralement dans la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de mon profond Remerciement.

À mon père Pour le gout à l'effort qu'il a suscité en moi de par sa rigueur

À ma mère que dieu ait pitié d'elle qui grâce a elles ont atteint ce niveau

A tante HADA qui ma dédommagé pour ma mère a ma chère sœur AYA et mon frère ZAKI qui n'ont jamais hésité de m'encourager.

Je vous dis merci :

A mon binôme Meriem qui m'avez toujours soutenu et encouragée durant ces années d'études

NESRINE



Dédicace

Je dédie cette thèse à :

*À ma famille elle qui m'a doté d'une éducation
digne, son amour a fait de moi ce que je suis
aujourd'hui particulièrement :*

*À mon père SAMIR Pour le gout à l'effort qu'il a
suscité en moi de par sa rigueur*

*À toi ma mère ZAHIA Ceci est ma profonde
gratitude pour ton éternelle amour, que ce
document soit le meilleur cadeau que je puisse
t'offrir*

*À vous mes frères SALAH et FARES qui ma
soutenu et encouragée durant ces années d'études*

*A mon binôme NESRINE qui m'avez toujours
soutenu et encouragée durant ces années d'études
Et à tous ceux que j'aime
Merci.*

MERIEM

Liste des abréviations

- **AAPH:** 2,2 -azo-bis -2 amidopropanedichlorhydrate
- **Abs:** Absorbance
- **ABTS:** Sel d'ammonium de l'acide 2,2-azinobis-(3ethylbenzothiazoline-6-sulfonique).
- **A4NphHcc:**2-amino-4-(4-nitrophenyl)-4H-chromene-3-carbonitrile
- **ANNphHcc:**2-amino-8-nitro-(4-nitrophenyl)-4H-chromène-3-carbonitrile
- **A2NphHcc:**2-amino-4-(2-nitrophenyl)-4H-chromène-3-carbonitrile
- **ANNphHcc:**2-amino-8-nitro--4-(2-nitrophenyl)-4H-chromene-3-carbonitrile
- **AchphHcc:**2-amino-4-(4-chlorophenyl)-4H-chromene-3-carbonitrile
- **AchphNHcc :** 2-amino-4-(4-chlorophenyl)-8-nitro--4H-chromene-3-carbonitrile
- **Ac:** Absorbance de l'échantillon de contrôle
- **As :** Absorbance de l'échantillon d'essai.
- **AVK :** Anti-vitamines K
- **ASC :** Acide ascorbique
- **C°:** Degré Celsius
- **CI50 :** Concentration inhibitrice à 50%
- **[] :** Concentration
- **CuCl₂ :** Chlorure de cuivre(II)
- **DPPH :** 2 ,2-diphényle -1-picryl hydrazyl
- **ERO :** Les espèces réactives de l'oxygène
- **FRAP:** Ferricreducing-antioxydant power
- **g :** Gramme
- **g/l :** Rapport gramme par litre
- **g/mol** Rapport gramme par mol
- **H :** Hydrogène
- **I % :** Pourcentage d'inhibition

Liste des abréviations

- **K₂S₂O₈** : Persulfate de potassium
- **Mg** : Milligramme
- **Min** : Minute
- **ml** : Millilitre
- **nm** : Nanomètre
- **mg/ml** : Rapport milligramme par millilitre
- **O** :Oxygen
- **ORAC** :Oxygen Radical Absorbance Capacity
- **PI** : Pourcentage d'inhibition
- **PH** : Potentiel d'hydrogène d'échantillon de contrôle
- **%INH**: Pourcentage d'inhibition
- **%** : Pourcentage
- **Rpm** : Rotation par minute
- **RL** : Radicaux libre
- **S** : Seconde
- **T** Temps
- **TRAP** : Total radical-trapping antioxydant paramètre
- **TCK** : Temps de céphaline kaolin
- **TP** : Taux ou Temps de prothrombine.
- **TQ** :Temps de Quick
- **UV**: Ultra violet
- **V** : Volume
- **µl** : Microlitre

Liste des figures

Figure N°	Titre
01	Les dérives des benzopyrane
02	Structure de chromène
03	Formule (I) de chromène
04	Addition énantiosélectivités en tandem oxa-Michael FC alkylation de phénols avec des α -cétoesters
05	Réaction en cascade d'alkylation/cyclisation FC asymétrique organocatalytique de 2-naphtols avec des α -cétoesters -insaturés
06	Réaction en cascade d'alkylation/cyclisation FC asymétrique organocatalytique de 1-naphtols avec aldéhydes α β -insaturés.
07	Synthèse de chromanes modifiés
08	Alcoylation/cyclisation FC énantiosélective de type domino Michael de 2-Naphtols avec des acide salkylidènes de Meldrum
09	Réaction de réduction de DPPH
10	Réaction de réduction de l'ion ferrique Fe^{+3}
11	Schéma des concepts actuels sur le processus de coagulation
12	Schéma simplifié de la cascade de coagulation
13	A : La synthèse, B : les mesures de points de fusion
14	Principe de test de DPPH
15	Préparation de la solution DPPH

Liste des figures

16	La préparation des solutions mères
17	A Préparation des différentes Concentrations et l'aoutement de Solution DPPH, B L'appareil de spectrophotomètre UV-Visible
18	Courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d'AchphHcc
19	Courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d'AchpNHcc
20	Courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d'ANphHcc
21	Courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d'ANNphHcc
22	Etapes de préparation d'un pool de plasmadé plaquettes
23	Réactifs préparé pour l'évaluation Ade TCK

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre
01	Différentes sources d'antioxydants dont dispose l'organisme pour répondre aux situations de stress oxydant
02	Facteurs de la coagulation
03	Listes des produits synthétisées
04	Les différentes concentrations de produit
05	Le résultat spectrophotométrique des différentes concentrations d'AchphHcc
06	Le résultat spectrophotométrique des différentes concentrations d'AchphNHcc
07	Le résultat spectrophotométrique des différentes concentrations d'ANphHcc
08	Le résultat spectrophotométrique des différentes concentrations d'ANNphHcc
09	Les différentes concentrations inhibitrice C50% des dérivées chromène (Produit synthétisé)
10	Temps de céphaline-Kaolin de différente concentration d'ANphHcc
11	Temps de céphaline-Kaolin de différente concentration d'ANNphHcc
12	Temps de céphaline-Kaolin de différente concentration d'AchphHcc
13	Temps de céphaline-Kaolin de différente concentration d'AchphHcc
14	Temps de céphaline-Kaolin de différente concentration d'A4NphHcc
15	Temps de céphaline-Kaolin de différente concentration d'ANNphHcc
16	Le Temps de Quick de différente concentration d'ANphHcc

Liste des tableaux

17	Le Temps de Quick de déférente concentration d'ANNphHcc
18	Le Temps de Quick de déférente concentration d'AchphHcc
19	Le Temps de Quick de déférente concentration d'AchphNHcc
20	Le Temps de Quick de déférente concentration d'ANphHcc
21	Le Temps de Quick de déférente concentration d'ANNphHcc

Table Des Matières

Remerciement	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Sommaire	
Introduction Générale	

Parti 01 : Rappel bibliographique

Chapitre01: Les dérivés de Chromène

I. Introduction.....	03
II. Les chromènes.....	04
II.1. Lesdérivés de chromène.....	05
II.2. Voies synthétiques vers les chromènes.....	05

Chapitre02: L'activité antioxydante

I.Définition.....	09
II.Classification des antioxydants.....	09
III.Méthodes de dosage de l'activité antioxydant.....	10
III.1.Test au DPPH.....	10
III. 1.1. Principe.....	10
III.1.2. Dosage.....	11
III.2. Test de la réduction du fer FRAP.....	11
III. 2.1. Principe.....	11
III.2.2. Dosage.....	12
III.3. Méthode de TRAP.....	13
III.3.1. Principe.....	13
III.3.2. Dosage.....	13

III .4. Réduction du radical- cation ABTS ou détermination du TEAC.....	13
III.4.1. Principe.....	13
III.4.2. Dosage.....	14
III. 5. Test ORAC	14
III.5.1. Principe.....	14
III.5.2.Dosage.....	15
III.6. Méthode de la xanthine oxydase.....	16
III.6.1. Principe.....	16
III.6.2. Dosage.....	17

Chapitre 03: Activité anticoagulante

I. Coagulation.....	18
II. La coagulation plasmatique.....	19
III. Synthèse des protéines de la coagulation.....	19
IV. Facteurs de la coagulation.....	19
V. Le déroulement de la coagulation.....	20
V.1. La voie endogène ou intrinsèque.....	20
V.2. La voie exogène ou extrinsèque.....	21

Parti 02 :Etude EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 : La synthèse des dérivées de 2-amino-4-phenyl-4H chromene-3-carbonitrile

I.Introduction.....	22
II.Méthodes et matériels.....	22
III.Résultat.....	23
IV.Conclusion.....	25

Chapitre II Evaluation de l'Activité Antioxydant

I.Introduction.....	26
II.Principe de la méthode.....	26
III.Mode opératoire.....	27

III.1. Matériel et réactifs.....	27
III.2. Méthode.....	27
III.2.1. Préparation de la solution DPPH.....	27
III.2.2. La préparation de la solution mère.....	27
III.2.3. Préparation des dilutions des produits synthétisés.....	28
III.2.4. Les mesures spectroscopiques.....	29
III.3. Résultats et discussion.....	29
III.3.1. Résultats.....	29
III.3.2. Discussion.....	34

Chapitre : III Activité anticoagulants

I.Introduction.....	35
II.Le matériel et les réactifs.....	35
III. Méthode.....	35
III.1. Préparation de différentes concentrations de chaque produit.....	35
III.2. Préparation du pool plasmatique.....	36
III.3.Méthode d'évaluation d'activité anticoagulante.....	36
III.3.1. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.....	36
III.3.2. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène.....	37
IV. Résultats et discussion.....	38
IV .1.Résultats.....	38
IV.1. 1. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.....	38
IV.2.2. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.....	40
IV.2.Discussion.....	42
ConclusionetPerspectives.....	43
Références bibliographique.....	44

ملخص

Abstract

Résumé



INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les composés organiques existent dans la nature surtout dans le règne végétal qui a fourni ces composés d'actions multiples avec des effets biologiques tels que, les vitamines, les alcaloïdes, les flavonoïdes, dans ce contexte, la chimie organique et médicinale des composés polyhétérocycliques a connu une attention considérable par plusieurs recherches. Les effets bénéfiques sont démontrés par la diversité de leurs structures de base, tels que le benzo-pyranone et les composés spiro, ce qui a donné naissance à la sélection de certaines familles biologiques intéressantes comme les chromène, les chromons, les chromanones, les pyrazoles, Les spirolactones...etc., qui sont des composés de type naturel les plus étudiés actuellement¹.

Une méthode verte en une seule étape, douce et respectueuse de l'environnement a été développée pour la synthèse de composés hétérocycliques biologiquement actifs, dans des conditions sans solvant à température ambiante par broyage. La procédure est efficace, gain de temps et donne des rendements considérables.

Par conséquent, Notre travail s'articule en deux parties :

Partie 1 :

Consiste en une rappelle bibliographique consacrer à 3 chapitres :

- ✚ Le premier chapitre donne un aperçu général sur les dérivés de chromène
- ✚ Le deuxième chapitre constitué l'activité antioxydant
- ✚ Le troisième chapitre donne quelques informations sur l'activité Anticoagulante.

Partie 2 :

Expérimentale, consacrée à la présentation de nos travaux personnels :

- ✚ le matériel et les différentes méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail
- ✚ La première étape comprend la synthèse des dérivées de 2-amino-4-phenyl-4H-chromene-3-carbonitrile à partir des réactifs tels que : phénol, l'ortonitrophénole, benzaldéhyde et déférente aldéhyde dans le but d'obtenir des nouveaux produits synthétisés comme 2-amino-4-(4-nitrophenyl) -4H-chromene-3-carbonitrile et 2-amino-8-nitro-(4-nitrophenyl)-4Hchromene-3-carbonitrile ...ect
- ✚ La deuxième étape consiste à évaluer le pouvoir antioxydant, in vitro, de ces produits synthétisés en Utilisant teste du radical DPPH

¹ P Filipe., A.M.S .Silva, R.S.G.R.Seixas., D.C.G.A.Pinto, A Santos., Patterson. L.K., Silva. J.N., Cavaleiro. J.A.S., Freitas. J.P., Mazière. J.-C., Santus. R., P .M Morlière.; *Biochem. Pharmacol.*; 77, 957-964. 2009

Introduction générale

- ✚ La troisième étape correspondant à l'évaluation de l'activité anticoagulante de ces produits vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à travers les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ) respectivement.

Cette partie englobe tous les résultats et les discussions de chaque chapitre.

On termine notre travail par une conclusion générale sur les études réalisées et perspectives.

A decorative red scroll graphic with rounded corners and a slight shadow, containing the title text.

RAPPEL BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE 1 :

Les dérivés de Chromène

Les dérivés de Chromène

I. Introduction

Les benzopyrane et leurs dérivés (flavones, chromones, chromanes et chromanones) ont suscité un grand intérêt parce qu'ils sont largement répandus dans la nature aussi bien qu'ils ont montré une activité biologique significative (Figure 1). Ces composés sont intéressants à la fois dans le domaine pharmaceutique et comme des médicaments en raison de leurs propriétés¹.

La famille des flavonoïdes contient plusieurs classes de molécules dont les flavonols, les flavones, les chalcones et auronnes. Ce sont des molécules qui possèdent le même élément structural de base, à savoir la séquence de diphenylepropane et ils ont des activités biologiques différentes^{2 3}. Dans cette dernière catégorie de flavonoïdes, les dérivés des dihydro-chalcones glycosylés ont été brevetés dans la lutte contre l'hyperpigmentation de la peau⁴.

