

**République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique**

**Université des Frères Mentouri- Constantine**

**Faculté Des Sciences Exactes**

**Département De Chimie**

N°d'ordre :.....

Série :.....

**Thèse**

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en sciences

**Spécialité: Chimie Organique**

**Intitulé :**

**Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Tetraclinis articulata* de la famille des Cupressaceae et Synthèse d'acides aminés et de peptides thioglycosylés par couplage de Buchwald-Hartwig**

**Par**

**Mr : ABABSA Zine El Abidine**

**Devant le Jury :**

**Président:** Professeur Salah AKKAL ; Université des Frères Mentouri-Constantine.

**Rapporteur:** Professeur Kamel MEDJROUBI ; Université des Frères Mentouri-Constantine.

**Co-Rapporteur:** Docteur Samir MESSAOUDI ; Chargé de Recherche 1ère classe-CNRS, Université paris-sud.

**Examineurs:** Professeur Ammar ZELAGHI ; Université Larbi Ben M'hidi-Oum El Bouaghi.

Professeur Mahieddine MOKHTARI ; Université Larbi Ben M'hidi-Oum El Bouaghi.

**Date de la soutenance: 09 janvier 2017**

# Remerciements

Je remercie vivement professeur Kamel MEDJROUBI d'avoir encadré mon travail, son soutien a été d'une grande envergure.

Je remercie Docteur Samir MESSAOUDI pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire à Paris, et m'avoir inculqué des notions précieuses de la synthèse organique.

Je tiens à remercier aussi professeur Salah AKKAL qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, ainsi que pour son soutien scientifique et technique tout au long de mon cursus de recherche.

Je remercie professeur Ammar ZELAGHI d'avoir accepté de juger cette thèse et pour son assistance éloquente et précieuse, et la valeur scientifique ajoutée.

Je remercie professeur Mahieddine MOKHTARI d'avoir accepté de juger cette thèse, et apporter une grande valeur scientifique à ce modeste travail.

Je remercie vivement le professeur Jean Pierre MAHY pour son soutien et ses encouragements notamment pour son accueil au niveau de son équipe de recherche ICMMO.

Je remercie Madame Hafsa KOURRI-YOUSSOUFI pour ses conseils et ses orientations qui m'ont été très utiles.

Je remercie le professeur Mouad ALLAMI de m'avoir accueilli en m'intégrant au sein de son équipe de recherche de chimie thérapeutique.

Mes remerciements à Mr Tahar DEROUCHE ainsi que madame Wahiba KARRA-ALI et madame Safia IHOUAL pour leurs aides dans la réalisation des tests biologiques.

Je remercie Docteur El Hani MAKHLOUFI pour sa contribution dans la finalisation de ce travail particulièrement dans le domaine de l'informatique.

# Liste des figures

La figure	La page
Figure 01 : Benzol $\gamma$ -pyrone.	08
Figure 02 : l'échelle visuelle de la douleur	30
Figure 03 : Structure de quelques antalgiques centraux.	32
Figure 04 : Structures de quelques antalgiques périphériques.	33
Figure 05 : Photo de la Plante <i>Tetraclinis articulata</i> .	37
Figure 06 : Protocole du test d'activité antibactérienne sur milieu liquide.	44
Figure 07: hétérosides naturels ou non-naturels biologiquement actif.	47
Figure 08 : Ligands utilisés dans diverses réactions d'aminations.	50
Figure 09 : Précatalyseurs dans les réactions d'aminations	51
Figure 10 : les glycanes, médiateurs de la communication cellulaire	61
Figure 11: Motifs sucre non-usuel des glycoprotéines. (A) $\alpha$ -L-fucosylation, (B) $\beta$ -D-xylosylation, (C) $\alpha$ -L-rhamnosylation et (D) $\alpha$ -L-arabinofuranosylation	62
Figure 12 : Liaison sucre-acides aminés rares. (A) Trp C- mannosylé, (B) Ser phosphomannosylée et (C) Cys S-glucosylée.	63
Figure 13 : structure de la sublancine.	64
Figure 14 : Structure du glycocine F.	64
Figure 15 : Structure de la thurandacine A et B.	65
Figure 16 : Étendues et limites du couplage en série phényl aniline iodée	71
Figure 17: Étendues et limites du couplage en série cystéine	72
Figure 18 : perspectives	73

# Liste des schémas

Le Schéma	La page
Schéma 01: Protocole d'extraction de l'espèce <i>Tetraclinis articulata</i>	39
Schéma 02: Méthode classique utilisée pour la glycosidation d'un aglycone	48
Schéma 03: Création de la liaison C-N métallo-catalysée	49
Schéma 04 : Mécanisme de Buchwald-Hartwig	52
Schéma 05 : Premier report de la création de la liaison C-S	53
Schéma 06 : Utilisation de ligand bidentate pour la création de la liaison C-S	53
Schéma 07 : Création de la liaison C-S catalysé par le palladium	54
Schéma 08 : Produits secondaires observés lors de cette réaction	54
Schéma 09 : Formation des produits secondaires	55
Schéma 10: Mécanisme proposé par Campagne et Jutand	56
Schéma 11 : Première catalyse au Nickel pour créer la liaison C-S	56
Schéma 12 : Catalyse grâce à un carbène de Nickel	57
Schéma 13 : Création de la liaison C-S à température ambiante	57
Schéma 14: objectif de travail	59
Schéma 15 : Stratégie envisagée pour les glycoconjugués	59
Schéma 16 : Couplage palladié pour la formation de thiohétérosides	66
Schéma 17 : Couplage au Nickel de thiosucres déprotégés	67
Schéma 18 : Couplage général de couplage au Palladium de thiosucres	68
Schéma 19: Synthèse de $\beta$ -thioglycoside grâce à la thiourée	68
Schéma 20 : préparation de 4-iodo-L-phenylalanine	69
Schéma 21 : Réaction modèle envisagée	69
Schéma 22 : mécanisme d'activation du précatalyseur PdG3-Xantphos	70
Schéma 23 : synthèse du substrat $\underline{8}$ , dérivé de la cystéine	72
Schéma 24 : Couplage de théosucres déprotégé	73

## Liste des tableaux

Tableau	La page
Tableau 01 : Classification des flavonoïdes.	11
Tableau 02 : L'activité antibactérienne mesurée comme une zone d'inhibition (mm).	34
Tableau 03 : l'activité analgésique chez les souris traitées avec un extrait hydroalcolique de feuilles de <i>Tetraclinis articulata</i> et de l'acide acétylsalicylique.	35
Tableau 04 : création de la liaison C–S par d'autres métaux	58
Tableau 05 : Matières premières et rendements obtenus	69
Tableau 06: Optimisation des conditions opératoires	70

## Liste des Abréviations

RMN <sup>1</sup> H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RMN <sup>13</sup> C	Résonance Magnétique Nucléaire Carbone 13
MHz	Méga hertz
SM	Spectroscopie de masse
r	rendement de réaction
eq	equivalent
AZA	<b>AB</b> ABSA <b>Z</b> ine El <b>A</b> bidine
Pd G3	Palladium troisième génération
L	Ligand
Et <sub>3</sub> N	Tri éthyle amine
THF	<u>Tetrahydrofurane</u>

## Le Sommaire

Le titre	La page
Introduction générale	1
Partie phytochimique	6
Chapitre I : Etude phytochimique et biologique de l'espèce <i>Tetraclinis articulata</i>	6
I-1-1- Les flavonoïdes	7
I-1-2- Classification des Flavonoïdes :	7
I-1-2-1-Flavones, Flavonols	9
I-1-2-2-Flavanones et dihydroflavonols	10
I-1-2-3-Biflavonoïdes	10
I-1-2-4-Chalcones, auronés	10
I-1-2-5-Les anthocyanes	10
I-1-3- Activités biologiques des flavonoïdes	12
I-1-3- 1-L'activité antioxydante	12
I-1-3-2-L'activité antimicrobienne	13
I-1-3-3 L'inhibition des enzymes	15
I-1-3-4- l'activité antifongique	15
I-1-3-5- l'activité antiulcéreuse	16
I-1-3-6- l'activité anticancéreuse	16
I-1-3-7-l'activité anti-inflammatoire	17
I-1-3-8-L'activité antibactérienne	17
I-1-3-8-1- Introduction	17
I-1-3-8-2- La découverte du monde microbien	18
I-1-3-8-3- Rôle des microorganismes dans les maladies	18
I-1-3-8-4- L'infection	19
I-1-3-8-5- Morphologie et Structure fine des bactéries	20
I-1-3-8-6- Bactériologie médicale	22
I-1-3-8-6-a. Bactéries à gram négatif	22
I-1-3-8-6-a.1. Genre <i>Pseudomonas</i>	22
I-1-3-8-6-a.2. Genre <i>Acinetobacter</i>	23
I-1-3-8-6-a.3. Famille des Entérobactéries	24
I-1-3-8-6-a-3-1- Genre <i>Salmonella</i>	24
I-1-3-8-6-a-3-2- Genre <i>Escherichia</i>	24
I-1-3-8-6-a-3-3- D'autres Entérobactéries	25
I-1-3-8-6-b- Bactéries à gram positif	26
I-1-3-8-6-b-1- Genre <i>Staphylococcus</i>	26
I-1-3-8-6-b-2- Les Streptocoques	27
I-1-3-9- Autres activités des flavonoïdes	28
I-1-3-10- L'activité analgésique	28
I-1-3-10-1-La douleur	28
I-1-3-10-1-1- Définition	28
I-1-3-10-1-2- Médiateurs de la douleur	28
I-1-3-10-1-3- Mécanisme de la douleur	29
I-1-3-10-1-1-a- la douleur nociceptive	29
I-1-3-10-1-1-b- la douleur neurogène	29
I-1-3-10-1-1-c la douleur psychogène	29
I-1-3-10-2- Evaluation de la douleur	29
I-1-3-10-2-1-Evaluation de l'intensité	29
I-1-3-10-2-1-a-Une échelle verbale simple	29

