

Le but de cette partie repose sur:

- la synthèse des ligands bases de Schiff,
- Le test et l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des substances synthétisées au laboratoire de microbiologie et biochimie de l'université de M'sila.

3.1. Matériel et Produits

Le Matériel

- Ballon de 100 ml
- Réfrigérant
- Plaque chauffant
- Étuve (memmert)
- Spectrophotomètre (SHIMADZU)
- Micropipette
- Balance de précision (KERN)
- Incubateur (memmert)
- Spectroscopie UV-visible (UV-vis)
- Spectroscopie infra rouge (IR)

Les produits

- 4,4 diaminodiphynelméthane
- 4- hydroxybenzhydrazide
- 2.3 hydroxybenzaldehyde
- 2.5 hydroxybenzaldehyde
- 2-formylamino-pyridin
- 4 phenylthiosemiarbazide
- 5 amino-1,3,4-thiadiazole-2-thiol
- acide ascorbique
- 2.2 diphenyl -1- picrylhydrazyl

Les Solvants utilisés

Tableau 1: Les propriétés physiques de différent solvants utilisés.

| Propriétés | solvants | | | | | |
|------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | Éthanol | DMSO | Méthanol | DMF | DCM | Diethylether |
| Formule chimique | C ₂ H ₆ O | C ₂ H ₆ OS | CH ₄ O | C ₃ H ₇ NO | CH ₂ CL ₂ | C ₄ H ₁₀ O |
| Masse molair (g /mol) | 46.06 | 78.13 | 32.04 | 73.09 | 84.93 | 74.12 |
| Densité (g/cm ³) | 0.790 | 1,0993 | 0.2715 | 0.945-0.950 | 1.325 | 713.40 |
| Point d'ébullition (C°) | 78.3-78.8 | 190,85 | 64-65 | 153-154 | 39.6 | 39.5-40.5 |

3.2. Les méthodes d'analyse

3.2.1. Spectroscopie UV-visible (UV-vis)

L'absorption des radiations lumineuses par la matière dans la plage spectrale s'étendant du proche ultraviolet au très proche infrarouge, soit entre 180 et 1100 nm, a été abondamment étudiée d'un point de vue fondamental. Cette partie du spectre est désignée par l'« UV/Visible », parce qu'elle englobe les radiations perceptibles par l'œil humain (Francis et Annick, 2004).

Loi de Beer-Lambert : L'absorbance d'un rayonnement monochromatique est proportionnelle à la longueur du trajet d'absorption en cm et à la concentration de l'espèce dans le milieu exprimée généralement. On a donc la relation:

$$A = \epsilon l c$$

ϵ : Coefficient d'absorption molaire du composé à une longueur d'onde exprimé en ($\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (Mesplède et Saluzzo, 2004).

3.2.2. Spectroscopie infrarouge (IR)

Bien que le spectromètre d'absorption dans l'infrarouge puisse être utilisé pour l'observation de spectre de rotation ou même de spectres électroniques (Lynch, 2001).

3.3. Synthèse et caractérisation:

Cette partie est consacrée pour la synthèse et la caractérisation des ligands base de Schiff. 09 ligands base de Schiff ont été synthétisés, le protocole utilisé pour la synthèse a été décrit par (Issaadi *et al.*, 2005) selon la réaction suivante:

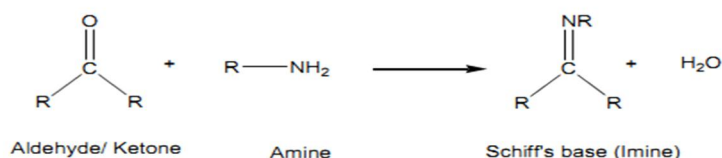


Figure 16: La formation de ligand base de Schiff (Rudrapal et De, 2013).