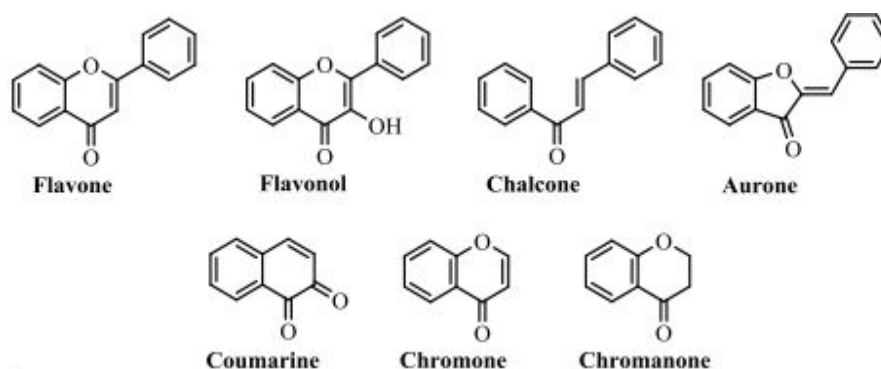


Figure 1 : Les dérivés des benzopyrane

La chromène et ses dérivés sont des composés hétérocycliques très importants. Ces hétérocycles montrent une variété de propriétés pharmacologiques, et le changement de leur structure offre un haut degré de diversité qui s'est avéré utile pour la recherche de

¹A. Dziewulska-Ku łaczkowska, A. Bartyzel., *Journal of Molecular Structure*; 997, 87-93. 2011

²J Bruneton; 3ème édition. *Tec & Doc.*; Paris.; 1999.

³Fernandez. M. T., Mira. M. L., Florencio. M. H., Jennings. K. R.; *J. Inorg. Biochem.*; 92, 105-111. 2002

⁴Yukiko, Y., Masaru. W., Akinori. N.; *Mitsui Chemicals Inc.*, Japan.; Brevet JP 391721. 2000

Nouveaux agents thérapeutiques. Le grand nombre de recherche mené a prouvé l'importance pharmacologique de ce noyau hétérocyclique⁵.

Les dérivés de chromène sont très abondants dans la nature et présentent un large spectre d'activité pharmacologique comme antibactérien, antifongique, anti cancer, anti-oxydant, anti ulcers, immunostimulants, biocides, la cicatrisation des plaies⁶, anti-inflammatoires, immuno-stimulation, antiallergique, neuroprotective, spasmolytique, cardiotonique, antiarrhythmique, antimalarial, inhibiteur de la topoisomérase I, psychoanaleptique, antiamoebique et antidépressive. De nombreux dérivés de chromone sont également photo-Actifs, et Peuvent être utilisés facilement dans diverses réactions photo-induites offrant divers Composés hétérocycliques

Le chromanone est l'un des éléments importants pour la synthèse des chromones, des chromanes, des chromènes et les différents composés tricycliques biologiquement actifs⁷⁸. Le développement de nouvelles méthodologies pour la synthèse des dérivés de chromanone est un axe de recherche très investigué.

II. Les chromènes

Le chromène (benzodihydropyrane) est un composé chimique hétérocyclique de formule chimique C₉H₁₀O. Le chromanes est une caractéristique structurale de composés plus complexes, notamment les vitamines E (tocophérols et tocotriénols), le composé de Dianin et les médicaments pharmaceutiques troglitazone, ormeloxifène et nébivolol. De tels composés sont parfois décrits comme des chromènes⁹.

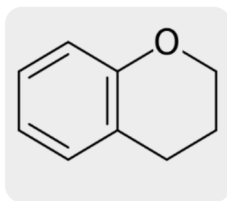


Figure 2 : structure de chromène

⁵Angappa. S. Keri., SrinivasaBudagumpi., Ranjith Krishna Pai., R. Geetha Balakrishna.; *European Journal of Medicinal Chemistry.*; 78, 340-374. 2014

⁶S .Maho. K.Yoshiyuki; *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology.*; 17, 820-829. 2010

⁷ H. J. Kabbe, Widdig. A.; *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.*;, 21, 247-2561982

⁸ M.Fridén-Saxin., N Pemberton., K. Andersson. Da. S., C.Dyrager., A. Freiberg, M.Grötli., K.Luthman.; *Org. Chem.*; 74, 2755 ; 2009

⁹ A.Dziewulska-Ku łączkowska, A. Bartyzel., *Journal of MolecularStructure*; 997, 87-93. 2011

II.1. Les dérivés de chromène

L'invention concerne des dérivés de chromène de formule (I), ainsi que leurs sels. Dans la formule, R¹ représente acyle comportant 1 à 6 atomes de C, -CO-R ou un groupe Protégeant un groupe amino ; R² représente H ou alkyle comportant 1 à 6 atomes de C ; R³, R⁴ représentent indépendamment l'un de l'autre H, alkyle comportant 1 à 6 atomes de C, CN, Halogènes(F, Cl, Br ou I) ou COOR²; R⁵ représente phényle non substitué ou Substitué une ou deux fois par alkyle comportant 1 à 6 atomes de C, par OR ou par Halogènes; X représente H, H ou Oxygène. Ces dérivés s'utilisent comme produits Intermédiaires pour la synthèse de médicaments¹⁰

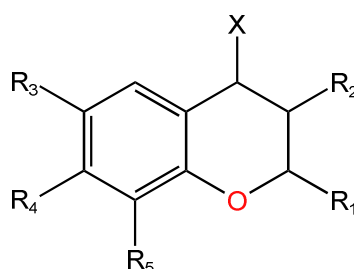


Figure 3 : Formule (I) de chromène

II.2. Voies synthétiques vers les chromènes

Les chromanes sont des motifs structuraux importants dans la synthèse organique et ont été trouvés comme éléments structuraux centraux couramment présents dans de nombreux composés bioactifs¹¹.

Jorgensen et al. Ont développé une réaction en tandem qui implique une addition oxa-Michael catalysée par un acide de Lewis de phénols²⁰⁸ à des α -cétoesters ²⁰⁹ insaturés, suivie d'une FC alkylation intramolécule pour former des chromènes²¹¹ (figure3). La réaction se déroule sous l'influence d'un catalyseur Mg-BOX⁽²¹⁰⁾ pour donner des chromène diastéréomériquement purs avec des énantiosélectivités allant jusqu'à 81% et d'excellents rendements. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le méthoxyphénol. Tandis quelle m-N, N-diméthylaminophénol a donné le chromène correspondant sous forme de diastéréoisomère unique avec un excellent rendement mais avec une faible énantiosélectivités (<20%)

¹⁰CHOI, kyu, Pal, 824-20, Yuoksam –dong kangnam-ku suoul-135-080 (KR) Recaved at international Bureau 1999(10.09.1999)

¹¹H. L., Van Lingen, W Zhuang, T Hansen, F. P. J. T Rutjes., and, K. A Jørgensen *Org. Biomol. Chem.*, 1, 1953-1958. (2003)

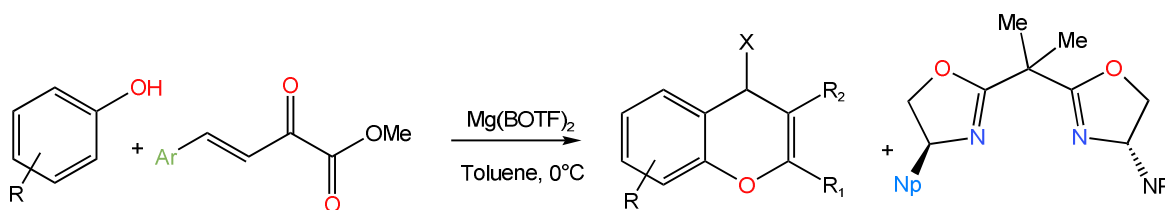


Figure 4: Addition énantiosélective en alkylation de phénols avec des α -cétocesters.

En revanche, **Yang et al.**¹² Ont développé une réaction d'addition énantio sélective organo catalysée de 2-naphtol avec des α -cétocesters β,γ -insaturés en utilisant un catalyseur théorie (figure5) dérivé d'un alcaloïde de quinquina. Le produit résultant est en équilibre rapide avec l'hémicétal cyclique, qui a été déshydraté avec une quantité catalytique de H_2CO_3 concentré, en un seul pot, fournissant les dérivés de naphtopyrane avec des rendements modérés à bons (51-91 %) et énantiosélectivités (57-90%).

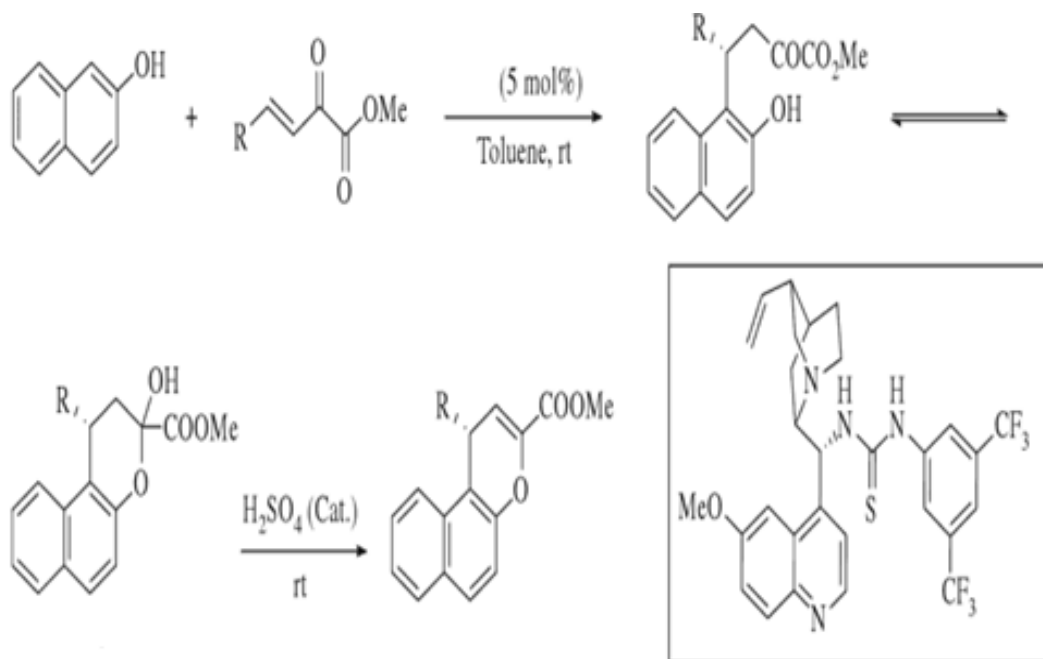


Figure 5: Réaction en cascade d'alkylation/cyclisation asymétrique organocatalytique de 2-naphtols avec des α -cétocesters. (β,γ –insaturés)

Wang et al.¹³ Ont également décrit une réaction en cascade d'alkylation/cyclisation énantiosélective organocatalysée de 1-naphtols et d'aldéhydes α,β -insaturés promus par un diphenylprolinol éther comme catalyseur (**figure6**).

¹²X.-S Wang, C.-W Zheng, S.-L Zhao, Z.Chai, G. Zhao, and G .S, Yang,-*Tetrahedron Asymmetry*, 19, 2699-2704. (2008)

¹³ L Hong, L Wang, W Sun, K Wong,., and RJ Wang,., *Org. Chem.*, 74, 6881-6884. 2009

Cette méthode offre un accès unique aux chromanes et dihydrobenzopyranes chiraux et synthétiquement utiles 220 avec des rendements et des énantiosélectivités élevés

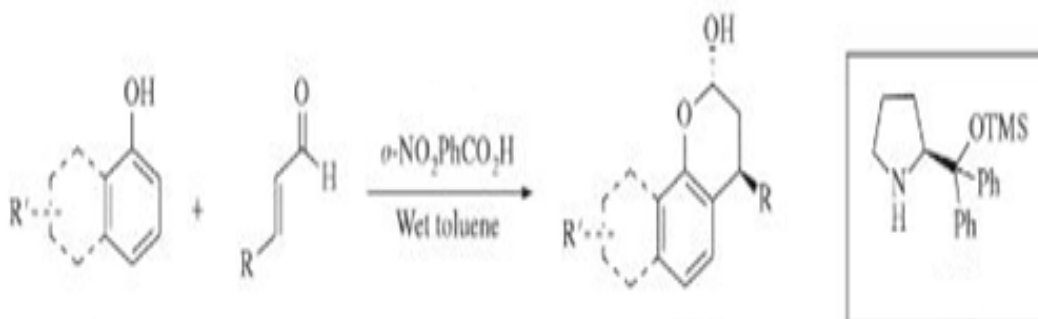


Figure 6 : Réaction en cascade d'alkylation/cyclisation asymétrique organocatalytique de 1-naphtols avec aldéhydes α -insaturés.