I-1-3-10-2-1-b- Une échelle visuelle	30
I-1-3-10-2-2- Evaluation du retentissement	30
I-1-3-10-2-2-a- Les signes émotionnels	30
I-1-3-10-2-2-b- Les neuropostures	30
I-1-3-10-3- Traitement conventionnel	30
I-1-3-10-3-1- Test d'études expérimentales antalgiques	30
I-1-3-10-3-1-a- Test de Randall et Selitto	30
I-1-3-10-3-1-b- Test d'Amour et Smith	30
I-1-3-10-3-1-c- Test à la plaque chauffante ou hot plate test, (woolf et Mc Donald)	30
I-1-3-10-3-1-d- Test de charpentier	31
I-1-3-10-3-1-e- Test de torsion ou writhing test (siegmund)	31
I-1-3-10-3-2- Antalgiques conventionnels	31
I-1-3-10-3-2-1- Les antalgiques centraux ou majeurs	31
I-1-3-10-3-2-1-a- Mécanisme d'action	31
I-1-3-10-3-2-1-b- Interaction médicamenteuse	31
I-1-3-10-3-2-1-c- Effet secondaires	32
I-1-3-10-3-2-1-d- Contre indications	32
I-1-3-10-3-2-2- Les analgésiques périphériques	32
I-1-3-10-3-2-2-a- les analgésiques purs	32
I-1-3-10-3-2-2-b- Les antalgiques antipyrétiques	32
I-2- Résultats et discussions	34
I-2-1- L'activité antibactérienne	34
I-2-2- L'activité Analgésique	34
I-2-2-1- Les Animaux	34
I-2-2-2- Les lots d'animaux	34
I-2-3- Conclusion et perspectives	36
I-3- La partie expérimentale	36
I-3-1- La matière végétale	36
I-3-1-1- L'étude chimique de l'espèce <i>Tetraclinis articulata</i>	36
I-3-1-2- Description botanique de la plante	36
I-3-1-3- Place dans la systématique	37
I-3-1-4- Intérêts thérapeutiques traditionnels de l'espèce <i>Tetraclinis articulata</i>	38
I-3-1-5- Extraction	38
I-3-1-6- Séparation chromatographique de l'extrait butanolique	40
I-3-2- Activité antibactérienne	41
I-3-2-2- Préparation du témoin	41
I-3-2-3- Préparation de la suspension des souches de référence	41
I-3-2-3-1- Souches cibles utilisées	41
I-3-2-3-2- Origine	42
I-3-2-3-3- Vérification de la pureté des souches	42
I-3-2-3-4- Inoculum	42
I-3-2-3-5- Ensemencement	42
I-3-2-3-6- Application des disques	43
I-3-2-3-7- Lecture	43
I-3-3- l'activité analgésique	45
I-3-3-1- les Animaux	45

I-3-3-2-Méthodes	45
Partie 02 : synthèse organique	46
Chapitre II : Couplages de Buchwald-Hartwig entre des thiosucres et des acides aminés halogénés, Vers la synthèse de glucoconjugués thioglycopeptides	46
II-1- Introduction	47
II-2- Couplage de Buchwald-Hartwig	48
II-2-1- Historique et rappel bibliographique des couplages de Buchwald-Hartwig	48
II-2-2-Création de la liaison C-S par des métaux de transition	52
II-2-2-1-Création de liaison C-S pallado-catalysée	52
II-2-2-2-Création de la liaison C-S catalysée par le nickel	56
II-2-2-3-Création de la liaison C-S par d'autres métaux de transition (Cu, Mn, Fe, Co, In, Rh)	57
II-3-Conclusion	59
II-4- Objectifs	59
Chapitre III : Résultats et discussions	60
III-1- Introduction: la liaison thioglycosidique, forme rare chez les protéines glycosylées	61
III-1-1-Les sucres et les protéines, partenaires clés du monde du vivant	61
III-1-2-Les formes rares de protéines glycosylées	62
III-1-3- Biosynthèse des thioglycoprotéines, les <i>S</i> -glycosyltransférases naturelles	63
III-2-Travaux antérieur du l'équipe de Chimie thérapeutique de l'université paris sud 11 et but du projet	66
III-3-Travaux personnels	68
III-3-1-Synthèse des matières premières	68
III-3-1-a-Synthèse des thiosucres	68
III-3-1-b- Synthèse de le phenylalanine iodée	69
III-3-2- Commentaires sur le mécanisme de la réaction de couplage par Pd-G3	70
III-4- Conclusion et perspectives	72
III-5- partie expérimentale	74

# Introduction générale

Le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme parfois affecté de troubles insidieux<sup>1</sup>.

La connaissance par l'homme de l'utilisation des plantes, qu'il s'agisse de plantes alimentaires, médicinales ou toxiques, est très ancienne<sup>2</sup>. Alors que se soigner par les plantes est un instinct, qui se retrouve d'ailleurs dans le comportement des animaux. Cette pratique a engendré d'innombrables croyances sur ce qui sauve la vie et sur les forces qui lui sont néfastes. Beaucoup de remèdes phytothérapeutiques sont nés des observations, de l'inspiration et de l'expérience des guérisseurs, devenus des personnages révéérés dans toutes les tribus et chez tous les peuples<sup>3</sup>. Ces notes, observations et applications ont été enregistrées depuis des millénaires dans les diverses parties du monde<sup>4</sup>. Les plus anciens sont des tablettes d'argile gravées de signes cunéiformes, datant de l'époque sumérienne vers le IV<sup>e</sup> millénaire, qui représentent des "Recueils de Formules de Plantes Médicinales";

Le Shennong Bencao Jing (2000 ans av. J.C.) considéré comme le premier recueil de "*Matière Médicale*", il contient 365 remèdes d'origine végétale par analogie aux 365 jours de l'année; le Papyrus égyptien d'Ebers (1510 av. J.C.) décrit plusieurs maladies et leurs traitements avec les plantes médicinales; l'Ayurveda ou "*Science de la Vie*" qui regroupe de très anciens textes médicaux indiens. Mais c'est vers 1865 que le docteur Auguste Soins donne le nom de "*Phytothérapie*" pour définir la médecine par les plantes<sup>4</sup>.

Les indications données par la phytothérapie ou l'aromathérapie, n'ont pas pour but de faire oublier ou sous-estimer l'importance de toute la profession médicale et de la médecine, à condition que celle-ci soit avant tout humaine et respecte fidèlement le serment d'Hippocrate: "*primum non nocere*": "*d'abord, ne pas nuire*". Les médecines douces ne visent pas à encourager chacun à devenir son propre médecin; en effet, il faut savoir qu'à n'importe quel stade de la maladie, intervient un élément très important: "*Le Diagnostic*", qui ne saurait relever que d'un professionnel<sup>4</sup>.

La pensée scientifique occidentale traditionnelle s'attache à expliquer un tout en analysant les propriétés des éléments qui le composent. Ainsi, la botanique expose la

---

<sup>1</sup> F. Baba aïssa. *Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident*. EDAS Algérie, 2000, 5.

<sup>2</sup> T. Sévenet, C. Tortora, *Plantes, molécules et médicaments*. Nathan, CNRS Edition. Paris, 1994. 52.

<sup>3</sup> L. Bremness. *Les plantes aromatiques et médicinales*, Bordas Editions. 1998. 24.

<sup>4</sup> M. Bernadet, *Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles*, Edition Dangles, 2000, 135.