3.3.1. Synthèse

Dans un ballon de 100 ml de volume muni un réfrigérant on dissout 1 mmole de 4,4-diaminodiphényl-méthane (0.198 g) dans 5 ml éthanol. Après la solubilité totale et sous une agitation magnétique on chauffe à 50°C, puis on ajoute goutte à goutte à l'aide d'une pipette pasteur 2 mmole (0.276 g) de 2,5 hydroxybenzaldehyde dissout dans 10 ml éthanol. On laisse le mélange s'agite au reflux pendant 3 heures. Le produit obtenu est sous forme d'un précipité solide de couleur orange clair, on récupère le produit par la filtration sous vide on lave bien par

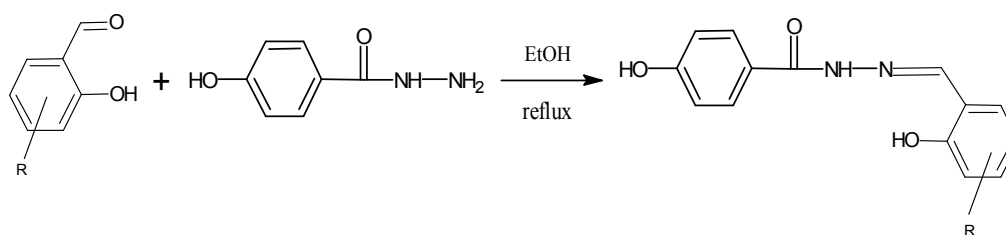
l'éthanol. On le recristallise dans l'éthanol et sèche dans une étuve à 70°C pendant 24 heures. Le rendement de la réaction a été estimé de 74%.

Même protocole pour a₁, a₂, a₃, b₁, b₂, c₁, c₂, c₃.

Tableau 2: Les propriétés physiques des différents ligands base de Schiff.

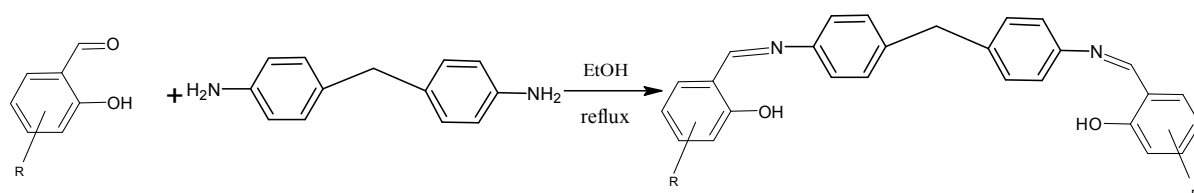
| Ligands | couleur | Rendement | Points de fusion (°C) |
|----------------|----------------------|-----------|-----------------------|
| b ₃ | Rose | 74% | 210 |
| a ₃ | rouge brique | 32,63% | >260 |
| b ₂ | Jaune | 69% | 200 |
| a ₂ | Orange | 44,39% | 250 |
| b ₁ | Orange clair | 50.34% | 200 |
| a ₁ | marron foncé | 14,17% | 234 |
| c ₂ | Blanc | 72% | 230 |
| c ₃ | Blanc | 68% | 230 |
| c ₁ | Cristaux transparent | 65% | 134 |

La série 1:



a₁: R=3-OH, **a₂:** R=4-OH, **a₃:** R=5-OH

La série 2:



b1: R=3-OH, b2: R=4-OH, b3: R=5-OH

La série 3:

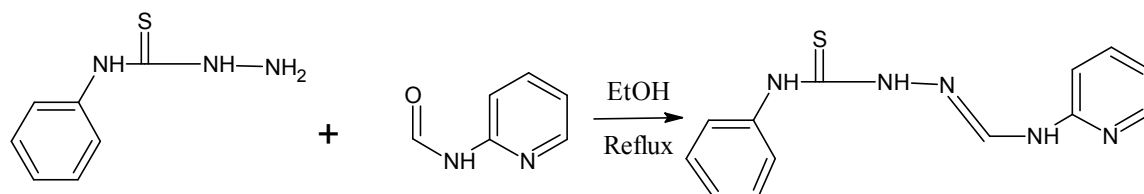
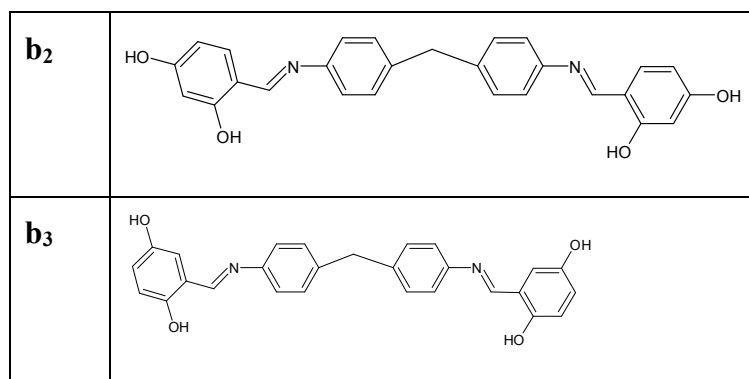


Figure 17: La formation des différents ligands base de Schiff synthétisé.

Tableau 3: Les différentes séries des produits synthétisés.

| Nom | Série 1 | Nom | Série 3 |
|----------------|----------------|----------------|---------|
| a ₁ | | c ₁ | |
| a ₂ | | c ₂ | |
| a ₃ | | | |
| | Série 2 | | |
| b ₁ | | | |



3.3.2. Caractérisations des ligands base de Schiff

3.3.2.1. Spectroscopie infrarouge

Le spectre d'infrarouge représenté dans la figure 18 montre les principales bandes d'absorption caractéristiques de ligands base de Schiff. Le spectre des ligands expose les principales bandes caractéristiques de vibration dans le tableau suivant:

Tableau 4: Principales bandes caractéristiques de l'IR pour le composé a₁.

| Fraction | Bande d'absorption (cm ⁻¹) | Intensité |
|-----------------|--|----------------|
| C-H aromatique | 3062.7 | Variable |
| C-H aliphatique | 3062 | Faible |
| C=N | 1558 | Moyenne à fort |
| C=C | 1512 | Faible |
| C=O | 1616 | Moyenne |
| N-H | 3247.9 | Moyenne |

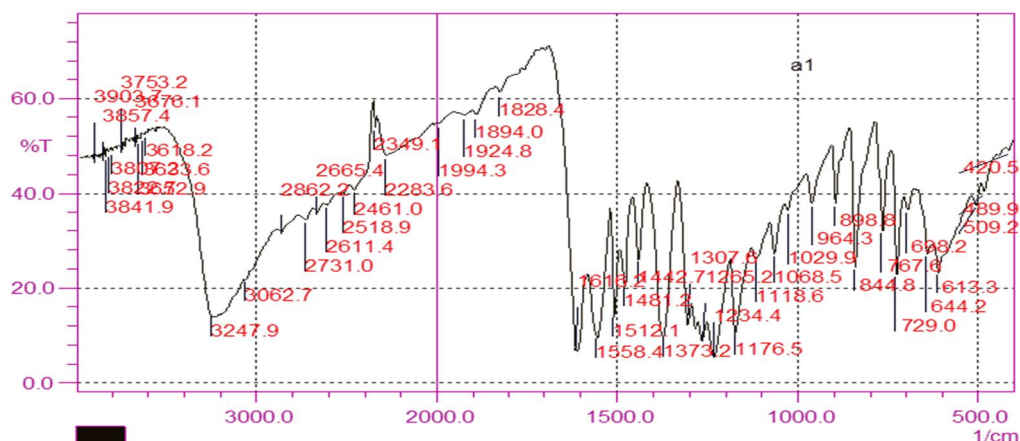


Figure 18: Spectre infrarouge de ligand a1 base de Schiff.