Plus tard, le même groupe ¹⁴ a décrit la synthèse de divers chromanes fonctionnalisés chiraux bioactifs potentiels avec des niveaux élevés d'éntio- et de diastéréosélectivité (jusqu'à 76%) via l'amine tertiaire dérivée de la colophane théorie cascade d'alkylation/cyclisation énantiosélective catalysée de 1-naphtol avec une variété d' α -cétosters insaturés β,γ (Figure 7)

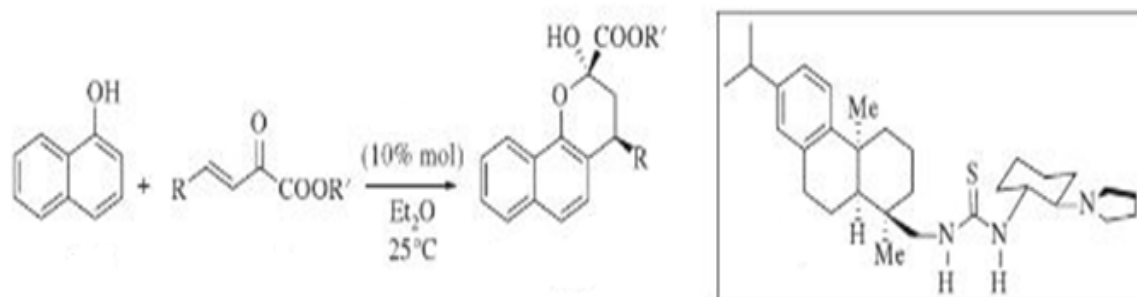


Figure 7 : Synthèse de chromanes modifiés.

Enfin, Feng et Zhang ¹⁵ ont décrit l'alkylation/cyclisation organocatalytique de type domino Michael de 2-naphtols avec des acides alkylidène Meldrum obtenant une variété de β -arylsplitomicines énantioenrichies avec des rendements modérés à bons (jusqu'à 99 %) et des énantiosélectivités modérées (jusqu'à 79 %).

¹⁴X Jiang, Wu L. Y Xing,, L Wang,, S Wang,, Z Chen. and R Wang, *Chem. Commun.*, 48. 446-448. 2012

¹⁵J.-Y, Wang, H Zhang, Y.-H Liao, W.-C.Yuan, Y.-J.Feng, and X -M Zhang, *Synlett*, 23. 796-800. (2012)

Le criblage d'organocatalyseurs bi fonctionnels chiraux a révélé le catalyseur théorie-amine tertiaire comme catalyseur optimal en termes de rendement et d'énantiosélectivités. Les acides de Cyclohexyl alkylidène de Meldrum étaient les meilleurs électrophiles dans cette réaction (Figure 8).

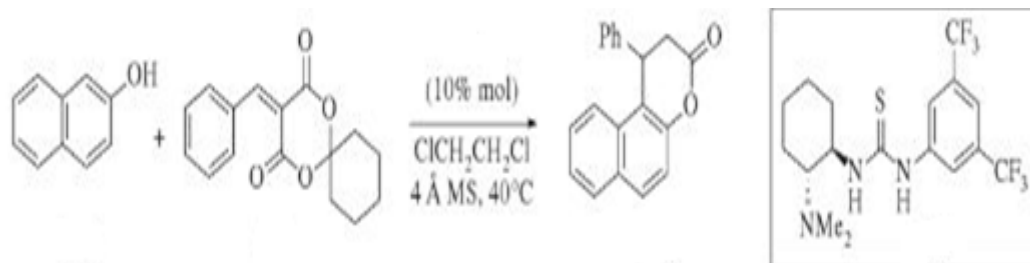


Figure 8 : Alcoylation/cyclisation énantiosélective de type domino Michael de 2-Naphtols avec des acidesalkylidènes de Meldrum.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE 2 :

L'activité antioxydant

Activité antioxydant

I. Définition

Les antioxydants (AOX) sont des substances à faibles concentrations capables d’inhiber ou de retenir les radicaux libres dans l’organisme (des espèces réactives de l’oxygène ERO) ; par transfert d’électrons ou d’atomes d’hydrogène, ils peuvent aussi agir en chélatant des ions métalliques (Fe, Cu). Ils arrivent à développer des synergies entre eux (vitamine E et C)¹.

Les AOX sont de deux sources, exogènes, et endogènes² (voir le tableau 1). Ils assurent deux fonctions, un rôle sacrificiel car ils ont la capacité d’éliminer les ERO et un rôle préventif grâce à son potentiel d’inhibition permet de formerons réactif oxydant.

II. Classification des antioxydants

Tableau 1 Différentes sources d’antioxydants dont dispose l’organisme pour répondre aux situations de stress oxydant³

ENDOGENE		EXOGENE	
Enzymatique	Non enzymatique	Lipophiles	Hydrophiles
Superoxyde	Glutathion	Vitamine E	Polyphénols
Mutasse	Albumine	Vitamine A	Vitamine C
Glutathion	Bilirubine	Caroténoïdes	Oligoélément
Peroxydase	Coenzyme Q10		
Catalase	AC. Urique		

¹J. Haleng, J. Pincemail, J. O. Defraigne, C. Charlier, and J. P. Chapelle, “Le stress oxydant,” *Rev Med Liege*, vol. 62, pp. 628–638, 2007

²C. N. TsumbuCesar, G. Deby-Dupont, M. Tits, L. Angenot, M. Frederich, S. Kohnen, A. Mouithys-Mickalad, D. Serteyn and T. Franck., “Polyphenol content and modulatory activities of some tropical dietary plant extracts on the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, pp. 628–650, 2012

³J. P. Zegarac, “Antioxidants: Mechanisms of Action and Effectiveness,” *brunswicklab*, 2016. [Online]. Available: <https://brunswicklabs.com/blog/antioxidants-mechanisms-of-action-and-effectiveness>

-D. Durand, M. Damon, and M. Gobert, “Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux,” *Cah. Nutr. Diet.*, vol. 48, pp. 218–224, 2013.

III. Méthodes de dosage de l'activité antioxydant

Dans le but de quantifier les AOX dans un échantillon biologique, les chercheurs ont exploité leurs capacités naturelles à piéger des radicaux libres pour élaborer des méthodes de dosage efficaces. Plusieurs tests ont été développés afin de déterminer l'activité antioxydant in vivo et in vitro, parmi ces méthodes :

III.1. Test au DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres (RL) utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques⁴. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote⁵.

III. 1.1. Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres (antioxydants), le DPPH (2,2-Diphényl 1 picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2-Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune⁶.

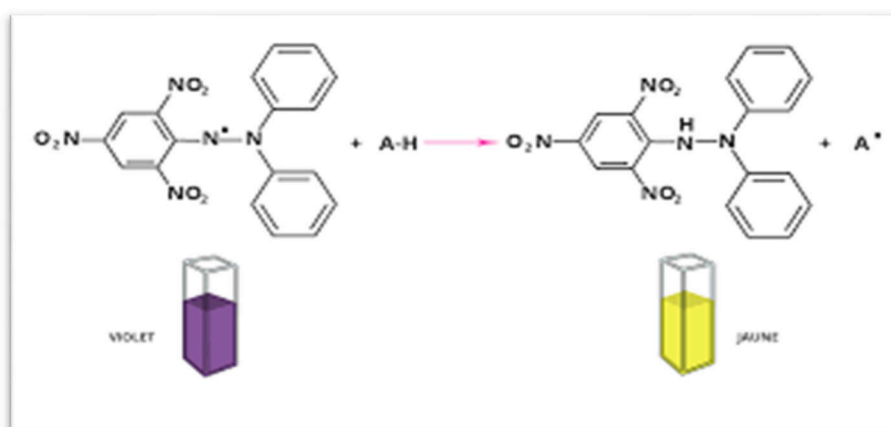


Figure 9 : réaction de réduction de DPPH⁷

⁴W.BRAND-WILLIAMS, M E. CUVELIER, C.BERSET, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 1995.

⁵POPOVICI C., SAYKOVA I., TYLKOWSKI B., Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, 2009.

⁶P.MOLYNEUX, J.SONGKLANAKARIN. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Sciences Technology*. Vol 26 (2) : 211-219, 2004.

III.1.2. Dosage

L'activité du piégeage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par LOPES-LUTZ⁸. 50ml de chaque solution alcoolique de l'échantillon à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanoïque du DPPH (0,025g/l). Parallèlement, un témoin négatif est préparé en mélangeant 50ml de l'alcool avec 1,95 ml de la solution alcoolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions.

Les résultats sont exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$I \% = [1 - (\text{Abs Échantillon} - \text{Abs Contrôle négatif})] \times 100$$

I % : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).

Abs Échantillon : Absorbance de l'échantillon.

Abs Contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif⁹.

III.2. Test de la réduction du fer FRAP (Ferricreducing-antioxydant power)

III. 2.1. Principe

Le pouvoir réducteur du fer (Fe³⁺) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par OYAIZ (1986). La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de

⁷<http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe>, consulté le 13/06/2022.

⁸ S.ATHAMENA, I.CHALGHEM, A.KASSAH-LAOUAR, S. LAROUÏ, S.KHEBRI, Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.* *Lebanese Science Journal*. Vol 11 (1):72p. , 2010.

⁹ A.MEDDOUR, M.YAHIA, N.BENKIK., A.AYACHI, Étude de l'activité antioxydant et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparispinosa l. *Lebanese Science Journal*. Vol 14 (1): 52p, 2013.

l'ion ferrique en sel de fer (4, 6-tri-pyridyl-s-triazine TPTZ (ferric²⁺)) par les antioxydants qui donnent la couleur bleue.

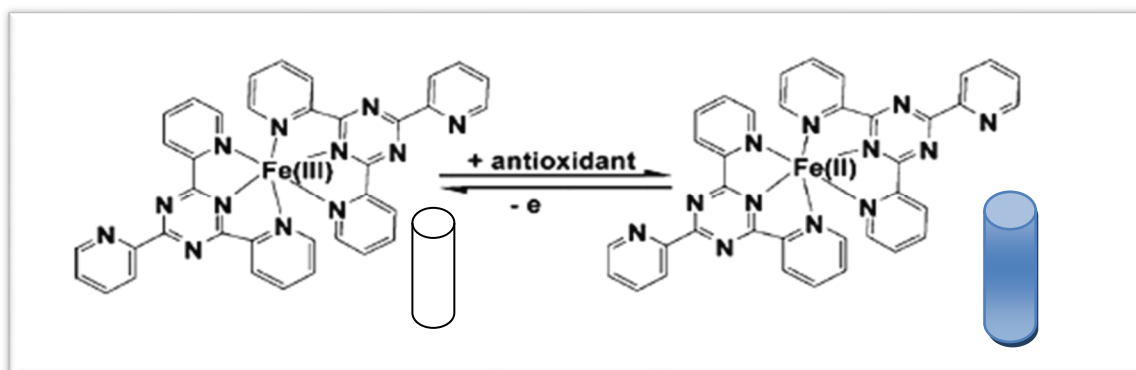


Figure 10 : réaction de réduction de l'ion ferrique $Fe^{+3,10}$

III.2.2. Dosage

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0,007 à 2,5 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 r.p.m pendant 10 min. Un aliquote (2,5 ml) de surnageant est combinée avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ (Chlorure ferrique) à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'échantillon par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS). Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des échantillons testés¹¹.

Le pourcentage de pouvoir réducteur de fer est calculé par la réaction suivant :

¹⁰A. Boutakiout, D. Elothmani. https://www.researchgate.net/publication/280255635_Etude_physico-chimique_biochimique_et_stabilite_d'un_nouveau_produit_jus_de_cladode_du_figuier_de_Barbarie_marocain_in_Opuntia_ficus-indica_et_Opuntia_megacantha, 2015 consulté le 13/06/2022.

¹¹V L.INGLETON, J A.ROSSI, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Technology and Viticulture. (16) : 144-153, 1965.

$$\text{Pouvoir réducteur de fer (\%)} = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100.$$

A_0 : est l'absorbance de FeCl_3 .

A_1 : est l'absorbance de FeCl_3 solution en présence de l'extrait¹².

III.3. Méthode de TRAP (Total radical-trapping antioxidant paramètre)

III.3.1- Principe

Cette méthode est basée sur la protection fournie par les antioxydants sur la décroissance de la fluorescence de la R-phycoérythrine (R-PE) au cours d'une réaction de peroxydation contrôlée. La fluorescence de R-phycoérythrine est désactivée par ABAP (2,2' - azo-bis (2 - amidino- propane) dihydrochlorhydrate en tant que générateur de radicaux. Ce stoppage de la réaction est mesuré en présence d'antioxydants. Le potentiel antioxydant est évalué en mesurant la décroissance de la décoloration¹³.

III.3.2- Dosage

120 uL de l'échantillon dilué est ajouté à 2,4 ml du tampon phosphate (pH 7,4), 375 uL d'eau distillée, 30 uL de R-PE dilué et 75 uL de ABAP ; la cinétique de réaction à 38 C° est enregistrée pendant 45 min par un spectromètre de luminescence. Les valeurs de TRAP sont calculées à partir de la longueur de la phase de latence due à l'échantillon par rapport à la norme¹⁴.

III. 4. Réduction du radical- cation ABTS ou détermination du TEAC

III.4.1. Principe

¹²M.GHAISAS, V.NAVGHARE, A.TAKAWALE, V. ZOPE, DESHPANDE A. In-vitro antioxidant activity of tectona grandis lin. *Pharmacologyonline*. (3): 300p. 2008.

¹³M.NUR ALAM, N. BRISTI, M.RAFIQUZZAMAN. *Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity*. (21) :145-149, 2013.

¹⁴M.NUR ALAM, N.BRISTI, M.RAFIQUZZAMAN, *Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity*. (21) :145-149.2013.

La méthode de radicale ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres. Il est basé sur la neutralisation d'un radical - cation résultant de la mono électronique oxydation du chromophore synthétique 2,2'- azino-bis (3 – éthylbenzothiazoline) -6- sulfonique acide) ABTS. Cette réaction est suivie par spectrophotométrie par la variation de spectre d'absorption¹⁵.