"fonction" de chaque partie d'une plante, et la chimie analyse ses composants pour "isoler les principes actifs". Toutefois, en se fondant sur des hypothèses très circonscrites, les chercheurs occidentaux ont peut être négligé certaines interactions subtiles entre les plantes et l'homme.

Au contraire, les phytothérapeutes soutiennent depuis longtemps que la plante forme un tout et que ses composants actifs n'agissent pas isolément. Aujourd'hui, la physique quantique, qui met l'accent sur les processus naturels plus que sur les éléments, donne une certaine crédibilité à cette théorie en ouvrant la voie à une nouvelle compréhension de la maladie comme "dysharmonie"<sup>1</sup>.

Une plante agit par l'ensemble de ses constituants, vivifiés et dosés par le végétal lui-même dont c'est le rôle exclusif. Lorsque l'on en extrait une substance unique considérée comme le principe actif, il s'agit en général d'un poison dont l'usage peut être valable, mais il s'agit alors là d'une branche très spéciale de la pharmacopée allopathique. Les herboristes utilisent la plante entière pour préparer des remèdes qui offrent une guérison lente mais plus sereine et plus sûre que les médicaments puissants, fabriqués à partir d'agents isolés, qui provoquent plus d'effets secondaires. Des études américaines ont confirmé la présence de substances diminuant le besoin d'alcool dans le kudzu (*Pueraria lobata*), utilisé depuis longtemps en chine contre l'alcoolisme. Mais isoler le principe actif d'une plante peut engendrer des effets secondaires qui se manifestent moins, différemment ou pas du tout lorsqu'on utilise la plante entière. Il semble en effet que certains de ses composants équilibrent le principe actif. Dans la médecine chinoise, il est rarement administré une plante seule mais combinée avec d'autres pour renforcer son action et contrecarrer ses effets secondaires. Les chinois attribuent une valeur thérapeutique à la combinaison de certaines plantes et de certains aliments<sup>1</sup>.

Pour cela, le retour vers le naturel est devenu indispensable, et il s'élargit d'un jour à autre malgré que ça devient de plus en plus couteux d'où la nécessité de synthétiser les produits actifs issus des substances naturelles avec un cout réduit et effet thérapeutique amélioré, La condition principale pour ce regain, est une étude scientifique rigoureuse et rationnelle des différentes activités des extraits naturels<sup>1</sup>.

Parmi ces substances naturelles actives, on trouve les hétérosides qui sont formés d'un ou plusieurs oses liés par leur fonction réductrice à une molécule, dite aglycone. Ils sont source inépuisable d'architectures moléculaires complexes et sont considérés comme des

---

<sup>1</sup> L. Bremness. *Les plantes aromatiques et médicinales*, Bordas Editions. 1998. 24.

outils précieux pour étudier les interactions qui contrôlent les processus biologiques complexes du monde du vivant. Certains d'entre eux sont utilisés en cliniques, tels que la doxorubicine (anticancéreux)<sup>1</sup> ou le thiocolchoside (myorelaxant)<sup>2</sup>, Ces unités oses, sous forme monosaccharides, disaccharides ou oligosaccharides, sont importantes voir essentielles pour l'activité biologique (participation dans la reconnaissance de cibles cellulaires)<sup>3</sup>. Elles sont souvent attachées à leur aglycone *via* une liaison glycosidique sous forme de liaison C-O, C-N, C-S ou C-C de configuration  $\alpha$  ou  $\beta$  bien définie, tous ces vertus nous ont encouragé de les synthétiser à l'échelle pilote dans un premier temps, puis à l'échelle industrielle dans le cadre d'un projet européen de recherche des nouvelles molécules contre le Cancer.

Et dans cette approche générale, vient notre modeste travail, qui a été planifié chronologiquement au préalable d'étudier l'espèce *Tetraclinis articulata* depuis l'extraction séparation ; fractionnement a des mélanges complexes puis purification des extraits et isolation des produits purs. Mais à cause du relancement imprévu du programme de coopération Algéro-française PROFAS B+ d'où la nécessité de me rendre en France, le travail est arrêté aux mélanges complexes. Pour cette raison on a opté pour le plan de thèse suivant :

Notre travail de recherche est divisé en deux parties : partie phytochimique et partie synthèse organique ; la partie phytochimique englobe un seul chapitre : étude phytochimique et activités biologiques de l'espèce *Tetraclinis articulata*, dans ce chapitre on a commencé par la définition des flavonoïdes ainsi que leurs classes et ses activités biologiques, puis on a exposé les résultats sur les deux activités biologiques étudiées dans cette étude (Anti-bactérienne et Analgésique) avant de les discuter. Et on a finalisé par la partie expérimentale où on a expliqué les modes opératoires en commençant par l'extraction de la matière végétale et les quantités obtenues des différents extraits, et leurs fractions obtenus de la colonne chromatographique, et en terminant par les activités biologiques testées dans cette étude (anti bactérienne et analgésique) puis conclusion et perspectives.

Cette partie phytochimique est couronnée par la publication de deux articles scientifiques sur les deux activités étudiée à savoir l'activité anti bactérienne et analgésique.

Dans la partie synthèse ; on a pu synthétiser 10 produits originaux, Cette partie est divisée en deux chapitres ; le premier réservé aux Glucides et glyco-conjugués spécialement puis on a expliqué le mécanisme de couplage de Buchwald- Hardwig. Dans le deuxième

---

<sup>1</sup> L. Vaccan, D. Canton, N. Zaffaroni, R. Villa, M. T. Enzo di Fabrizio. *Micro-and Nano- Enginneering MNE*, **2006**, 83, 1598-1601.

<sup>2</sup> M. Carta, L. Murru, P. Botta, G. Talani, G. Pietro Sechi, P. Luigi De Riu, E. Sanna, g. Bigio. *Neuropharmacology*. **2006**,51, 805-815.

<sup>3</sup> W. Wilson, *Nat. Prod. Rep.* **1997**, 14, 99-110.

chapitre on a exposé les résultats obtenus (modèle d'étude et optimisations des conditions opératoires de la réaction de couplage, les produits synthétisés) puis les discussions de ces résultats, et on a terminé ce chapitre par la partie expérimentale qui contient les modes opératoires appliqués pour la synthèse des produits de couplage et les produits de départ ainsi que les caractérisations de ces produits (RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , Spectroscopie de masse...) et on a finalisé bien entendu avec une conclusion et les perspectives.

Ce travail précieux de synthèse est en cours de finalisation au niveau du laboratoire BioCIS, l'équipe de chimie thérapeutique, Faculté de Pharmacie-Université Paris sud XI, et objet d'une publication dans un journal international.

# Partie I : phytochimie

## CHAPITRE I

Etude phytochimique et  
biologique de l'espèce  
*Tetraclinis articulata*

### **I-1-1- les flavonoïdes :**

Le mot « flavonoïde » a été introduit en 1952 par HINREIER pour désigner tous les pigments ayant un squelette C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> analogue à celui des flavones, lui-même dérivant du Latin *flavus* qui signifie jaune<sup>1</sup>.

Les flavonoïdes sont hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits, et parfois des feuilles. Tel est le cas des flavonoïdes jaunes (chalcones, auronés, flavonols jaunes), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigment : tel est le cas des flavones et des flavonols incolores co-pigmentant et protégeant les anthocyanosides<sup>2</sup>.

Dans certains cas, la zone d'absorption de la molécule est située dans le proche ultraviolet : la coloration n'est alors perçue que par les insectes qui sont ainsi efficacement attirés et guidés vers le nectar et donc contraints à assurer le transport du pollen, condition de la survie de l'espèce végétale<sup>2</sup>.

Les flavonoïdes sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet<sup>2</sup>.

### **I-1-2- Classification des Flavonoïdes :**

L'étude des Flavonoïdes a suscité notre intérêt, du fait de leur intérêt pharmacologique, de leurs nombreuses implications dans des domaines biologiques et de leur diversité structurale (plus de 4000 structures flavoniques identifiées à l'heure actuelle)<sup>3</sup>.

Ils constituent l'un des grands groupes de phénols, et sont des constituants caractéristiques des plantes vertes à l'exception des algues<sup>4</sup>.

On signale qu'environ 2% du carbone photosynthétique global sont incorporés dans la biosynthèse flavonique<sup>1,2</sup>.

Abondants dans les plantes supérieures, on les rencontre essentiellement dans les feuilles et les fleurs. Mais ils sont également signalés dans les racines, le bois, l'écorce, le pollen, le

---

<sup>1</sup> P. Ribereau, *Les composés phénoliques des végétaux*, **1968**, 54.