3.3.2.2. La spectrophotométrie UV-vis

Tableau 5: Valeurs numériques de (λ_{max} et absorption (A)).

| NO | λ (nm) | Abs |
|----|------------------------|--------|
| 1 | 307,00 λ_{max} | 0,2946 |
| 2 | 253,50 | 0,0736 |
| 3 | 224,00 | 0,0659 |
| 4 | 203,00 | 0,1002 |

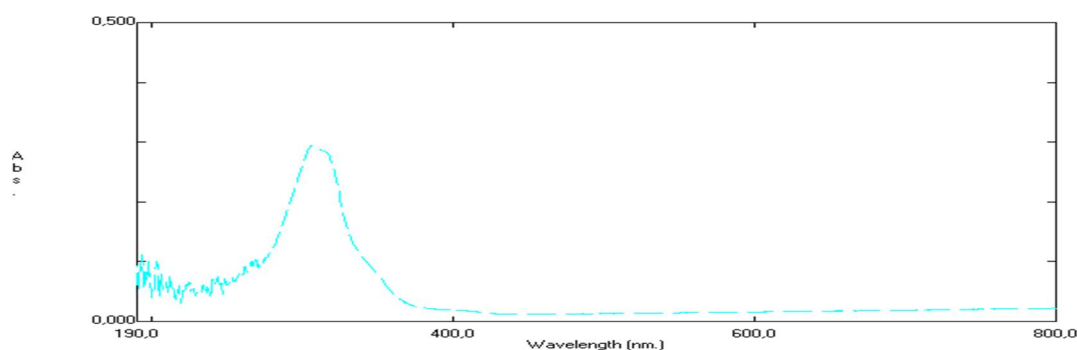


Figure 19: Le Spectre UV-visible de ligand a1 base de Schiff.

3.4. Les activité biologiques

L'évaluation de l'activité biologique des produits préparés est l'un des méthodes pratiques utilisées pour mesurer la tendance des produits d'être un bioactif. Les bases de Schiff, faisaient l'objet de ce travail qui est la recherche de nouveaux composés biologiquement actifs suscite un

intérêt de plus en plus croissant, notamment dans le domaine pharmaceutique. C'est pourquoi nous avons souhaité d'évaluer l'activité antibactérienne de nos produits préparés vis-à-vis de diverses souches bactériennes choisies.

Différentes stratégies ont été employées. Ainsi, de nouvelles générations de ligands base de Schiff ont été développées. Cependant, ces nouveaux composés sont souvent de structures proches de celles de molécules déjà existantes. La stratégie suivie consiste à découvrir de nouvelles classes de ligands base de Schiff ayant un mécanisme d'action inédit. Ainsi, la recherche de structures optimales en utilisant des logiciels de simulation de ces produits permet de trouver la relation structure-activité qui est considérée comme un point d'appui pour atteindre des résultats avec un succès inattendu et peuvent conduire à l'émergence de nouvelle classe de molécules de structures inédites.

De nombreuses méthodes sont disponibles pour tester l'activité biologique des produits nouvellement synthétisés ou des composés naturels (Fisch *et al.*, 2003). Les antioxydants ou les essais de piégeage des radicaux libres, les tests antimicrobiens (par exemple, antifongique, antibactérien, etc.), et les tests de cytotoxicité sont parmi les nombreux tests disponibles pour les essais biologiques. Dans tous (ou plus) ces tests, un test de contrôle, qui omet l'échantillon d'essai ou l'emploi d'un composé avec une activité biologique connue, est utilisé pour comparaison.

3.4.1. Activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des produits obtenus ($a_1, a_2, a_3, b_1, b_2, b_3, c_1, c_2$ et c_3) est effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie.

Le but de cette étude est de voir l'évolution antibactérienne de nos produits sur les différentes souches bactériennes.