III.4.2. Dosage

Le radical cation ABTS est généré en mélangeant à volume égal une solution de 3 mM de persulfate de potassium $K_2S_2O_8$ et une solution stock d'ABTS à 8 mM, le tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 16 h avant utilisation¹⁶. La solution obtenue est diluée avec du tampon phosphate (0,2 M, pH 7,4) contenant 150 ml de NaCl pour obtenir une absorbance de 1,5 à 734 nm. 2,9 ml de cette solution fraîchement préparée sont ajoutés à 0,1 ml d'extrait et la lecture est faite à 734 nm après 30 min pour chaque série d'analyses. Le Trolox est utilisé comme standard et le résultat final est exprimé en micromoles d'équivalent Trolox par gramme de matière sèche.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage inhibition (\%)} = \frac{[(\text{Abs témoin} - \text{Abs blanc})]}{(\text{Abs témoin})} \times 100$$

Abs témoin : l'absorbance du radical ABTS⁺ méthanol.

Abs blanc : l'absorbance de l'échantillon ABTS radical + Extrait / standard¹⁷.

III. 5. Test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

III.5.1. Principe

¹⁵JIRI S., MARKETA R., OLGA K., PETR S., VOJTECH J., LIBUSE T., LADISLAV H., MIROSLAVA B., JOSEF Z., IVO P., RENE K., 2010. Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molécules*. (15): 8618-8640.

¹⁶AWIKA J M., ROONEY L W., 2004. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Photochemistry*. (65):1199-1221.

¹⁷BA K., TINE E., DESTAIN J., CISSE C., THONART P., 2010. Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. Vol 14(1): 131-139.

La mesure ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) permet de déterminer si une source organique possède un effet antioxydant en le comparant à un analogue de la vitamine E : le TROLOX. Dans cet essai, l'AAPH (2,2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride) est utilisé comme source génératrice de radicaux PEROXYLES. L'addition de fluorescéine comme sonde fluorescente permet de quantifier, à l'aide d'une analyse spectrophotométrique, en fonction du temps, la perte de fluorescence associée à la réaction avec les radicaux libres fournis par l'AAPH par un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène. La présence d'antioxydants empêche ou ralentit la perte de fluorescence qui est calculée par l'aire sous la courbe en fonction du temps. Celle-ci peut être détectée à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission de 520 nm. Il s'agit donc d'une méthode permettant de mesurer la capacité antioxydant contre les radicaux peroxydes¹⁸. Lorsqu'un capteur de radicaux libres est incorporé dans le milieu, les radicaux libres sont captés, et la fluorescence persiste, donnant ainsi une idée précise du pouvoir anti-radical libre, donc antioxydant de l'échantillon¹⁹.

III.5.2. Dosage

Ce dosage est basé sur la génération de radicaux libres en utilisant AAPH (2,2 -azobis -2 amidopropanedichlorhydrate) et mesure de la diminution de la fluorescence en présence des capteurs des radicaux²⁰. Dans cet essai, f3-phycoérythrine (f3 -PE) a été utilisé comme piègeage des radicaux libres cible, AAPH comme un radical pyroxylé générateur et Trolox comme un contrôle standard. Après addition d'AAPH à la solution

¹⁸OU B., HAMPSCH-M WOODILL., R L PRIOR.,. Development and validation of an improved Oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (49): 4619-4626.2001

¹⁹Y ROLLAND. Actualités des lipides en cosmétique .Antioxydants naturels végétaux. OCL. Vol 11(6) : 419 - 424.2004

²⁰R L PRIOR., H HOANG., GU L. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC (FL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* (51):3273-3279.2003

d'essai, la fluorescence est enregistrée et l'activité antioxydant est exprimée en équivalent Trolox²¹.

Le dosage peut être effectué selon la PIRIOR et *al.* (2003) dans des plaques à 96 puits de fluorescence de polypropylène avec un volume finale de 200 μ l. Les analyses sont effectuées à pH 7,0 avec de Trolox (6,25, 12,5, 25, et 50 μ mol/ L pour les dosages lipophiles ; 12,5, 25, 50 et 100 μ mol /L pour les dosages lipophiles hydrophile) et 75mM / L du tampon phosphate comme le blanc. Après l'addition de l'AAPH, la plaque est placée immédiatement dans un compteur à Multilabel préchauffé à 37 C°. La plaque est agitée pendant 10 s et la fluorescence est lue à des intervalles de 1 min pour 35 min à la longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 520 nm. L'aire sous la courbe est calculée pour chaque échantillon en utilisant le logiciel WallacWorkout 1.5. Le calcul final des résultats a été déterminé dans la partie linéaire de la courbe de - désintégration entre blanc et de l'échantillon et / ou standard (Trolox). Les résultats sont exprimés en LM d'équivalents Trolox (TE) par g de poids sec de l'échantillon (IM TE / g)²².

III.6. Méthode de la xanthine oxydase

III.6.1. Principe

Cette méthode est basée sur l'inhibition de XO (xanthine oxydase) qui conduit une diminution de la production d'acide urique, qui a été déterminée par spectrophotométrie. Tous les extraits ont inhibé les activités XO d'une manière dépendante de la dose²³.

²¹G CAO., H M ALESSIO., R G CULTER. Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidant free radicals. *Biol. Med.* (14):303-311.1993

²²-B FREI., R STOCKER., L ENGLAND., BN AMES. Ascorbate the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv. Med. Exp. Biol.* (264):155-163 1990

²³E OSKOUEIAN., N ABDULLAH., R HENDRA., E KARIMI. Composés bioactifs, antioxydant, la xanthine oxydase inhibiteur, inhibiteur de la tyrosinase et anti-inflammatoires de la sélection agro-industriel des sous-produits. (12): 8616p.. 2011

III.6.2. Dosage

L'extrait (500 uL de 0,1 mg/ml) et allopurinol (100u g/ml) (dans le méthanol) sont mélangés avec 1,3 ml du tampon phosphate (0,05 M, pH 7,5) et 0,2 ml de 0,2 unités/ ml de solution de xanthine oxydase. Après 10 min d'incubation à la température ambiante (25 C°), 1,5 ml de substrat de la solution de xanthine de 0,15 M est ajoutée à ce mélange. Le mélange est à nouveau incubé pendant 30 min à température ambiante (25 C°), puis l'absorbance est mesurée à 293 nm en utilisant un spectrophotomètre contre le blanc (0,5 ml de méthanol, de 1,3 ml du tampon phosphate et 0,2 ml de la xanthine oxydase). La solution de mélange de 0,5 ml de méthanol, 1,3 ml du tampon phosphate, de 0,2 ml de la xanthine oxydase et 1, 5 ml du substrat de xanthine est utilisé comme témoins

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = 1 - (As/AC) \times 100$$

As : Absorbance de l'échantillon d'essai.

Ac : Absorbance de l'échantillon de contrôle.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIE

Chapitre III :

Activité anticoagulante

Activité anticoagulante

I. Coagulation

La coagulation est le processus qui aboutit à la formation de fibrine nécessaire à la consolidation du clou plaquettaire. Il s'agit d'une séquence de réactions enzymatiques permettant l'activation de facteurs plasmatiques inactifs en protéases actives¹.

La physiologie de la coagulation fait appel, pour l'activation initiale, à l'interaction entre un composant cellulaire, le facteur tissulaire, et un composant plasmatique, le facteur VII. La liaison (facteur tissulaire-facteur VII) induit une activation du facteur VII. Il s'en suit une chaîne de réaction, appelée cascade de la coagulation, qui aboutit à la formation de facteur X activé à partir de sa proenzyme. Le facteur X activé permet la transformation de La prothrombine en thrombine (**figure 11**)², enzyme clé de la coagulation.

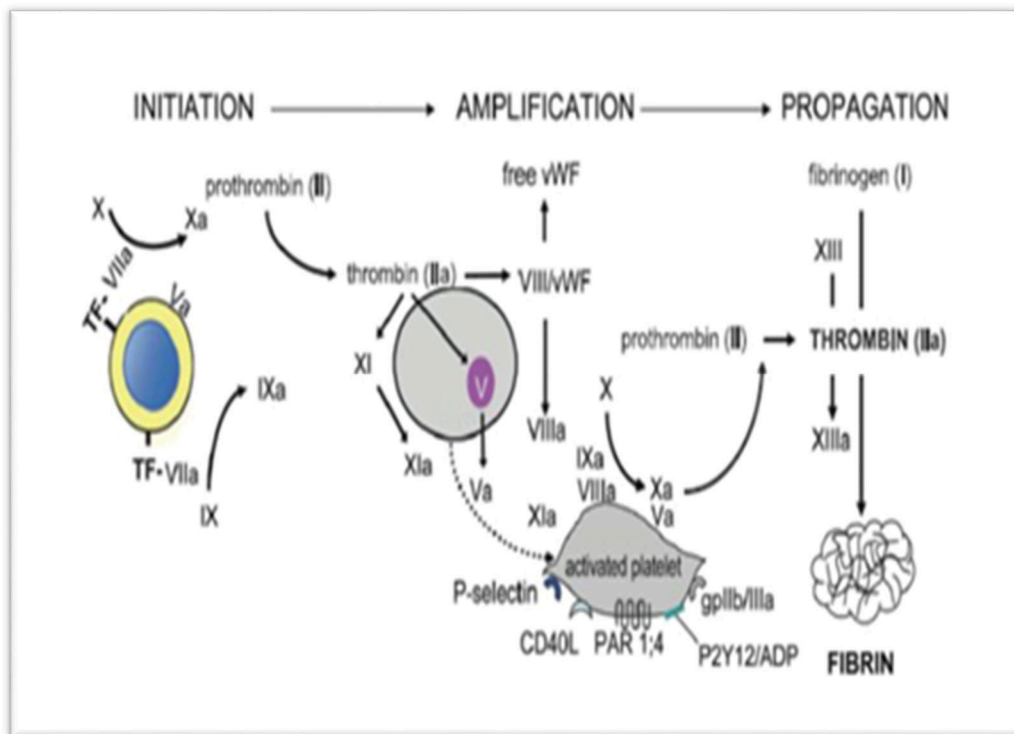


Figure 11: Schéma des concepts actuels sur le processus de coagulation

¹A Plaziat-Decoucel, Les anticoagulants. *Thèse de doctorat en pharmacie*. Université Henry Poincaré– De Caterina1; 1Steen Nancy, Faculté de pharmacie, P 123. 2009.

²JF Schved., Hémophilie: *physiopathologie et bases moléculaires*,.-Raffaele Husted; Lars Wallentin; Felicitia Andreotti; Harald2008.

II. La coagulation plasmatique

L'hémostase est l'ensemble des mécanismes physiologiques dont les fonctions sont de prévenir toute hémorragie spontanée et de permettre l'arrêt d'un saignement après rupture vasculaire. On distingue 3 temps

- ✚ L'hémostase primaire : obture la brèche par la formation d'un caillot plaquettaire (thrombus blanc)
- ✚ La coagulation plasmatique : son ultime finalité est de former un caillot solide
- ✚ La fibrinolyse : permet la destruction des caillots ou la limitation de leur extension

III. Synthèse des protéines de la coagulation

Toutes les protéines de la coagulation sont synthétisées dans l'hépatocyte avant d'être secrétées dans la circulation à l'exception du TFPI qui est produit par l'endothélium vasculaire. Le foie joue donc un rôle clé dans le maintien d'une hémostase normale, toutefois certaines protéines de la coagulation ne sont pas exclusivement produites par le foie mais aussi par d'autres organes c'est le cas du facteur VIII (anti-hémophilique A) produit également par la rate, et la protéine S produite par l'endothélium vasculaire.

IV. Facteurs de la coagulation

La coagulation nécessite l'intervention de nombreux facteurs plasmatiques, nommés de **I à XIII**. Ces facteurs sont présents sous forme de précurseurs inactifs dans le sang. Lorsqu'ils sont activés par protéolyse, on leur adjoint la lettre « a ». Les facteurs sont synthétisés par le Foie³. Les principaux facteurs de coagulation sont reportés sur le tableau suivant :

Tableau 2 : Facteurs de la coagulation⁴

³Pench L. Peut-on prendre le risque hémorragique par le biais d'un interrogatoire Médical ? *Thèse de doctorat en chirurgie dentaire*, Université Toulouse III, Faculté de Chirurgie dentaire, p 111. 2015.

⁴T Revel, et K Doghmi., *Physiologie de l'hémostase EMC-Dentisterie I* 71 - 81. 2004

N° de facteurs	Nom de facteurs	Fonction	Lieu de synthèse	Vitamine Kdépendance
I	Fibrinogène	Substrat	Foie	
II	Prothrombine	Zymogène	Foie	+
V	Pro-accélérine	Cofacteur	Foie	
VII	Proconvertine	Zymogène	Foie	+
VIII	Facteur Anti-hémophilique A	Cofacteur	Foie	
IX	Facteur Anti-hémophilique B	Zymogène	Foie	+
X	Facteur Stuart	Zymogène	Foie	+
XIII	Facteur de Stabilisation de laFibrine	Zymogène	Multicellulaire	

V. Le déroulement de la coagulation

V.1. La voie endogène ou intrinsèque

Dans cette voie de coagulation tous les éléments nécessaires de la coagulation sont présents dans le plasma sans apport extérieur. Cette voie est déclenchée par l’activation du facteur XII par leur contact aux structures électronégatives de la matrice sous-endothéliale (collagène, Sulfatides, glycosaminoglycanes)⁵, une activation qui conduit par la suite à l’activation de pré-kallikréine en kallikréine qui à son tour peut activer le F XII.