<sup>2</sup> J. Bruneton, *Pharmacognosie Phytochimie Plante médicinales*, 3<sup>ème</sup> édition. **1993**, 432.

<sup>3</sup> J. F Gonnet, *Thèse Lyon*, **1989**, 112.

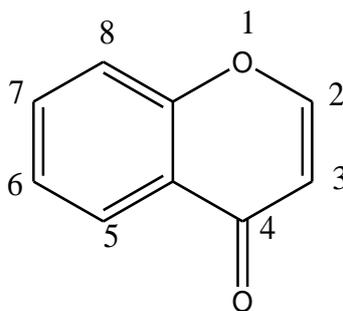
<sup>4</sup> K. R. Markham, *Techniques of flavonoïdes identification*, Academic press, **1982**, 1410-1432.

nectar, les baies et les grains<sup>2</sup>. Leur concentration dans la cellule végétale excède souvent  $1\mu\text{M}^1$ .

Très répandus dans les végétaux, les flavonoïdes existent sous forme de combinaisons, les plus fréquentes étant les hétérosides<sup>2</sup>. Ainsi, les flavonoïdes glycosylés se trouvent principalement dans les vacuoles et leurs aglycones sont présents dans les zones lipophiles, comme les glandes (à sécrétion) huileuses ou les couches de cire<sup>3</sup>, telles les glandes de l'odorat du castor, la propolis (abeilles à sécrétion), et les ailes des papillons. Quant à leurs aglycones O-méthylés on les trouve dans le cytoplasme<sup>3</sup>.

On peut les rencontrer aussi dans les chloroplastes des feuilles des plantes supérieures<sup>4</sup>. Comme il est possible de les localiser fixés sur les héli-cellules des parois cellulaires<sup>5</sup>.

Les génines sont des dérivés polyhydroxylés, parfois méthoxylés ou méthylés de la chromone ou benzol  $\gamma$ -pyrone, Fig 01<sup>6</sup>.



**Figure 01 : Benzol  $\gamma$ -pyrone**

---

<sup>1</sup> J. B. Harbone, *The flavonoïdes*, **1988**, 1220-1225.

<sup>2</sup> P. Ribereau, *Les composés phénoliques des végétaux*, **1968**, 54.

<sup>3</sup> A. Puppo, *Phytochemistry*, Vol 31, **1992**, 88.

<sup>4</sup> J. B. Harbone et T.J. Mabry, *The flavonoïdes*, Tome II, *academic press*, **1975**, 32-38.

<sup>5</sup> J. B. Harbone, *The flavonoïdes*, *Advances in Research Science*, **1986**, 712-720.

<sup>6</sup> M. Paris et M. Hurabielle, *Abrégé de matière médicale, Pharmacognosie*, Tome I, Ed: *Masson*, **1981**, 517-525.

Dans toutes les classes de flavonoïdes mentionnées ci-dessus, la biosynthèse justifie la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques en C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> et C<sub>4</sub>'.

**I-1-2-1-Flavones, Flavonols** : Ces molécules représentent la majorité des flavonoïdes connus. Le cycle A est, dans plus de 90% des cas, substitué par deux hydroxyles phénoliques en C<sub>5</sub> et en C<sub>7</sub>. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. Le cycle B est substitué dans 80% des cas en C<sub>4</sub>'.

**I-1-2-2-Flavanones et dihydroflavonols:** Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence de centres d'asymétrie, dans les Flavanones naturelles, le carbone C<sub>2</sub> est normalement de configuration (2S). Si, pour les dihydroflavonols, quatre isomères sont théoriquement possibles, la presque totalité des composés de la série connus à ce jour sont de configuration 2R ou 3R, le phényle et l'hydroxyle étant en *trans*<sup>1</sup>.

**I-1-2-3-Biflavonoïdes :** Les flavonoïdes peuvent se lier les uns aux autres, en particulier par leurs carbones, très réactifs, C<sub>6</sub> ou C<sub>8</sub>. La majorité des biflavonoïdes naturels sont des dimères de flavones et de flavanones<sup>1</sup>.

**I-1-2-4-Chalcones, aurones:** Les chalcones, dépourvus de l'hétérocycle central, sont caractérisés par la présence d'un chaînon tri-carboné cétonique dont la liaison α-β est insaturée<sup>1</sup>.

**I-1-2-5-Les anthocyanes :** Ce sont des pigments rouges en milieu acide, et bleu en milieu basique : ils sont très répandus dans les fleurs et les fruits. Ils ont une structure C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> dans laquelle l'élément en C<sub>3</sub> est sous forme d'ions pyrilium, alors que l'oxygène a une structure oxonium ionique. Ils sont présents dans la nature sous forme hétérosidique<sup>1</sup>.

Toutes les classes des Flavonoïdes sont regroupées dans le Tableau 01 suivant :

---

<sup>1</sup> J. Bruneton, *Pharmacognosie Phytochimie Plante médicinales*, 3<sup>ème</sup> édition. 1993, 432.

**Tableau 01 : Classification des flavonoïdes**

CLASSES		Nom de la famille	Nom	Hydroxylation
Dérivés	Structure			
Phenyl-2-chromone		Flavone Flavonol Flavanone (C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> liaison simple)	Apigénine Myricétine Butine	5, 7, 4' 3, 5, 7, 3', 4', 5' 7, 3', 4'
Phenyl-2-chromone		Catéchines (flavanols-3)	Gallocatechine	5, 7, 3', 4', 5'
Phenyl-3-Chromone		Isoflavone	Genisteine	5, 7, 4'
Chalcone		Chalcone	Buteine	3, 4, 2', 4'
Aurone		Aurone	Aureusidine	4, 6, 3', 4'

### **I-1-3- Activités biologiques des flavonoïdes :**

#### **I-1-3- 1-L'activité antioxydante:**

Il a été montré que les flavonoïdes agissent comme des fixateurs de plusieurs espèces oxydantes ; tel que l'anion peroxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyle ou les radicaux peroxydes<sup>1</sup>.

Les données de la littérature montrent une mise en évidence de certains rapports entre la structure flavonique et l'activité antioxydante. En outre, la comparaison entre la quercétine, la catéchine et la cyanidine démontre l'importance de la présence de l'hétérocycle (C)<sup>2</sup>.

La présence du groupe hydroxyle 3-OH attaché à la double liaison  $C_2=C_3$ , et son emplacement adjacent au groupement carbonyle de l'hétérocycle (C) en position  $C_4$  est exigé pour la grande efficacité de l'activité antioxydante<sup>3</sup>. Cette activité antioxydante atteint son maximum quand le noyau B est substitué par un système orthodihydroxyle.

La O-méthylation des substituant hydroxyles du squelette flavonique annule l'activité antioxydante des flavonoïdes<sup>1</sup>.

Dans la plupart des articles récents, l'activité antioxydante est mesurée, en utilisant le dosage de la peroxydation lipidique (LPO)<sup>4</sup>. Il existe une relation entre la structure flavonique, et l'inhibition de la peroxydation lipidique :

1. Le groupement hydroxyle en position 3 de l'hétérocycle (C) ; Il a été trouvé que les flavonoïdes possédant un groupement 3-OH libre tel que : la morine, la myricétine, la quercétine, Catéchine, la fisétine et d'autre ont une capacité inhibitrice plus grande comparé à ceux qui n'ont pas, tel que les flavones : la diosmétine, l'apigénine et les flavanones : l'héspertine et la naringénine.

---

<sup>1</sup> J. Bruneton, *Pharmacognosie Phytochimie Plante médicinales*, 3<sup>ème</sup> édition. **1993**, 432.

<sup>2</sup> G. Cao, E. Sofic et R-L. Prior. *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids structure-activity relationships*, *Free Radic. Biol. Med*, **1997**, 749.

<sup>3</sup> R-A. Dixon, P-M Dey et C-J Lamb, *Phytoalexins: Enzymology and molecular biology*, *Adv. Enzymol*, **1983**, 55.

<sup>4</sup> G. Cao, E. Sofic et R-L. Prior. *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids structure-activity relationships*, *Free Radic. Biol. Med*, **1997**, 749.

2. La double liaison  $C_2=C_3$ <sup>1</sup>; La réduction de cette double liaison réduit le potentiel antioxydant.

3. Dans certains cas, la présence du groupement carbonyle en  $C_{(4)}$  de l'hétérocycle (C) est essentielle pour le potentiel antioxydant<sup>1</sup>: La catéchine a un potentiel antioxydant plus faible comparé à celui de la quercétine.

4. Le nombre des groupements hydroxyles<sup>2</sup> :

L'activité antioxydante des flavonoïdes augmente avec le nombre des groupes OH substitués sur le noyau B. La myricétine a une activité antioxydante plus grande que celle du kaempférol.