L'identification des souches que nous avons utilisées a été au préalable confirmée par les services de Microbiologie du complexe Antibiotical SAIDAL de Médéa, et de l'Institut Pasteur.

3.4.1.1. Technique d'étude sur milieu solide

Cette technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou encore méthode des disques. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiales (Boudjemaa *et al.*, 2010). Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par

l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée de produit à tester (Figure 20).

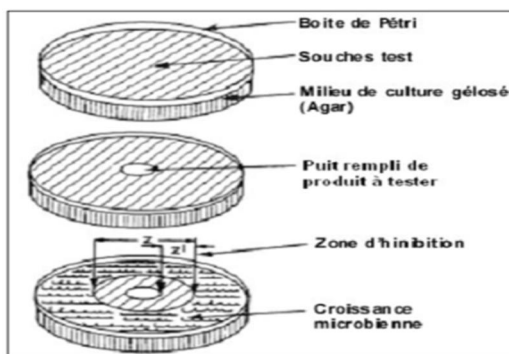


Figure 20: méthode de diffusion sur boîte Pétri.

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque antibiotique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

❖ **Micro-organismes utilisés:**

Nous avons choisi de travailler sur une large gamme de micro-organisme afin de donner une idée sur l'étendue du champ d'activité antibactérienne de nos produits.

8 souches de référence ATCC ont été testé

- Staphylococcus aureus* ATCC 65 38
- Staphylococcus epidermidis* ATCC 12 228
- *Bacillus subtilis* ATCC 93 72
- Bacillus cereus* ATCC 10 876
- *Enterococcus faecalis* ATCC 20 35
- Micrococcus luteus* ATCC 533
- *Escherichia coli* ATCC 25 922
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43 52

3.4.1.2. Mode d'opérateur

Méthode de disque (diffusion de disque): La technique de disque (également appelée la méthode diffusion de disque ou la méthode de l'antibiogramme) (Andrews, 2001) est couramment utilisée par les chercheurs pour étudier l'activité antibactérienne des antibiotiques, des extraits de plantes et d'autres composés chimiques.

A. Préparation de l'inoculum

❖ Préparation de pré-culture

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce dans un milieu liquide (bouillon Trypticase Soja). Après incubation pendant 24 h à 37°C, un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de Pétrie contenant de la gélose Trypticase Soja puis, incubées à 37°C pendant 24 h.

❖ Préparation des suspensions

Les suspensions bactériennes ont été réalisées par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18 h, les mettre ensuite dans 5 ml d'eau physiologique stérile, puis agiter au vortex pendant quelques secondes.

Les concentrations des inoculums sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la lecture de la Densité Optique (DO à 620 nm) par un spectrophotomètre. Selon MAC FARLAND [1907], on admet qu'une DO comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de 10⁷ à 10⁸ UFC/ml pour les bactéries. La standardisation des suspensions à 10⁶ UFC/ml pour les bactéries est réalisée en diluant les suspensions à l'eau physiologique stérile.

Pour évaluer l'activité antibactérienne de nos produits (a_1 ; a_2 ; a_3 ; b_1 ; b_2 ; b_3 ; c_1 ; c_2 ; c_3) nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose (Benjelali, 1986).

B. Test de sensibilité aux antibiotiques: antibiogramme

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet des ligands base de Schiff. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés de ligand base de Schiff.

Nous avons utilisé un antibiotique: Amoxicillin clavulanic acid 20/10 µg (AMC 30).

C. Test de sensibilité aux ligands base de Schiff

Nous avons utilisé la gélose aux peptones de caséine et de soja (TSA). Le milieu de culture gélosé en surfusion est coulé dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, à raison de 15 ml par boîte.

L'ensemencement a été réalisé en écouvillonnant trois fois toute la surface de la gélose en faisant tourner la boîte de 60° à chaque fois pour assurer une répartition uniforme de l'inoculum (ensemencement en nappe).