Le F XII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée qui active par la suite le facteur IX. Ce dernier se liéa la surface de phospholipides anioniques des plaquettes (PS) par l’intermédiaire des ionscalcium et forme, en présence de son cofacteur, le facteur VIII, le complexe tenace qui est responsable de l’activation du facteur X. Cette dernière forme avec son cofacteur (le facteurV), les phospholipides plaquettaires et par l’intermédiaire aussi des ions de calcium,

⁵A.E Vogler, et Siedlecki, A. C: *Contact activation of blood-plasma*.2009

Le complexe prothrombinase qui catalyse la transformation de prothrombine en thrombine (Figure 10)⁶.

V.2. La voie exogène ou extrinsèque

La voie exogène est la voie la plus simple et la plus rapide que la voie endogène, Elle fait intervenir un nombre limité de facteurs⁷. Cette voie est activée Par un facteur non plasmatique qui est le facteur tissulaire, une glycoprotéine membranaire exprimée sur la surface des cellules endothéliales et les cellules de la matrice sou endothéliale.

Lors d'une brèche vasculaire, le facteur tissulaire devient en contact avec le plasma ce qui Permet l'interaction avec le facteur VII (pro-convertine) pour former un complexe Enzymatique réactif (Facteur tissulaire-FVII).Ce complexe est responsable de l'activation de facteur X et aussi de facteur IX et par conséquence de prothrombine en thrombine⁸. La Thrombine formée par les deux voies catalyse la conversion de fibrinogène en Monomères de fibrine qui s'associent les unes aux autres grâce à des liaisons hydrogène pour Former un réseau fibrineux instable, où le facteur XIIIa (le facteur stabilisateur de fibrine) Préalablement activé par la thrombine intervient pour la solidification du caillot fibrineux par l'établissement de liaisons covalentes entre les différentes molécules de fibrine (Figure 12)

⁶R Ajjan., P. J Grant., - Coagulation and atherothrombotic disease. *Atherosclerosis*, 186(2006)

⁷J., Caen. M.J., Lrrieu. EtM Samama..L'hémostase : méthodes d'exploration et Diagnostic pratique (2ème éd), *Expansion Scientifique Française* (Paris), p15-20(1975)

⁸B.T Colvin.*Physiology of haemostasis.VoxSanguinis*. 87(1): 43-46(2004)

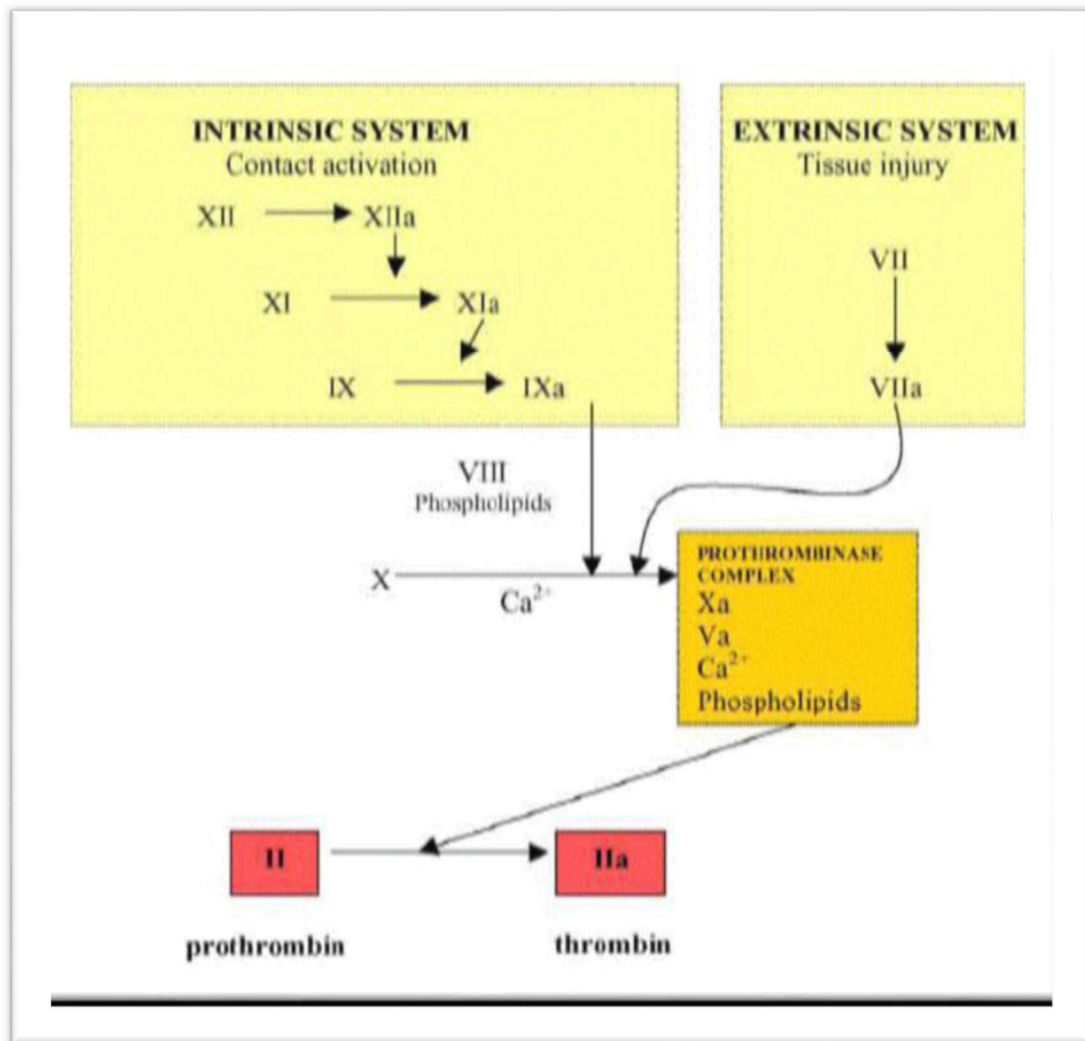


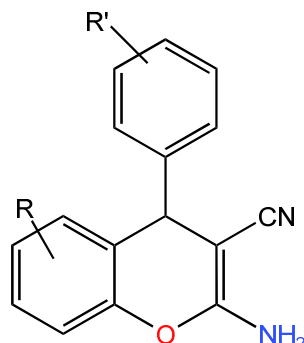
Figure 12 : Schéma simplifié de la cascade de coagulation

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 :

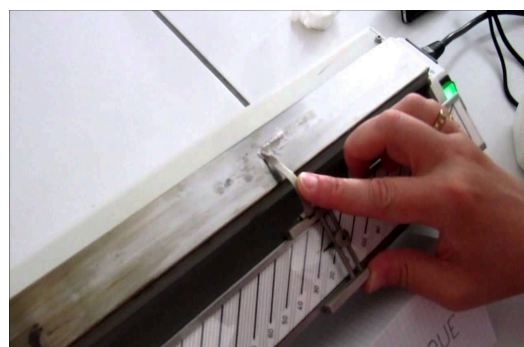
La synthèse des dérivées de 2-amino- 4-phenyl-4H-chromene-3- carbonitrile

La synthèse des dérivées de 2-amino-4-phenyl-4H-chromene-3-carbonitrile



I. Méthodes et matériels :

Un mélange de dérivée de benzaldéhyde (0,005mole), un dérivé de phénol (0,005mole) et Malonitrile (5mmol) a été mis ensemble dans un mortier et la présence K_2CO_3 (0,005mole) comme catalyseur à température ambiante pendant environ 5 minutes. Puis on ajoute l'eau distillé et on ajoute pendant 15 minutes. Le composé obtenu par la filtration a été recristallisé en utilisant un mélange de l'éthanol et l'eau distillé¹ (les points de fusion ont été mesurés à l'aide d'un appareil Bonc Coffler (université de Constantine)).



Figure_13 : A : La synthèse,

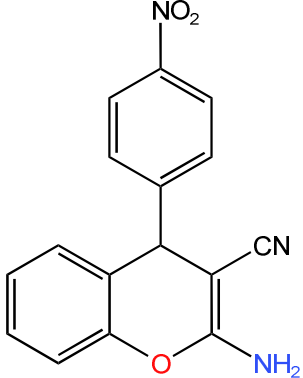
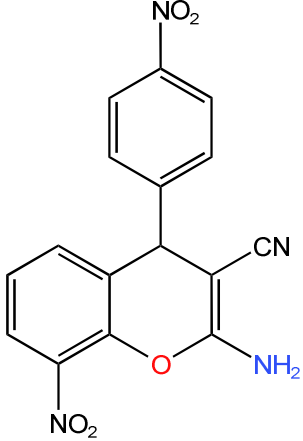
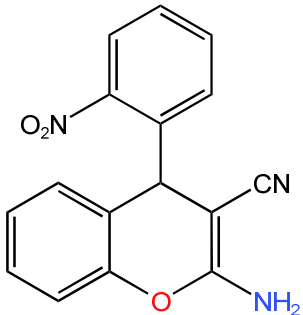
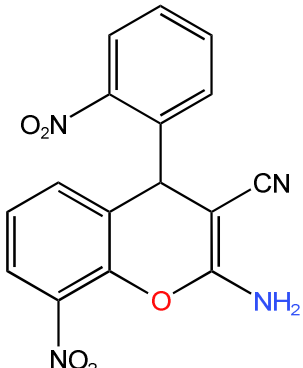
B : Les mesures de points de fusion

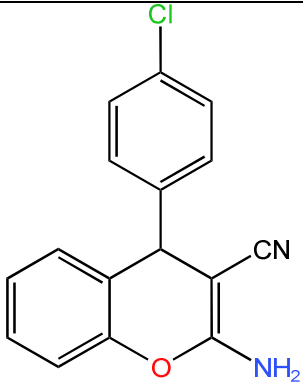
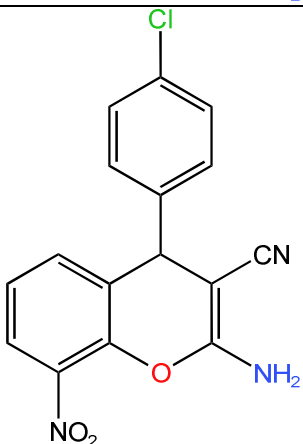
¹A . Khaskel. A single step, mild, environ mentally friendly green method has been developed for the synthesis of physiologically active 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-ones .RSC adv.4, p. 35559, 2014 ·

II. Résultat:

Les produits synthétisés sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Listes des produits synthétisés

Le produit	Le point de fusion	La structure
<p>2-amino-4-(4-nitrophenyl-4H-chromene-3-carbonitrile A 4NphHcc</p>	<p>110 °C</p>	
<p>2-amino-8-nitro-(4-nitrophenyl-4H-chromene-3-carbonitrile AN 4NphHcc</p>	<p>165 °C</p>	
<p>2-amino-4-(2-nitrophenyl-4H-chromene-3-carbonitrile A 2NphHcc</p>	<p>150°C</p>	
<p>2-amino-8-nitro--4-(2-nitrophenyl-4H-chromene-3-carbonitrile AN 2NphHcc</p>	<p>169°C</p>	

<p>2-amino-4-(4-chlorophenyl)-4H-chromene-3-carbonitrile AchphHcc</p>	146°C	
<p>2-amino-4-(4-chlorophenyl)-8-nitro-4H-chromene-3-carbonitrile AchphNHcc</p>	169°C	

III. Conclusion :

Nous avons synthétisé avec succès des dérivés de 2-amino-4-phenyl-4H-Chromene-3-carbonitrile par condensation d'aldéhydes aromatiques, Malonitrile et de phénol ou de 2-nitrophénol en présence d'un agent Catalytiques de K_2CO_3 sous sans solvant (méthode de **GRINDSTONE** ou la Chimie verte).



Partie Expérimentale
Chapitre II
Evaluation de l'Activité Antioxydant

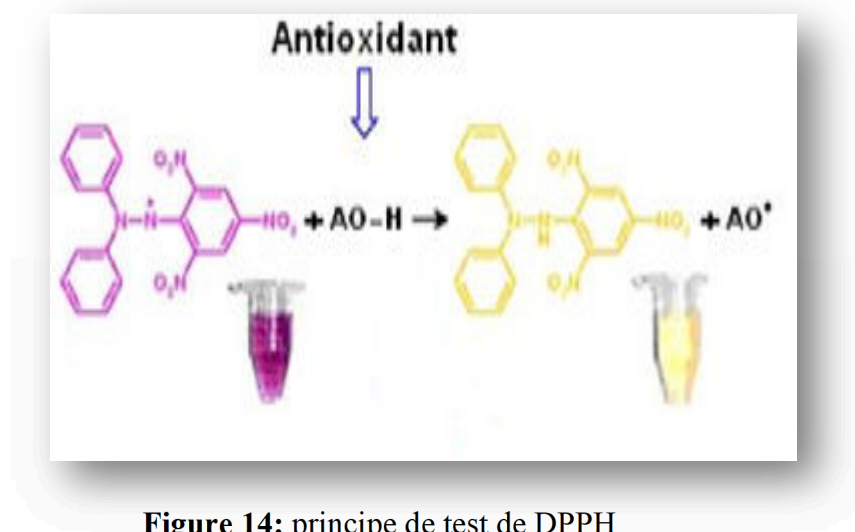
Evaluation de l'activité antioxydant

I. Introduction :

L'activité antioxydant a été évalué en utilisant le test DPPH, les différentes étapes du test ont été effectués au niveau de laboratoire de graduation de biologie (centre universitaire A. Elhafidh Boussouf Mila)

II. Principe de la méthode :

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre, stable ou accepteur d'hydrogène de couleur violet intense¹. Ce radical perd sa coloration native quand il se lie avec des substances antioxydants (AH), qui lui transfèrent des électrons ou des protons. La forme réduite du DPPH confère à la solution une couleur jaune². Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration découle, de la nature, de la concentration et de la puissance des principes actifs présents³La réaction peut se résumer de la façon suivante⁴ :



¹S Cavar., M Maksimovic., DVidic. & AParic. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Aetemisiana* L. From Bosnia. *Industrial Crops and Products*. 37: 479-485, 2009.