5. Les groupements hydroxyles en position 3, 5, 7, 3', 4' participent dans l'inhibition de la peroxydation lipidique<sup>3</sup>.

6. La capacité antioxydante des flavonoïdes revient à leur aptitude à former des chélates métal-ion, par l'ensemble (3-hydroxy, 4-oxo) ou (5-hydroxy, 4-oxo)<sup>4</sup>.

7. Les groupes hydroxyles 5-OH, 7-OH, et la double liaison  $C_2=C_3$  qui sont des sites potentiels de réactivité, sont essentiels pour l'activité inhibitrice des flavonoïdes de l'enzyme Xanthine oxydase (X.O.) et du radical peroxyde produit par ce dernier<sup>4</sup>.

#### **I-1-3-2-L'activité antimicrobienne:**

Il est connu que les flavonoïdes sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne, il est logique par conséquent, qu'ils soient des substances antimicro-biennes efficaces *in vitro* contre les microorganismes<sup>5</sup>.

Il a été montré que les composés flavoniques les moins polaires, c'est-à-dire les moins substitués par des groupes OH sur le noyau B, sont les plus actifs vis-à-vis des

---

<sup>1</sup> P-M. Dey et J-B. Harborne, *Methods in Plant biochemistry*, Academic Press INC, **1992**, 287.

<sup>2</sup> D. Garnier, *Dictionnaire des termes de médecine*. Editions Maloine, Paris, 2004, 1012.

<sup>3</sup> R-Y. Stanier, M. Doudoroff et E-D-A. Adelberg, *Microbiologie Générale*, **1966**, 705.

<sup>4</sup> R-A. Dixon, P-M Dey et C-J Lamb, *Phytoalexins: Enzymology and molecular biology*, *Adv. Enzymol*, **1983**, 55.

<sup>5</sup> J-C. Ibewuïke, F-O. Ogungbamila, A-O. Ogundaini, I-N. Okeke et L Bohlin, *Anti-inflammatory and antibacterial activities of C- méthylflavonoids from Piliostigma thonningii*, *Phytother. Res*, **1997**, 281.

microorganismes<sup>1</sup>, cela est renforcé par la découverte que la méthylation des flavonoïdes augmente l'activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*<sup>2</sup>.

Dans le cas du méthicillin-résistant *S. aureus*, les chaînes aliphatiques latérales dans les flavones (dans la position 6 ou 8), rendent la molécule plus lipophile et augmentent son activité antimicrobienne comparé aux flavones non substituées<sup>3</sup>. Il a été montré avec la bactérie cariogénique (*Actinomyces viscosus* et *A. naeslundii*, several *Streptococci*) que la présence des groupes hydroxyles sur les noyaux A et B essentiellement (5-OH), plus une substitution aliphatique sur le noyau A, détermine l'activité antibactérienne des flavones<sup>4</sup>.

Cependant, il a aussi été constaté que les flavonoïdes lipophiles (méthoxylés) n'étaient pas de bons agents protecteurs contre les microorganismes<sup>5</sup>, cela est confirmé par le fait que les dérivés glycosylés de la quercétine et de la quercétagine ont montré des activités antimicrobiennes considérables contre les microorganismes pathogéniques<sup>5</sup>.

La présence des groupes hydroxyles libre dans les positions 3, 3', 4' et 5' est indispensable pour l'activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Proteus vulgaris*<sup>6</sup>, cela est supporté par le résultat de Pupunen-Pimiä, dans lequel ils ont testé l'activité antibactérienne de la myricétine contre la *Lactobacilli* et *E. coli*<sup>7</sup>.

---

<sup>1</sup> T. Yokozawa, C-P. Chen et I. Nishioka, *Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical*, *Biochem.Pharmacol*, **1998**, 213.

<sup>2</sup> J-C. Ibewuiké, F-O. Ogungbamila, A-O. Ogundaini, I-N. Okeke et L Bohlin, *Anti-inflammatory and antibacterial activities of C- méthylflavonoids from Piliostigma thonningii*, *Phytother. Res*, **1997**, 281.

<sup>3</sup> L. Mendoza, M. Wilkens et A. Urzúa, *Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean Pseudognaphalium (Asteraceae)*, *J. Ethnopharmacol*, **1997**, 85.

<sup>4</sup> H-E. Nauciel, *The important volatile flavor components of foods*, **2000**, 335.

<sup>5</sup> M-L. Tereschuk, M-V. Riera et L- Abdala, *Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of Tagetes minuta*, *J. Ethnopharmacol*, **1997**, 227.

<sup>6</sup> G. Messadie. *Les compacts les grandes découvertes de la science*. Casbah Editions Alger, **1995**, 32.

<sup>7</sup> R. Pupunen-pimiä, L. Nohynek, C. Meier, M. Kähkönen, M. Heinonen, A. Hopia et K-M. Oksman-Caldentey. *Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries*, *J. Appl. Microbiol*, **2001**, 494.

### **I-1-3-3 L'inhibition des enzymes :**

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques, qui réagissent avec les protéines, ainsi ils peuvent réagir avec les enzymes par des processus biologiques à l'intérieur des cellules<sup>1</sup>.

Des expériences menées *in vitro* ont montré que les flavonoïdes inhibent plusieurs enzymes<sup>2</sup> tel que l'histidine carboxylase, l'élastase, l'aldose réductase, la lipooxygénase, la cyclooxygénase, l'hyaluronidase et la phosphodiétérase<sup>3</sup>.

Des testes sur plusieurs flavonoïdes ont montré leur capacité d'inhiber les enzymes clés de la respiration mitochondriale : la double liaison C<sub>2</sub>=C<sub>3</sub> et la fonction cétone en C<sub>4</sub> ainsi que les groupes OH occupant les positions 3', 4'et 5' du noyau B sont des caractéristiques importantes de la forte inhibition du NADH-oxydase.

Cos et *al*, ont montré que les flavones ont une activité inhibitrice supérieure que celle des flavonols, et que les groupes hydroxyles en position C-3 et C-3' sont indispensables pour la propriété d'épuration des superoxydes.

### **I-1-3-4- l'activité antifongique :**

Les champignons sont des végétaux dépourvus de chlorophylle, devant trouver leur carbone dans les composés organiques, ce qui conditionne souvent les circonstances de leur vie saprophytique ou parasitaire. En fonction de leur habitat, les champignons sont répartis en deux groupes : les endogènes et les exogènes.

Les champignons endogènes sont représentés essentiellement par *Candida albicans*, cette levure vit normalement et de façon exclusive dans le tube digestif de l'homme et de certains animaux<sup>4</sup>.

---

<sup>1</sup> P-M. Dey et J-B. Harborne, *Methods in Plant biochemistry*, Academic Press INC, **1992**, 287.

<sup>2</sup> A. Puppo, *Effects of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-type Reaction, Influence of the Iron Chelator*, *Phytochemistry*, **1992**, 85.

<sup>3</sup> M-C. Recio, J-L. Ríos et A. Villar, *review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature*, **1989**, 117.

<sup>4</sup> H. Leclerc, J-L. Gaillard et M. Simonet. *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien*. Doin Editeurs, Paris, **1995**, 602.

### **I-1-3-5- l'activité antiulcéreuse :**

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la narangénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection gastriques<sup>1</sup>.

D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés anti-ulcéreuse de la quercétine, narangénine, rutine et Kaempférol et la production du PAF (PlataletActvating Factor) qui est un agent ulcérogène potentiel<sup>2</sup>.

### **I-1-3-6- l'activité anticancéreuse :**

Des études réalisées in-vitro et in-vivo suggèrent que les flavonoïdes agissent à tous les stades de la cancérogénèse (initiation, promotion, progression). Ils inhibent la croissance de lignées cellulaire cancéreuses en interférant avec les mécanismes de transduction des signaux mitogènes<sup>3</sup>.

Dans des recherches récentes la quercétine est capable de diminuer chez le rat, l'incidence des tumeurs mammaires induites par la NMU (N- Nitrosométhylurée).

De plus, plusieurs études ont montré que les polyphénols de thé vert sont particulièrement remarquables parce qu'ils protègent des cancers à tous les stades.

Les buveurs réguliers de thé vert réduisent le risque de cancer de l'œsophage de 60%, mêmes les fumeurs japonais qui boivent de thé vert réduisent leur risques de cancer du poumon de 45 %, ce qui expliquerait que le japon présent à la fois le plus fort de fumeurs du monde développé et le plus faible taux de cancer du poumon<sup>3</sup>.

En effet, de nombreuses enquêtes épidémiologiques attribuent un effet préventif très important à la consommation des fruits et des légumes, riche en ces composés pour divers cancers (poumons et prostates)<sup>3</sup>.