Des disques de papier Wattman stériles (6 mm de diamètre) ont été imprégnés avec 25 µL du ligand bases de Schiff (0.02 g/ml) et on laisse sécher puis on place sur des boîtes de Pétri. Les boîtes ont été laissées au repos à 4°C pendant 2 h avant l'incubation avec les agents microbiens à tester (Matar *et al.*, 2013).

Après l'incubation et à l'aide d'une pince stérile, les disques de cellulose stérile sont déposés à la surface de la gélose ensemencée à raison de trois disques par boîte. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à la température ambiante pendant 30 mn, et mises à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Au cours de l'incubation, l'échantillon se diffuse radialement à partir des disques de papier Wattman dans la gélose, tandis que le micro-organisme se reproduit pour former une pelouse uniforme sur toute la surface de la gélose. La zone d'inhibition de croissance microbienne ou d'une zone de diffusion radiale est mesurée en millimètres et les résultats des échantillons d'essai par rapport à celle d'un témoin positif tel que l'AMC 30 (Pelczar *et al.*, 1993; Andrews, 2001; Furones, 2001; Cimanga *et al.*, 2002; Gülgür *et al.*, 2003; Shivankar *et al.*, 2003)

L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre.

3.4.2. Activité antioxydante

En présence des piégeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2 diphenyl -1- picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl -1-picryl hydrazine de couleur jaune (Maataouiet *al.* 2006).

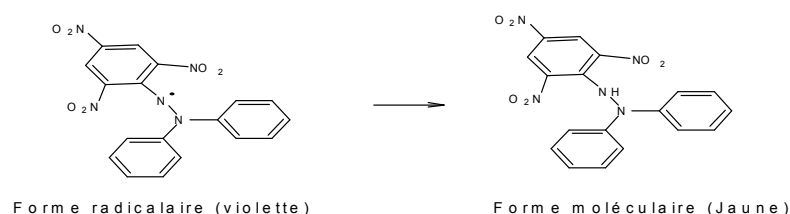


Figure 21: Mécanisme de transfert d'électrons dans le radical libre DPPH.

L'activité des ligands base de Schiff synthétisés vis-à-vis le radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par Zhang et ses collaborateurs (2011). Dans des tubes à essai on introduit 0.1 ml de chaque ligand bases de Schiff (solubilisé dans le DMF) à différentes concentrations et 3.9 ml de la solution méthanolique de DPPH (0.004% P/V), après l'agitation par un vortex, les tubes sont incubés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentage (%) en utilisant la formule suivante:

$$\% = \left(1 - \frac{(\text{Abs Échantillon})}{(\text{Abs Contrôle négatif})}\right) \times 100$$

Où :

%: pourcentage de l'activité anti-radicalaire;

Abs Échantillon: absorbance de l'échantillon;

Abs Contrôle négatif: absorbance du contrôle négatif;

L'activité antioxydante est ainsi exprimée comme IC₅₀. Les valeurs d'IC₅₀ ont été obtenues par l'interpolation à partir d'une analyse de régression linéaire avec 99.989% de niveau de confiance. L'IC₅₀ est définie comme la concentration suffisante pour piéger 50% des radicaux libres DPPH. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n = 3). BHT et l'acide ascorbique ont été utilisés comme contrôle positif. Chaque essai a été répété trois fois. Le résultat moyen et le niveau type ont été signalés.

3.5. Test statistiques

Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft Excel 2010, les résultats de l'activité antibactérienne et l'antioxydante sont exprimées en moyenne ± SEM. Les valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [(% inhibition=f(concentration))]. les sigmoïdes du dosage et de l'activité

antiradicalaire des différents standard et composé sont effectués par le logiciel (Graph Pad prism 6).

Le différence entre les différents extraits est déterminés par ANOVA univarié suivi du test de Student pour la comparaison et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0,05$ sont considérées statistiquement significatives.