²A Gadaw, V., Joubert, and C. FHansmann., Comparison of the Antioxidant Activity of *Aspalathin* with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), *α*-Tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 45: 632-638.1997.

³G.TKroyer., Red clover extract as antioxidant active and functional foodingredient innovative. *Food Science and Emerging Technologies*, 5: 101-105.2003.

⁴NEs-Safi, AKollmann., SKhlifi., and Ducrot, P.H. Antioxydative effect of Compounds isolated from *Globularia alypum* L. Structure activity relationship. *L.W.T*, 40: 1246-1252.2007.

III. Mode opératoire

III.1. Matériel et réactifs

- Verreries (pipettes, béchers, tube à essai...)
- Spectrophotomètre UV-visible et cuves
- Ethanol 96° (qualité spectrophotométrie ou HPLC)
- DPPH (M=394,3g/mole)
- Les produits synthétisés

III.2. Méthode :

III.2.1. Préparation de la solution DPPH :

4mg de DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$; M : 394,33g/mole), est dissout dans 100mL de l'éthanol. La solution a été incubée à l'obscurité pendant 24h sous agitation mécanique (Figure15)



Figure 15: Préparation de la solution DPPH (Photo personnelle, 2022)

III.2.2. La préparation de la solution mère de concentration 0, 5mg/ml :

5mg de chaque produit synthétisé a été mélangé avec 10 ml de l'éthanol dans un tube à essai (figure 16)

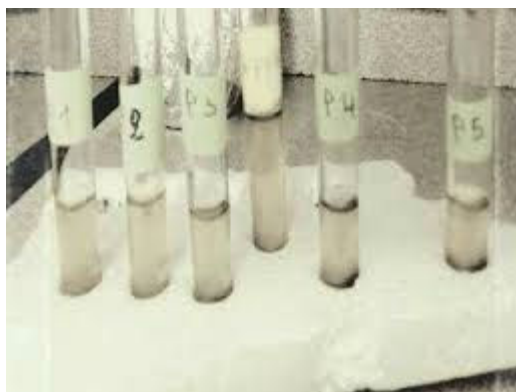


Figure 16 : La préparation des solutions mères

III.2.3. Préparation des dilutions des produits synthétisés :

L'expérience effectuée sur cinq concentrations différentes d'échantillon de l'ordre décroissant dilués dans l'éthanol (**tableau 4**)

À partir de chaque solution mère, on a préparé les dilutions suivantes selon la relation suivante :

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

- ❖ C_1 : Concentration de la solution mère 0,5mg/ml
- ❖ V_1 : Volume de la solution mère (ml)
- ❖ V_2 : Volume d'éthanol ajouté (ml)
- ❖ C_2 : Concentration final (mg /ml)

Tableau 4 : Les différentes concentrations de produit

Concentrations (mg /ml)	Volume de la solution mère (ml)	Volume d'éthanol (ml)
0,3	3	2
0,2	2	3
0,1	1	4
0 ,05	0,5	4,5
0 ,025	0,25	4 ,75

III.2.4. Les mesures spectroscopiques

- On mélange 3 ml de la solution de DPPH préparé avec 30ul de chaque solution diluée.
- Laissez-les à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 15 minutes
- En mesure l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre 517 nm
- En mesure l'absorbance de chaque concentration (3ml de DPPH avec 30µl de produit) par rapport à un blanc constitué uniquement par l'éthanol pur 10ul DPPH (3 ml)



Figure17 : A Préparation des différentes Concentrations et l'ajout de Solution DPPH,
B L'appareil de spectrophotomètre UV-Visible

- En converti les mesures d'absorbance en% DPPH restant par la relation suivante

$$P = [(Blanc - \text{extrait}) / Blanc] \times 100$$

- ❖ **P:** Pourcentage d'inhibition
- ❖ **Extrait:** La densité optique de DPPH en présence de l'extrait
- ❖ **Blanc:** La densité optique de DPPH dans la solution éthanoïque

III.3. Résultats et discussion

III.3.1. Résultats

La capacité de piégeage du radical libre est calculée à travers le pourcentage d'inhibition :

$$\text{Le pourcentage d'inhibition (PI)} = \{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs}$$

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

Abs contrôle: Absorbance de la solution DPPH.

Abs test : Absorbance de produit

Tableau 5 : Les résultats spectrophotométrique des déférentes concentrations d'AchPHcc

AchPhHcc						
Concentration mg/ml	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05	0,025
Absorbance à 517 nm	0.557	0.756	0.723	0.820	0.782	0.833
PI %	46.18	26.95	30.14	20.77	24.44	19.51

Tableau 6 : Les résultats spectrophotométrique des déférentes concentrations d'AchphNHcc

AchphNHcc						
Tube	1	2	3	4	5	6
Absorbance à 517 nm	0.916	0.607	0.808	0.818	0.976	0.971
PI %	11.49	41.35	21.93	20.96	5.70	6.18

Tableau 7 : Les résultats spectrophotométrique des déférentes concentrations d'A 4NphHcc

ANphHcc						
Tube	1	2	3	4	5	6
Absorbance à 517 nm	0.930	0.776	0.895	1.073	1.025	1.063
PI %	10.14	25.02	13.52		0.96	

Tableau 8 : Les résultats spectrophotométrique des déférentes concentrations d'ANNphHcc

ANNphHcc						
Tube	1	2	3	4	5	6
Absorbance à 517 nm	1.004	0.873	0.997	1.062	1.035	1.061
PI %	2.99	15.65	3.67	-2.60	0	-2.51

Les résultats obtenu dans les tableaux précisé a été traduire dans les courbe suivants :

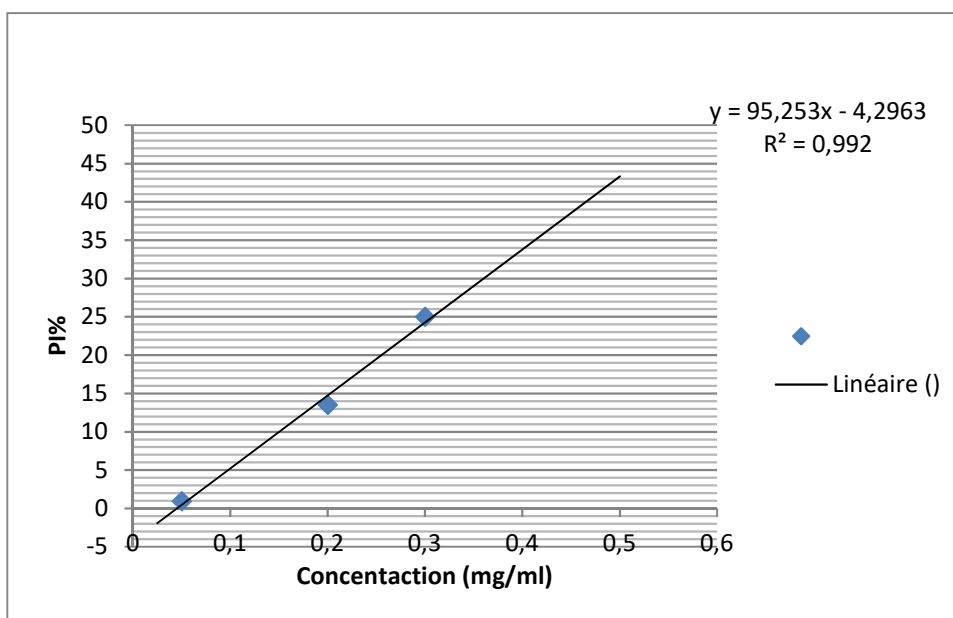


Figure 18 : Courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d'AchphHcc

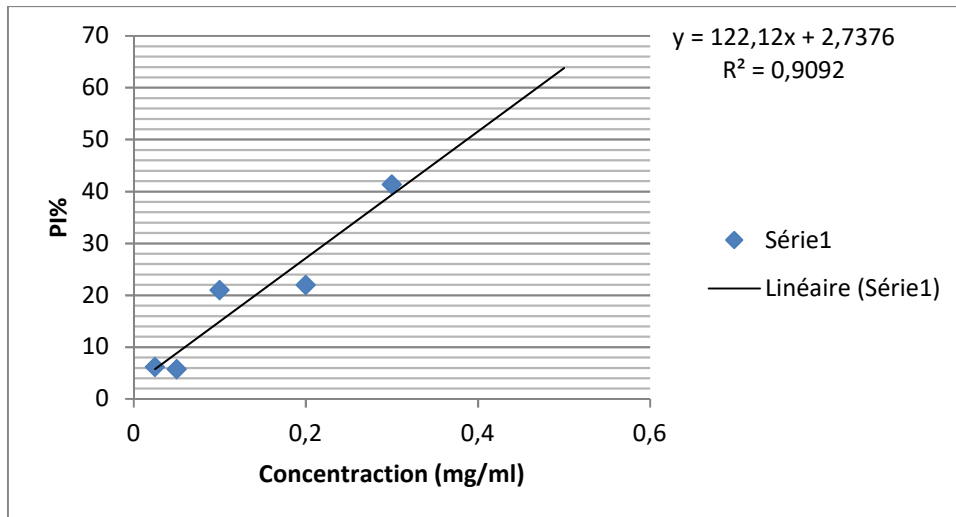


Figure 19 : Courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration AchpNHcc

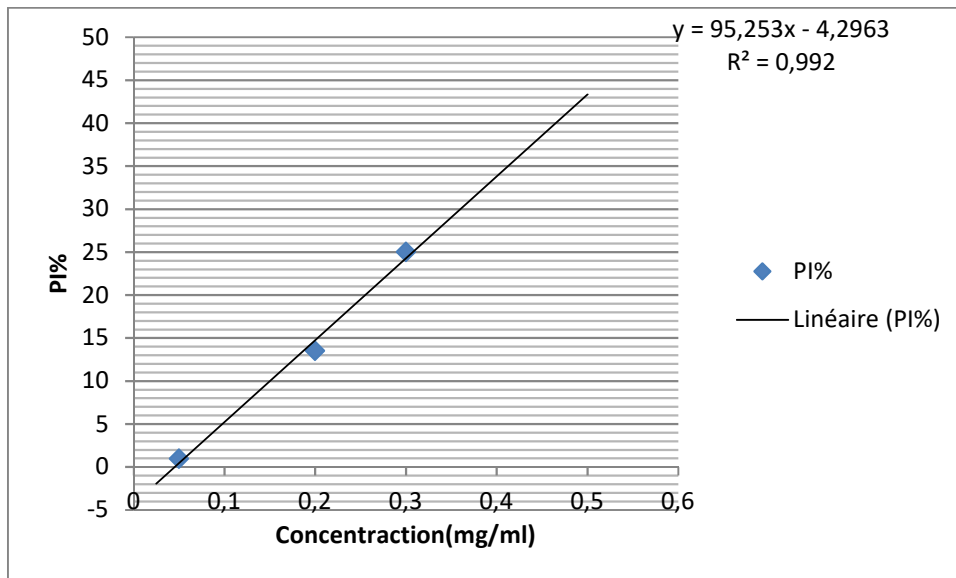


Figure 20 : Courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration A 4NphHcc

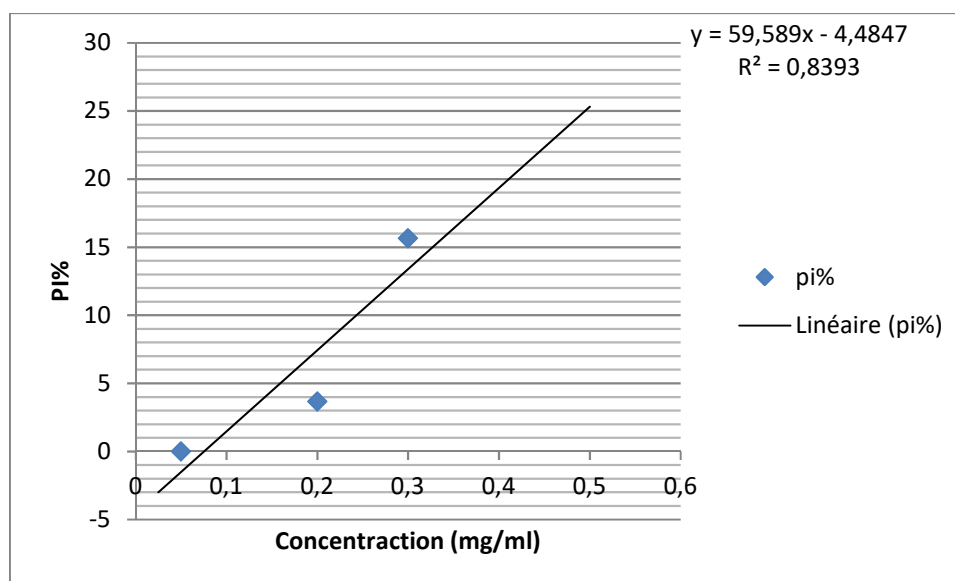


Figure 21 : Courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d'ANNphHcc

Pour chaque produit nous avons déterminé la valeur IC_{50} qui est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC_{50} sont calculées à partir de l'équation des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait testé et le standard utilisé dans l'étude ($Y=a x+b$), Tels que :

$$y = 50\% \text{ (pourcentage de réduction de DPPH).}$$

$$x=IC_{50} \text{ (la concentration inhibitrice en extrait et de l'acide ascorbique).}$$

Les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des produit et sont représentées dans les tableaux :

Tableau 9 : Les différentes concentrations inhibitrice $C_{50\%}$ des dérivées chromène (Produit synthétisé

Produit synthétisé	CI_{50}
AchphHcc	4.82
AchphNHcc	0.43
A ANphHcc	0.57
ANNphHcc	0.91

III.3.2. Dissucusion

On note que l'activité antioxydant exercée sur les radicaux libres DPPH des dérivés du chromène est dose-dépendante. En fait, il a été constaté que le taux d'inhibition des radicaux libres augmente avec l'augmentation de la concentration du produit

Afin d'évaluer l'activité antioxydant des produits synthétisé : AchPHcc , AchphNHcc, ANphHcc, ANNphHcc par le teste DPPH. Les résultats obtenus pour la méthode DPPH sont exprimés en termes de concentration inhibition de 50% des radicaux (IC_{50}). Une valeur faible d' IC_{50} indique une activité antioxydant forte. Les résultats montrent également que tous les produits ont une activité antioxydant important (anti-DPPH) qui varie d'un produit à l'autre.