Les oligomères proanthocyanidines ont montré une activité anti-virale contre le virus syncytial respiration (RSV), le virus de l'influenza A et l'hépatite A et B<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> H-E. Nauciel, *The important volatile flavor components of foods*, **2000**, 335.

<sup>2</sup> P-M. Dey et J-B. Harborne, *Methods in Plant biochemistry*, Academic Press INC, **1992**, 287.

<sup>3</sup>G. Messadie. *Les compacts les grandes découvertes de la science*. Casbah Editions Alger, **1995**, 32.

### **I-1-3-7-l'activité anti-inflammatoire :**

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire<sup>1</sup>. Les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes.

Par ailleurs, l'acide arachidonique peut être métabolisé par la voie de la lipoxigénase pour aboutir à la formation de leucotriènes et par la voie de la cyclooxygénase pour produire des thromboxanes et des prostaglandines, molécules fortement impliquées dans le processus inflammatoire<sup>2</sup>.

Plusieurs flavonoïdes (le crisiliol et la baicaléine) sont de puissants inhibiteurs de la 5-lipoxigénase et donc la production des leucotriènes<sup>2</sup>.

D'autres flavonoïdes tels que l'apégénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase<sup>2</sup>.

Il a montré que les flavonoïdes inhibent également l'adhésion et l'agrégation plaquettaire en augmentant les taux intracellulaires en AMP<sub>C</sub> à la suite d'une inhibition de phosphodiésterases<sup>1</sup>.

**I-1-3-8-L'activité antibactérienne:** puisque c'est l'une des activités étudiées dans notre travail, on va la bien détailler.

#### **I-1-3-8-1- Introduction :**

L'homme vit dans un environnement peuplé d'un grand nombre de microorganismes qui sont présents dans l'air, dans le sol, dans les eaux douces, dans les eaux marines, à la surface de la peau et les muqueuses ainsi qu'au niveau du tube digestif, de l'arbre respiratoire et de l'appareil urinaire. Ces microorganismes sont constitués par les bactéries, les virus, les champignons et les parasites.

Ils sont soit des hôtes naturels de l'homme et donc saprophytes (flore digestive par exemple), soit ils déterminent une infection et donc pathogènes.

---

<sup>1</sup> M. Khiati, *Guide des maladies infectieuses et parasitaires*. OPU, Alger, 1998, 28.

<sup>2</sup> M-T. Madigan, J-M. Martinko et J. Parker, *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall International Editions, 1997, 102.

Le monde bactérien est très vaste et les bactéries peuplent notre environnement. Elles assurent à la surface du globe, sur le sol et dans les eaux d'innombrables fonctions; elles exercent des actions bénéfiques (ex bactéries fertilisantes du sol), mais d'autres peuvent provoquer des infections chez les plantes, les animaux et également chez l'homme<sup>1</sup>.

### **I-1-3-8-2- La découverte du monde microbien :**

C'est au cours du XVII<sup>e</sup> siècle qu'Antony van Leeuwenhoek révèle au monde scientifique la prodigieuse diversité des microorganismes et l'incroyable richesse des milieux naturels en protozoaires, algues, levures et bactéries. Ses observations et ses magnifiques descriptions sont d'une précision telle qu'aujourd'hui encore elles forcent l'admiration et permettent l'identification<sup>2</sup>.

Entre-temps, les médecins continuent d'attribuer les maladies à des "*miasmes*" ou à des causes mystiques, et ils demeurent à peu près imperméables à la notion de contagion. C'est par dizaines de milliers que se comptent les victimes de cette ignorance, fondée sur des croyances philosophiques<sup>3</sup>. Il faut attendre pourtant le XIX<sup>e</sup> siècle et les expériences de Pasteur pour que ce monde microbien soit exploré et que les différents caractères des microorganismes inventoriés apparaissent dans leur immense variété<sup>4</sup>.

### **I-1-3-8-3- Rôle des microorganismes dans les maladies :**

Au cours de ses études sur la fermentation, Pasteur s'est intéressé de près à la bière et au vin avariés et a montré que c'était dû à la croissance de microorganismes indésirables. Il a utilisé un terme particulier et significatif pour désigner ces processus d'avaries induits par des germes, il les appela "*maladies du vin et de la bière*". Il envisageait la possibilité pour les microorganismes d'être les agents de maladies infectieuses chez les organismes supérieurs.

D'ailleurs, certaines constatations étaient déjà en faveur de cette hypothèse. Dès 1813, il a été montré que certains champignons étaient responsables de maladies du blé

---

<sup>1</sup> D. Garnier, *Dictionnaire des termes de médecine*. Editions Maloine, Paris, 2004, 1012.

<sup>2</sup> H. Leclerc, J-L. Gaillard et M. Simonet. *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien*. Doin Editeurs, Paris, 1995, 603.

<sup>3</sup> G. Messadie. *Les compacts les grandes découvertes de la science*. Casbah Editions Alger, 1995, 32.

<sup>4</sup> L. Mendoza, M. Wilkens et A. Urzúa., *Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean Pseudognaphalium (Asteraceae)*, *J. Ethnopharmacol*, 1997, 85.

et du seigle. En 1836 l'italien Bassi a montré qu'une maladie des vers à soie était provoquée par un champignon. Quelques années plus tard, établit que certaines maladies cutanées humaines étaient de nature fongique.

En 1845 Berkeley a montré que la maladie de la pomme de terre était provoquée par un champignon<sup>1</sup>. Ensuite vient Davaine en 1850 qui était le premier à découvrir "*le bacille du charbon*", et l'un des premiers à prouver la responsabilité des germes dans les maladies, c'était *Bacillus anthracis* le premier microbe identifié dans l'histoire de la bactériologie<sup>2</sup>.

En dépit de ces informations, très peu de médecins étaient disposés à attribuer une origine microbienne aux principales maladies infectieuses humaines, et moins nombreux encore ceux croyant que des organismes aussi petits et apparemment aussi simples que des bactéries pouvaient être les agents de maladies<sup>3</sup>.

Mais avec les expériences de Pasteur<sup>3</sup> et Koch, à peu près en même temps en 1876 sur la maladie du charbon, il a été admis l'existence d'une relation de cause à effet entre un microorganisme et une maladie donnée. Ce travail sur le charbon ouvrit d'un seul coup les portes de l'âge d'or de la bactériologie médicale. Alors Koch concentra ses efforts sur l'isolement, la culture et la caractérisation de l'agent spécifique des principales maladies infectieuses de l'homme. Tandis que Pasteur se tourna d'emblée vers l'analyse expérimentale de l'infection, de la guérison et de l'immunité<sup>4</sup>.

#### **I-1-3-8-4- L'infection :**

L'infection est la conséquence du développement, dans un organisme sain, de microorganismes pathogènes: bactérie, parasite, virus ou autres. Elle résulte de la rupture d'équilibre qui existe entre le germe et l'homme (hôte). Ce déséquilibre provient donc soit d'une diminution des défenses du sujet (congénitale ou acquise), soit d'un accroissement de virulence de germes<sup>5</sup>.

---

<sup>1</sup> G. Messadie. *Les compacts les grandes découvertes de la science*. Casbah Editions Alger, **1995**, 32.

<sup>2</sup> A. Mori, C. Nishino, N. Enoki et S. Tawata, *Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against Proteus vulgaris and Staphylococcus aureus*, *Phytochemistry*, , **1987**, 223.

<sup>3</sup> R-Y. Stanier, M. Doudoroff et E-D-A. Adelberg, *Microbiologie Générale*, **1966**, 705.

<sup>4</sup> A. Mori, C. Nishino, N. Enoki et S. Tawata, *Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against Proteus vulgaris and Staphylococcus aureus*, *Phytochemistry*, , **1987**, 223.

<sup>5</sup> D. Garnier, *Dictionnaire des termes de médecine*. Editions Maloine, Paris, **2004**, 1012.

Le monde bactérien, qui sera traité dans ce travail, comprend plusieurs milliers d'espèces mais, seulement près d'une centaine sont pathogènes pour l'homme et l'animal.

Une bactérie pathogène est susceptible d'induire, lorsqu'elle infecte un hôte, une maladie se traduisant par des signes anormaux, l'un des plus constants étant la fièvre. Mais il faut distinguer, les pathogènes authentiques qui déclenchent régulièrement une maladie chez des individus aux défenses immunitaires normales, des pathogènes dits opportunistes qui, dans la grande majorité des cas, ne sont à l'origine d'infections que chez des sujets aux défenses immunitaires altérées<sup>1</sup>.

#### **I-1-3-8-5- Morphologie et Structure fine des bactéries :**

Durant de longues années, la bactérie a été considérée comme "*un sac d'enzymes*" car le pouvoir de résolution du microscope optique était insuffisant pour révéler les détails de structure.

L'observation des bactéries, alors, permet seulement de reconnaître la forme des cellules (sphérique ou coccoïde, cylindrique ou bâtonnet, spiralée ou hélicoïdale), leurs dimensions (qui varient selon les espèces de 0.1µm à 600µm; les *Entérobactéries* 2 à 3 µm de long, certaines *Spirochaeta* entre 30 et 500 µm) et les arrangements ou les groupements qu'elles constituent entre elles (en grappe, en chaînette, en paire ou diplocoque, en palissade ou paquet d'épingles chez les Corynébactéries...).

Ce sont les caractéristiques qui définissent la morphologie bactérienne, et qui étaient les critères essentiels de reconnaissance et d'identification, et qui ont un rôle très important dans le diagnostic<sup>2</sup>.

Les caractères morphologiques sont une stratégie d'adaptation et de survie; dans l'environnement aquatique ou tellurique il existe des bactéries qui sont amorphes, ovoïdes, cubiques, étoilées, filamenteuses; elles peuvent être groupées en amas, en paires, et aussi en rosettes en réseau, en cubes, en corps fructifiant<sup>1</sup>.

Pour distinguer entre les bactéries au microscope optique, une méthode importante et largement utilisée en bactériologie, c'est "*la coloration de Gram*". Elle consiste à

---

<sup>1</sup> H. Leclerc, J-L. Gaillard et M. Simonet. *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien*. Doin Editeurs, Paris, **1995**, 604.

<sup>2</sup> M-T. Madigan, J-M. Martinko et J. Parker, *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall International Editions, **1997**, 102.

traiter des bactéries fixées à la chaleur, par un colorant basique (violet de gentiane) puis une solution iodo-iodurée (mordantage), toutes les cellules se colorent en violet.

Soumises ensuite à l'action de l'alcool éthylique elles se répartissent en: cellules qui conservent la coloration violette dites à gram positif et qui sont décolorées, appelées à gram négatif. Pour mieux distinguer ces deux catégories, le frottis bactérien est finalement traité par de la fuchsine basique, les bactéries à gram négatif sont roses et celles à gram positif restent violettes<sup>1</sup>.

Après leur réaction avec les différents colorants utilisés par cette méthode, les bactéries divisent en deux groupes majeurs: *bactéries à gram positif*, *bactéries à gram négatif*

Cette distinction de réponse à la coloration de gram est due à la différence qui existe dans la composition des parois bactériennes, celles des bactéries à gram négatif laissent passer la solution alcoolique, tandis que celles des bactéries à gram positif représentent une véritable barrière que la solution alcoolique ne peut franchir<sup>2</sup>.

Épaisse chez les bactéries à gram positif et plus mince chez les bactéries à gram négatif; la paroi entoure une membrane cytoplasmique, plus fine et plus délicate. Les bactéries à gram négatif possèdent une seconde membrane, qui est la membrane externe pour la distinguer de la membrane cytoplasmique, dite interne.

Le cytoplasme sous-jacent contient essentiellement des granulations d'acide ribonucléique, les ribosomes ainsi que des substances de réserve comme le glycogène. L'appareil nucléaire se distingue par son aspect fibrillaire, finement réticulé, et qui occupe une grande partie de l'espace cellulaire, et il n'est pas entouré d'une membrane.

Il existe des structures membranaires intra-cytoplasmiques appelées mésosomes qui sont le plus souvent étroitement associés à l'appareil nucléaire (rôle de fixation). D'autres composants peuvent être présents (éléments facultatifs), comme le glycocalyx (polymère de surface polysaccharidique), la capsule, les flagelles (mobilité), les fimbriae (fixation sur d'autres cellules), les pilis sexuels (interviennent au cours des processus de conjugaison).

---

<sup>1</sup> H. Leclerc, J-L. Gaillard et M. Simonet. *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien*. Doin Editeurs, Paris, **1995**, 605.

<sup>2</sup> M-T. Madigan, J-M. Martinko et J. Parker, *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall International Editions, **1997**, 102.

Enfin, certaines bactéries peuvent contenir des éléments d'ADN circulaires extrachromosomique ou ADN mobile, qui sont les plasmides et qui portent des informations génétiques spécifiques (exemple résistance à certains antibiotiques)<sup>1</sup>.

Les différentes enveloppes bactériennes, parois et membranes, ou autres structures tels les antigènes somatiques, capsulaires, flagellaires..., représentent une architecture essentielle pour s'adapter aux situations de l'environnement, température, osmose, pH; pour se fixer sur des supports (cellules), se nourrir, coloniser et infecter; pour résister aux substances antibactériennes<sup>2</sup>.

#### **I-1-3-8-6- Bactériologie médicale :**

Avec la diversité des bactéries responsables de maladies infectieuses plus ou moins graves, il ne sera étudié que celles faisant l'objet des expérimentations pratiques.

La plupart des bactéries étudiées ont un pouvoir pathogène naturel et sont résistantes naturellement à certains antibiotiques.

#### **I-1-3-8-6-a. Bactéries à gram négatif :**

##### **I-1-3-8-6-a.1. Genre *Pseudomonas* :**

Ce genre appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. Les bactéries de cette famille sont des bâtonnets, mobiles par cils polaires, aérobies strictes. Les *Pseudomonas* cultivent facilement sur milieux usuels, en aérobiose, à la température de 30°C, certaines espèces comme *P.aeruginosa* en sont capables à 41°C et même 43 °C; ce caractère étant utilisé pour le diagnostic.

La production d'un pigment est assez commune dans le genre. Deux sont particulièrement fréquents et utiles pour la reconnaissance des espèces: la pyocyanine, pigment phénazinique, soluble dans l'eau et le chloroforme, spécifique de l'espèce *P.aeruginosa* ; la pyoverdine, ou pigment vert fluorescent, soluble uniquement dans l'eau et élaborée en particulier par *P.aeruginosa* et *P.fluorescens*.

Ces bactéries sont capables d'utiliser une variété très large de substrats comme source de carbone et d'énergie. Ceux-ci comprennent les glucides, lipides, acides

---

<sup>1</sup> J. B. Harbone, *The flavonoïdes, Advances in Research Science*, **1986**, 712-720.

<sup>2</sup> H. Leclerc, J-L. Gaillard et M. Simonet. *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien*. Doin Editeurs, Paris, **1995**, 605.

aminés, acides organiques, et aussi un grand nombre de corps aromatiques benzéniques, phénoliques, terpénique, des stéroïdes, etc.

Dans le genre *Pseudomonas* quelques espèces se signalent à l'attention, du fait de leur pouvoir pathogène opportuniste. *P.aeruginosa*, l'espèce type, est un germe ubiquiste communément rencontré dans le sol et plus encore dans les eaux, capable de se multiplier à 41°C contrairement à *P.fluorescens* et *P.putida*.

Fréquemment isolé sur la peau et les muqueuses de l'homme ou de l'animal, il est aussi particulièrement résistant aux antibiotiques et même aux antiseptiques. En milieu hospitalier il est à l'origine de sur infections et de suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immunodéficiences locale ou générale (brûlés, cancéreux,..etc.), et très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanées...). De même qu'il est phytopathogène avec beaucoup d'autres espèces du même genre<sup>1</sup>.

#### **I-1-3-8-6-a.2. Genre *Acinetobacter* :**

Les *Acinetobacter* appartiennent à la famille des *Neisseriaceae*, ce sont des bacilles à gram négatif, souvent coccoïdes, aérobies stricts, et habituellement résistants à la pénicilline.

Elles ont un caractère ubiquiste, présentes naturellement dans le sol et les eaux, possédant des capacités de dégradation voisines de celles des *Pseudomonas*, et par conséquent, ont un rôle important dans les processus de minéralisation (eaux) ou d'altération (aliments).

Elles colonisent la flore cutanée des patients hospitalisés, et sont de plus en plus fréquemment rencontrées dans les infections nosocomiales chez les malades immuno déprimés:

Septicémies, méningites, endocardites, abcès du cerveau, pneumonies... *A.baumannii* est l'une des espèces les plus représentatives. Leur grande résistance aux antibiotiques (voisine des *Pseudomonas*) est à l'origine de leur expansion hospitalière<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> H. Leclerc, J-L. Gaillard et M. Simonet. *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien*. Doin Editeurs, Paris, 1995, 606.

### **I-1-3-8-6-a.3. Famille des Entérobactéries :**

Ce sont des hôtes du tube digestif de l'homme et des animaux, mais aussi de nombreuses souches de cette famille ont été isolées de l'environnement aquatique ou terrestre.