On peut voir tout d'abord que l'activité anti-radicalaire du produit AchphNHcc a le IC_{50} le plus élevé (0.43mg/ml), suivit par ANphHcc (0.57mg/ml), ANNphHcc (0.91 mg/ml et l'activité la plus basse est de AchphHcc (4.82 mg/ml).

En comparant les CI_{50} des trois dérives synthétisée avec celle de l'acide ascorbique comme antioxydant de référence, on remarque que les produits synthétisés sont moins actifs par rapport l'acide ascorbique.

Partie expérimentale

Chapitre : III

Activité anticoagulants

Etude de l'activité anticoagulante

I. INTRODUCTION

L'activité anticoagulante des produits étudiée a été réalisée au sein du laboratoire d'analyses médicales MIROUH FERJIOUA. Cette activité a été évaluée in vitro vis-à-vis des deux voies de la coagulation (la voie Endogène et la voie exogène) sur un pool des plasmas normaux dé plaquettes et à l'aide de Deux tests chronométrique globaux, le test de temps de céphaline-kaolin (TCK) et le test de Temps de Quick (TQ).

II .Le matériel et les réactifs

Le matériel

- Micropipette
- Les tubes secs
- Balance
- Bain marie à 37°C
- Thermomètre
- Chronomètre
- Un croché
- Centrifugeuse

Les réactifs

- éthanol
- plasma
- prothrombine (TP)
- céphaline-kaolin (Ck)
- chlorure de calcium (CaCl₂)
- produits synthétisé

III. Méthode

III.1. Préparation de différentes concentrations de chaque produit

Peser 4 mg de produit 2-amino-4-(4-nitrophenyl)-4H-chromene-3-carbonitrile(A4NphHcc) et en mélange avec 1000 ul d'éthanol dans un tube sec, à chaque fois prélever 500 ul de solution préparer et complété par l'éthanol jusqu' à volume de 1000 ul pour obtenir quatre tubes de concentrations différentes (4mol/ul .2mol/ul .1mol/ul. 0,5 mol/ul)

Par la même manière en continuer la dilution les produits suivants :

- 2-amino-8-nitro-(4-nitrophenyl)-4H-chromène-3-carbonitrile (ANNphHcc)
- 2-amino-4-(2-nitrophenyl)-4H-chromène-3-carbonitrile(A2NphHcc)
- 2-amino-8-nitro--4-(2-nitrophenyl)-4H-chromene-3-carbonitrile(ANNphHcc)

- 2-amino-4-(4-chlorophenyl)-4H-chromene-3-carbonitrile(AchphHcc)
- 2-amino-4-(4-chlorophenyl)-8-nitro--4H-chromene-3-carbonitrile (AchphNHcc)

III.2. Préparation du pool plasmatique

Le pool plasmatique des plaquettes est un mélange de plasmas déplaquettes des 10 volontaires sains adultes non traités, dont les TQ et TCK sont normaux et comparables. Le sang de chaque volontaire est prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur une solution anticoagulante de citrate de sodium à 3,2 % et à raison de 1 volume pour 9 volumes du sang. Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes (PPP). Nous mettons (500 ul) plasma de chaque tube et les mélangeons. Le mélange de ces plasmas dans un (plasma standard) est conservé à basse température (-10C°) jusqu'à son utilisation¹

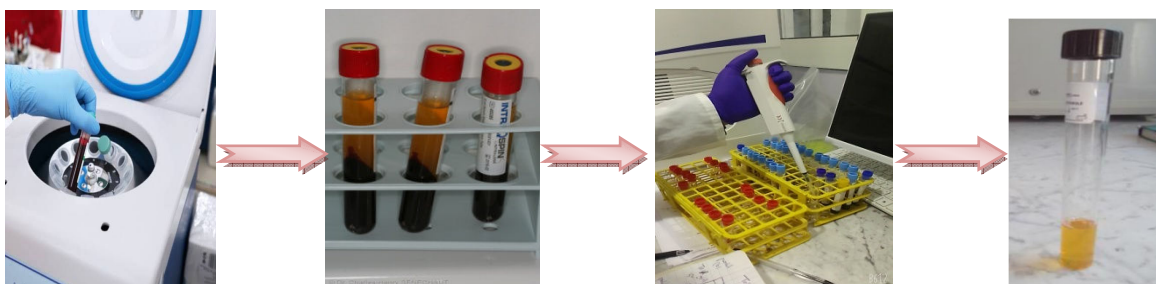


Figure22 : Etapes de préparation d'un pool de plasma déplaquettes

III.3.Méthode d'évaluation d'activité anticoagulante

III.3.1. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

❖ Principe

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation a été réalisée en utilisant le test du temps de céphaline-Kaolin (TCK)². Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 C° d'un plasma des plaquettes et citrate mis en présence de phospholipides (la céphaline) substitut du facteur 3 plaquettaire (F3P) d'un activateur du système contact (Prékalikriène, Kininogène de haut poids

¹Y Athukorala,K, WLee. S, KKim, et YJ Jeon.. Anticoagulant activity of marine Green and Brown algae collectefrome Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology*. 98: 1711–1716.(2007)

²RCaquet. 250 *examens de laboratoire : prescription et interprétation (9ème Ed)*, Masson (Paris). pp :388-389.2004.

Moléculaire et le facteur XII) qui est généralement le Kaolin et de calcium comme un facteur déclenchant

❖ Mode opératoire

Préparation de témoin : 10ul éthanol pré incubé pendant 15min et ajoute 100ul plasma en prélever 10 µl de solution dilué dans 4 tubes et incubé pendant 15min jusqu'à sécher.

L'activité des produits est établie sur 100µl de ce plasma qui est mélangé avec différents concentration de ces solutions ((4mol/µl .2mol/µl .1mol/ul. 0,5 mol/µl)) préparées à un volume donnée (10µl). Après 2 min. d'incubation à 37°C, 100µl de céphaline-kaolin est additionné au mélange qui est ré incubé durant exactement 3 min sous agitation à 37°C. Le temps de coagulation est alors déterminé à l'aide de chronomètre et un croché surveillé, le temps de formation de caillot est mesuré par ajout de 100 µl de chlorure de calcium (0,025M) préchauffé (**Figure 23**)³



Figure23 : Réactifs préparé pour l'évaluation de TCK (**Photo personnelle, 2022**)

III.3.2. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène (TQ)

❖ Principe

L'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation a été évaluée en Utilisant un test de coagulation appelé le temps de Quick (TQ) ou le taux de prothrombine (TP).Le temps de Quick consiste à comparer en présence de thromboplastine calcique, les temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes par rapport à un plasma témoin normal traité dans les mêmes conditions. Le temps de Quick est exprimé en secondes, ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37°C° d'un plasma pauvre en plaquettes en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine)

³J., F Wang., Z Wang., Zhang et X Shi., Synthesized différencedérivatives of Löw Molecular Fucoïdan entracteFromm Laminaria japonica and their potential antioxidant Activity in vitro. *Int j boil Macromol*; 44(5): 379-84.2009

et de calcium. Les facteurs de la voie exogène donc sont activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré.

❖ Mode opératoire

Préparation de témoin : 10 µl d'éthanol préincubé pendant 15 min est ajouté à 100 µl de plasma. En prélever 10 µl de solution diluée dans 4 tubes et incubé pendant 15 min jusqu'à sécher.

Les facteurs de la voie exogène sont donc activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré. 100 µl de plasma pauvre en plaquettes est mélangé avec différentes concentrations de leurs solutions diluées préparées (4 mol/µl, 2 mol/µl, 1 mol/µl, 0,5 mol/µl) à un volume donné (10 µl). Après 2 min d'incubation à 37°C, 100 µl de thromboplastine calcique (préchauffée au moins 15 minutes à 37°C) est additionné au mélange et alors à l'aide d'un chronomètre et un croché surveillé, le temps de formation de caillot est mesuré. Le résultat de TQ doit être comparé au temps du témoin normal, la valeur usuelle comprise entre 12 à 14 secondes.

IV. Résultats et discussion

IV.1. Résultats

IV.1.1. Etude de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

Analyse statistique de Temps de céphaline-Kaolin (TCK) présenté dans les tableaux suivants :

Tableau 10 : Temps de céphaline-Kaolin de différentes concentrations d'A2NphHcc

Témoin : 32,43s

Produit	A2NphHcc			
	T1	T2	T3	T4
Temps de céphaline-Kaolin (second)	38.38	40.5	35.8	36.32

Tableau 11 : Temps de céphaline-Kaolin de déférente concentration d'ANNphHcc

. Témoin : 32 ,43s

Produit	ANNphHcc			
	T1	T2	T3	T4
Temps de céphaline- Kaolin (second)	33	33	30	31

Tableau 12: Temps de céphaline-Kaolin de déférente concentration d'AchphHcc

Témoin : 32.43s

Produit	AchphHcc			
	T1	T2	T3	T4
Temps de céphaline- Kaolin (second)	30	32	31	33

Tableau 13: Temps de céphaline-Kaolin de déférente concentration d'AchphHccTémoin : 32.43s

Produit	AchphNHcc			
	T1	T2	T3	T4
Temps de céphaline- Kaolin (second)	32.35	33.83	35.05	37.28

Tableau 14 :Temps de céphaline-Kaolin de déférente concentration d'A4NphHccTémoïn : 32.43s

	A4NphHcc			
Produit	T1	T2	T3	T4
Temps de céphaline-Kaolin (second)	30.76	32.14	33.17	33.94

Tableau 15:Temps de céphaline-Kaolin de déférente concentration d'ANNphHcc Témoïn : 3.43s

	ANNphHcc			
Produit	T1	T2	T3	T4
Temps de céphaline-Kaolin (second)	28.37	31.31	32	32.51

IV.2.2.Etude de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène

Les résultats de Temps de Quick (TQ) présenté dans les tableaux suivants :

Tableau 16 : Le Temps de Quick de déférente concentration d'A2NphHccTémoïn : 14s

	A2NphHcc			
Produit	T1	T2	T3	T4
Le Temps de Quick(second)	16.80	17.42	20	21.26

Tableau 17 : Le Temps de Quick de déférente concentration d'ANNphHcc. **Témoïn : 14s**

	(ANNphHcc)			
Produit	T1	T2	T3	T4
Le Temps de Quick(second)	16.80	15.9	16.9	20

Tableau 18 : Le Temps de Quick de déférente concentration d'AchphHcc. **Témoïn : 14s**

	AchphHcc			
Produit	T1	T2	T3	T4
Le Temps de Quick(second)	17.56	16.58	15.95	16.30

Tableau 19 : Le Temps de Quick de déférente concentration d'AchphNHcc. **Témoïn : 14s**

	AchphNHcc			
Produit	T1	T2	T3	T4
Le Temps de Quick(second)	13.71	14.76	16	18.94

Tableau 20 : Le Temps de Quick de déférente concentration d'A4NphHcc. **Témoïn : 14s**

	A4NphHcc			
Produit	T1	T2	T3	T4
Temps de Quick(second)	15.13	14.11	15.42	14.90

Tableau 21 : Le Temps de Quick de déférente concentration d'ANNphHcc. **Témoin : 14s**

	ANNphHcc			
Produit	T1	T2	T3	T4
Temps de Quick(second)	13.92	13.59	13.58	13.46

IV.2.Discussion

Les résultats de l'activité anticoagulant des produit (ANphHcc ; ANNphHcc ; AchphHcc ; AchphNHcc) révèlent qu'il existe une Inhibition modéré de la coagulation (**TQ**), un effet presque identique quelques soit la dilution par contre les résultats de temps de Quick (tableau 20.21) aucun effet n'apparaître

Les temps de coagulations (TCK) Céphaline-kaolin (ANNphHcc ; AchphHcc; A4NphHcc ; ANNphHcc) révèlent aucun effet n'apparaître par rapport les temps de coagulations de la voie exogène



**CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**

Conclusion et perspectives

Ce travail est réalisé au Laboratoire de centre universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila, et laboratoire d'analyse Dr .H MIROUH.

L'objectif principal a porté sur l'évaluation des activités anti-oxydant et anticoagulant des produits synthétisés de dérivé de chromène

Dans une première partie, nous avons synthétisé des nouveaux produits de dérivé des chromène à partir différents dérivés de benzaldéhyde avec le phénol et le nitrophénol en présence de K_2CO_3 comme catalyseur, recristallisé dans un mélange de l'éthanol et l'eau distillé en utilisant la méthode de Grinston.

Dans une deuxième partie, Nous avons étudié le pouvoir antioxydant des composés et par la capacité de piégeage du radical DPPH. Les résultats obtenus est révèlent que le produit AchphNHcc a présenté une meilleur activité antioxydant avec une valeur de la CI_{50} de l'ordre de 0,43 mg/ml, mais cette valeur est supérieure à celle de l'acide ascorbique.

Dans une troisième partie, nous avons évalué l'effet anticoagulant du déférent produit synthétisé *in vitro* vis-à-vis la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide de deux tests chromométriques, le TCK et le TQ.

La dose d'une dernier dilution (0,5mg/ml) de (A2NphHcc ; ANNphHcc ; AchphHcc ; AchphNHcc) de(TQ) est suffisant pour donné cet effet modéré de inhibitions et on pas besoin d'augmenter la concentration. Alors que les produits ANNphHcc ; AchphHcc; A4NphHcc ; ANNphHcc de (TCK) ne possède aucune activité anticoagulant.

Notre travail présente une contribution à l'étude des dérivés de chromène. Au-delà des résultats obtenus, il est souhaitable de compléter et d'approfondir ce travail par le développement d'autres structures de molécules et d'autre activité tel que l'activité antibactérienne, l'activité anti enzymatique...

Références bibliographique

- A Plaziat-Decoucel, Les anticoagulants. *Thèse de doctorat en pharmacie*. Université Henry Poincaré– De Caterina1; 1Steen Nancy, Faculté de pharmacie, 2009.
- A.Khaskel. *A single step, mild, environ mentallyfriendly green method has been developed for the synthesis of physiologically active 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-ones* .RSC adv.4, 2014.
- A.E Vogler, et Siedlecki, A. C, *Contact activation of blood-plasma coagulation*, Biomaterials,30(10),2009.
- A.MEDDOUR, M.YAHIA, N.BENKIK., A.AYACHI, *Étude de l'activité antioxydant antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparis spinosa l.* Lebanese Science Journal. Vol 14 (1), 2013.
- AGadaw,. V., Joubert, and C. FHansmann, *Comparaison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (Aspalathus linearis), α -Tocopherol, BHT, and BHA*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 45, 1997.
- Angappa. S. Keri et Al, *Chromones as a privileged scaffold in drug discovery: A review*, European Journal of Medicinal Chemistry, V 78, 2014.
- AWIKA J M., ROONEY L W., *Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health*. Photochemistry. (65), 2004.
- B FREI., R STOCKER., L ENGLAND., BN AMES. *Ascorbate the most effective antioxidant in human blood plasma*. Adv. Med. Exp. Biol, 1990.
- BA K., TINE E., DESTAIN J., CISSE C., THONART P., *Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. Vol 14(1), 2010.
- Boutakiout, D. Elothmani. <https://www.researchgate.net/publication/280255635>, 2015 consulté le 13/06/2022.

Références bibliographique

- CHOI, kyu, Pal, 824-20, Yuoksam –dong kangnam-ku suoul-135-080 (KR) Recaved at international Bureau,1999.
- D. Durand, M. Damon, and M. Gobert, “Le stress oxydant chez les animaux de rente: principes généraux, CAHIERS DE NUTRITION ET DE DIÉTÉTIQUE, Vol 48 - N° 5, 2013.
- Dziejulska-Ku łączkowska, A. Bartyzel., Structural and physicochemical properties of 3-(3-carboxyphenylaminomethylene)-2-methoxychroman-4-one, Journal of Molecular Structure;,2013.
- E OSKOUÉIAN, N ABDULLAH, R HENDRA, E KARIMI. Composés bioactifs, antioxydant, la xanthine oxydase inhibiteur, inhibiteur de la tyrosinase et anti-inflammatoires de la sélection agro-industriel des sous-produits. (12), 2011.
- Fernandez. M. T., Mira. M. L., Florencio. M. H., Jennings. K. R.;J. Inorg, Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity, Biochem, Free Radical Research, Res, vol. 36 2002.
- G CAO., H M ALESSIO., R G CULTER, Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidant free radicals. Biol. Med. (14), 1993.
- G. Bringmann, R. Walter et R. Weirich. *The directed synthesis of biaryl compounds : modern concepts and strategies*. Angew. Chem. Int. Ed. E,gl, 1990.
- G.TKroyer ,*Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient innovative. Food Science and Emerging Technologies*, 5, 2003.
- H. J. Kabbe, Widdig. A;Angew. Chem, Int. Ed. Engl, 1982.
- Hester L. van Lingen, Wei Zhuang, Tore Hansen, Floris P. J. T. Rutjes and Karl Anker Jørgensen, Formation of optically active chromanes by catalytic asymmetric tandem oxa-Michael addition–Friedel–Crafts alkylation reactions, Organic & Biomolecular Chemistry, 11, 2003.
- [http :http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe](http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe), consulté le 13/06/2022.
- J Bruneton;Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales, 3ème édition, Tec & Doc, Paris, 1999.
- J. Haleng, J. Pincemail, J. O. Defraigne, C. Charlier, and J. P. Chapelle, “Le stress oxydant,” Rev Med Liege, vol. 62, 2007.

Références bibliographique

- J. P. Zegarac, “Antioxidants: Mechanisms of Action and Effectiveness, brunswicklab, 2016. [Online]. Available: <https://brunswicklabs.com/blog/antioxidants-mechanisms-of-action-and-effectiveness>.
- J., Caen. M.J., Lrrieu. EtM Samama..L’hémostase: méthodes d’exploration et Diagnostic pratique (2ème éd), *Expansion Scientifique Française* (Paris), 1975.
- J., F Wang., Z Wang., Zhang et X Shi., *Synthesized différente dérivatives of Löw MolecularFucoidan entracte Fromm Laminariajaponica and theirpotential antioxidant Activity in vitro*. Int j boillMacromol; 44(5), 2009.
- J.-Y, Wang, H Zhang, Y.-H Liao, W.-C.Yuan, Y.-J.Feng, and X -M Zhang, Synlett, 2012.
- JF Schved., *Hémophilie: physiopathologie et bases moléculaires*, -RaffaeleHusted; Lars Wallentin; Felicita Andreotti; Harald, 2008.
- JIRI S., MARKETA R., OLGA K., PETR S., VOJTECH J., LIBUSE T., LADISLAV H., MIROSLAVA B., JOSEF Z., IVO P., RENE K., FullyAutomatedSpectrometricProtocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molécules*. (15), 2010.
- L Hong, L Wang, W Sun, K Wong, and RJWang, *Org. Chem*, 2009.
- L.K., Silva. J.N., Cavaleiro. J.A.S., Freitas. J.P., Mazière. J.-C., Santus. R., P .M Morlière, *Biochem, Pharmacol*, 2009.
- M. A. Basha, B. Datta, *Mechanochemistry : An efficient method of solvent free synthesis of 3-amino-2,4-dicarbonitrile-5- methylbiphenyls*, *Journal of saudi Chemical Society*, 2014.
- M.Fridén-Saxin., N Pemberton, K. Andersson. Da. S, C.Dyrager, A.Freiberg,M.Grötli., K.Luthman.; Synthesis of 2-alkyl-substituted chromonederivativesusingmicrowave irradiation, *Org. Chem*, V74, 2009.
- M.GHAISAS, V.NAVGHARE, A.TAKAWALE, V. ZOPE, DESHPANDE A. In-vitro antioxidant activity of tectona grandis lin. *Pharmacologyonline*. (3), 2008.
- M.NUR ALAM, N. BRISTI, M.RAFIQUZZAMAN. Review on in vivo and in vitro methods évaluation of antioxidant activity, (21), 2013.
- N. TsumbuCesar, G. Deby-Dupont, M. Tits, L. Angenot, M. Frederich, S. Kohnen, A. Mouithys-Mickalad, D. Sertheyn and T. Franck., “Polyphenol content and

Références bibliographique

- modulatory activities of some tropical dietary plant extracts on the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, 2012.
- N. Es-Safi, A. Kollmann, S. Khelifi, and P. H. Ducrot, *P.H. Antioxydative effect of Compounds isolated from Globularia alypum L. Structure activity relationship*. *L.W.T.*, 40, 2007.
 - O. U. B., M. WOODILL., R. L. PRIOR., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (49), 2001.
 - P. Filipe et al, The alkyl chain length of 3-alkyl-3',4',5,7-tetrahydroxyflavones modulates effective inhibition of oxidative damage in Biological systems: illustration with LDL, red blood cells and human skin keratinocytes, *Biochemical Pharmacology*, BCP 10026, 2008.
 - P. MOLYNEUX, J. SONGKLANAKARIN. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Sciences Technology*. Vol 26 (2), 2004.
 - Pench L. Peut-on prendre le risque hémorragique par le biais d'un interrogatoire Médical? *Thèse de doctorat en chirurgie dentaire*, Université Toulouse III, Faculté de Chirurgie dentaire, 2015.
 - POPOVICI C., SAYKOVA I., TYLKOWSKI B., Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, 2009.
 - R. Ajjan., P. J. Grant., Coagulation and atherothrombotic disease, *Atherosclerosis*, 2006.
 - R. L. PRIOR, H. HOANG, GU L., Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC (FL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* (51), 2003.
 - R. Caquet. *250 examens de laboratoire : prescription et interprétation*, (9ème Ed), Masson (Paris), 2004.
 - S. Maho. K. Yoshiyuki; Enhancing effects of a chromone glycoside, eucryphin, isolated from *Astilbe* rhizomes on burn wound repair and its mechanism, *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, V 17, 2010.
 - S. Cavar, M. Maksimovic, D. Vidic. & A. Paric. *Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of Aetemisiana L.* From Bosnia, *Industrial Crops and Products*. 37, 2009.

Références bibliographique

- S.ATHAMENA, I.CHALGHEM, A.KASSAH-LAOUAR, S. LAROUI, S.KHEBRI, Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de Cuminumcyminum L. Lebanese Science Journal. Vol 11 (1), 2010.
- T Revel, et K Doghmi., *Physiologie de l'hémostase EMC-Dentisterie I*, Vol 1(01), 2004.
- V. LINGLETON, J A.ROSSI, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Technology and Viticulture. (16), 1965.
- W.BRAND-WILLIAMS, M E. CUVELIER, C.BERSET, Use of a free radical méthode to évaluât antioxydant activity. LebensmittelWissenschaft und Technologie, 1995.
- X Jiang, Wu L. Y Xing, L Wang, S Wang,., Z Chen. and R Wang, Tailored performance of layered transition metal dichalcogenides via integration with low dimensional nanostructures, Chem. Commun, V7, 2012.
- X.-S Wang, C.-W Zheng, S.-L Zhao, Z.Chai, G. Zhao, and G .S, Yang,-Tetrahedron Asymmetry, 2008.
- Y. Athukorala .., K,W Lee ., S ,K Kim, et YJ Jeon.. *Anticoagulant activity of marine Green and Brown algae collected from Jeju Island in Korea*, Journal of Bio resource Technology, 98, 2007.
- Y. ROLLAND, Actualités des lipides en cosmétique, Antioxydants naturels végétaux, OCL. Vol 11(6), 2004.
- Yukiko, Y., Masaru. W., Akinori. N; Mitsui Chemicals Inc, Japan; Brevet JP, 2000.

ملخص

تعتبر Chromène فئة من المركبات ذات أهمية ملحوظة ، بسبب إمكاناتها الدوائية واهتمامها كمواد وسيطة في التخليق العضوي.

الهدف العلمي المقدم في هذه الأطروحة يتعلق بالمنتجات المركبة مثل benzopyrane (chromene). الأطروحة مركبات كيميائية جديدة من مختلف الدوائيات غير المتجانسة تستخدم بشكل رئيسي تطوير منهجيات بسيطة واقتصادية في التركيب الكيميائي للتحضير على وجه الخصوص مشتقات الكروم ، ولتقييم نشاط مضادات الأكسدة بطريقة DPPH ، والنشاط المضاد للتخثر عن طريق الطريق تجاه الداخل زمن Céphaline - Kaolin (TCK) ، وعن طريق تجاه الخارج زمن كويك (TQ).

الكلمات الرئيسية: Chromène، النشاط المضاد للأكسدة، نشاط مضاد للتخثر

Abstract

Chromenes are considered a class of compounds of remarkable importance, due to their pharmacological potential and their interest as intermediates in organic synthesis.

The scientific objective presented in this work concerns the antioxidant evaluation as well as the anticoagulant activity of synthesized 2-amino-4-(4-chlorophenyl)-4 H-chromene-3-carbonitrile derivatives.

The synthesis of the products was carried out using mainly a simple and economical chemical synthesis methodology, particularly for the preparation of Chromene derivatives.

The evaluation of the antioxidant activity was carried out using the DPPH method. The anticoagulant activity by route towards endogenous (céphaline-kaolin time TCK), and by route towards exogenous (Quick TQ time) were carried out on blood samples from ten volunteers.

Key words: Chromene, antioxidant activity, anticoagulant activity

Résumé

Les chromènes sont considérés comme une classe de composés d'une importance remarquable, en raison de leur potentiel pharmacologique et de leur intérêt comme intermédiaires en synthèse organique.

L'objectif scientifique présenté dans ce travail, concerne l'évaluation antioxydant ainsi l'activité anticoagulante des dérivés de 2-amino-4-(4-chlorophenyl)-4 H-chromène-3-carbonitrile synthétisés.

La synthèse des produits a été réalisée en utilisant principalement une méthodologie de synthèse chimique simple et économique, pour la préparation particulièrement des dérivés de chromène.

L'évaluation de l'activité antioxydant a été réalisée en utilisant la méthode DPPH. L'activité anticoagulant par voie vis-à-vis endogène (le temps de céphalin-kaolin TCK), et par voie vis-à-vis exogène (le temps de Quick TQ) ont été effectuées sur des échantillons de sang de dix volontaires.

Mots clés: Chromène, activité antioxydant, activité anticoagulante.