Les bactéries de cette famille cultivent facilement sur milieux ordinaires et utilisent une très large variété de composés organiques simples comme source d'énergie: sucres, acides aminés, acides organiques. Elles sont anaérobies facultatives, bâtonnets, mobiles par cils péritriches ou immobiles, possédant des fimbriae appelés aussi pili communs, qui leur confèrent des propriétés hemagglutinantes, et dans certains cas, des propriétés d'adhésion aux cellules animales. La présence d'une capsule est parfois observée chez les *Klebsiella*. La plupart des Entérobactéries pathogènes se multiplient à la température optimale de 37°C<sup>1</sup>.

#### **I-1-3-8-6-a-3-1- Genre *Salmonella* :**

Les bactéries du genre *Salmonella* forment une seule espèce, à l'intérieur il y a plusieurs sous espèces, chaque sous espèce est divisée en sérotypes caractérisés par une formule antigénique spécifique. Les sérotypes peuvent être subdivisés à leur tour en biotypes (caractèresbiochimiques). Les sérotypes de *Salmonella*, sont identifiés par leurs réactions antigéniques.

Certaines *Salmonellas* sont strictement adaptées à l'homme comme: *S.typhi*, *S.paratyphi*(A, B et C), *S.sendaii*, responsables de la fièvre typhoïde et paratyphoïde humaine, et ne manifestent pas de pouvoir pathogène en dehors de l'espèce humaine, ce sont les "salmonelles majeures". Et il y a d'autres sérotypes, qui peuvent engendrer des toxi-infections alimentaires comme *S.enteritidis* et *S.typhimurinum*, qui sont connues comme des "salmonelles mineures"<sup>1</sup>, qui peuvent déterminer des infections chez de nombreuses espèces animales<sup>2</sup>. Un manque d'hygiène est très souvent à l'origine de la transmission.

#### **I-1-3-8-6-a-3-2- Genre *Escherichia* :**

Ce genre comprend 5 espèces, mais *E.coli* est la plus importante. Cette espèce est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents.

---

<sup>1</sup> J. B. Harbone, *The flavonoïdes, Advances in Research Science*, **1986**, 712-720.

<sup>2</sup> P. Berche, J-L. Gaillard et M. Simon. *Bactériologie bactéries des infections humaines. Médecine-Sciences Flammarion*, **1982**, 109.

*E.coli*, un hôte commun de l'intestin de l'homme ( $10^8$ / g de selles), et des animaux; elle est recherchée à ce titre, comme germe témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments.

A l'intérieure de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastro-entérites et diarrhées), leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. *E.coli* entéropathogène (diarrhées infantiles), *E.coli* entérotoxigène (tourista), *E.coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales), *E.coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes), *E. coli* entéroadhérent (diarrhée du voyageur).

D'autres responsables de méningites néonatales, provoquent des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes<sup>1</sup>.

#### **I-1-3-8-6-a-3-3- D'autres Entérobactéries :**

C'est surtout des souches opportunistes responsables de nombreuses infections chez l'homme, en particulier les malades hospitalisés ou immuno déprimés. Ils ont une capacité de résister à de nombreux antibiotiques ce qui explique la gravité de certaines de ces infections<sup>2</sup>.

Les *Proteus* Caractérisés par leur grande mobilité, et sont vraisemblablement d'origine tellurique. Certaines espèces d'intérêt médical tels *P.mirabilis*, *P.vulgaris* *Morganellamorganii* (ancien *Proteusmorganii*), peuvent induire des infections des voies urinaires (dans 60% des cas d'infections urinaires), des infections cutanées (surinfections des plaies chirurgicales, brûlures...), des infections des voies respiratoires (otites chroniques suppurées, sinusites ...), et même des septicémies<sup>2</sup>.

Le groupe K.E.S: C'est-à-dire *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia* ou groupe des acétoïne positive (un métabolite de leur fermentation). Il rassemble des espèces considérées depuis longtemps comme commensales, et actuellement responsables d'un grand nombre de complications infectieuses en milieu hospitalier. Les infections

---

<sup>1</sup> H. Leclerc, J-L. Gaillard et M. Simonet. *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien*. Doin Editeurs, Paris, **1995**, 606.

<sup>2</sup> P. Berche, J-L. Gaillard et M. Simon. *Bactériologie bactéries des infections humaines. Médecine-Sciences Flammarion*, **1982**, 109.

broncho-pulmonaires souvent dues à *K.pneumoniae* (1 à 5 % de toutes les pneumonies bactériennes) et plus rarement sont rencontrés *Enterobacter* et *Serratia* .

Les bactéries K.E.S. provoquent 20 % des infections urinaires nosocomiales avec une prédominance de *K.pneumoniae*. Autres infections secondaires dues à des soins ou des gestes chirurgicaux: cutanées, vasculaires, péritonéales, vésiculaires ou des septicémies causées par un matériel souillé (la mortalité reste élevée malgré une antibiothérapie adaptée)<sup>1</sup>.

*Citrobacter* Il fait partie du groupe des coliformes intestinaux qui sont des indicateurs de contamination fécale, recherchée dans l'eau et les aliments<sup>1</sup>. *Citrobacterfreundii* est rarement observée dans les infections urinaires, respiratoires ou septicémiques uniquement chez les malades immunodéprimés. Ces bactéries commensales posent un problème de diagnostic différentiel avec les Salmonelles<sup>1</sup>.

#### **I-1-3-8-6-b- Bactéries à gram positif :**

##### **I-1-3-8-6-b-1- Genre *Staphylococcus* :**

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec *staphylos*), ils sont immobiles et cultivent sur des milieux contenant 5% de NaCl et pour certains jusqu'à 10 et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs.

Les staphylocoques sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme, mais ils le sont plus fréquemment et en plus forte densité sur les surfaces cutano – muqueuses des mammifères.

Il existe une certaine relation entre les espèces de staphylocoques et l'hôte qui les héberge. *S.epidermidis* est l'espèce la plus fréquente et la plus abondante sur les surfaces cutanées de l'homme. *S.aureus* est l'espèce prédominante chez l'homme et autres mammifères, la cavité nasale de l'homme est sa niche préférentielle.

Les staphylocoques ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier. L'espèce *S.aureus*, responsable d'infections pyrogènes de la peau et des muqueuses (furoncle, impétigo, staphylococcie maligne de la face, staphylococcies bulleuses,... etc.), mais aussi osseuses

---

<sup>1</sup> H. Leclerc, J-L. Gaillard et M. Simonet. *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien*. Doin Editeurs, Paris, 1995, 607.

(ostéomyélite), digestives (entéocolites post-antibiotiques), septicémiques. *S.epidermidis* un agent de plus en plus fréquent d'infections nosocomiales<sup>1</sup>.

#### **I-1-3-8-6-b-2- Les Streptocoques :**

Ils sont subdivisés selon les études phylogénétiques en trois genres majeurs: le genre *Streptococcus* correspondant aux espèces d'intérêt médical en particulier *S.pyogenes* (groupepyogenes), et à celles de la cavité orale qui comprennent les espèces  $\alpha$  – hémolytiques (groupeviridans), le genre *Enterococcus* qui rassemble les espèces de la flore intestinale de l'homme et de certains animaux (groupe entérocoques), et le genre *Lactococcus* propre aux espèces lactiques (groupe lactique).

Les Streptocoques sont des cellules ovoïdes, sphériques ou quelquefois allongées en fuseaux, se divisent sur un seul plan pour former des paires ou des chaînettes. Ce sont des anaérobies aérotoles c'est-à-dire incapables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence, se cultivent bien dans une atmosphère contenant du CO<sub>2</sub>.

Les espèces du premier groupe, peuvent être responsables d'infections de gravité variable. *S.pyogenes* est un hôte inconstant du rhino-pharynx des individus en bonne santé et peut déterminer des infections aiguës, de la sphère ORL (angines érythémateuses, scarlatine, rhinites, sinusites, otites), de la peau et des muqueuses (érysipèle, impétigo, pyodermite), des complications non suppurées (rhumatisme articulaire aigu, glomérulonéphrite aiguë).

*S.galactiae* est un pathogène pour le nouveau né ou le jeune enfant (méningite, pneumonie, conjonctivite, otite). Le deuxième groupe représente l'essentiel de la flore microbienne de la bouche et des voies respiratoires supérieures, *S.mutans* qui rassemble sept espèces dont le rôle dans la carie dentaire est discuté, *S.oralis* (huit espèces) certaines de ces espèces sont isolées au cours d'infections purulentes ou d'endocardites.

Les espèces du groupe des Entérocoques n'ont pas un rôle important dans les infections mais sont quelquefois isolées dans les endocardites et les infections urinaires. Ils sont recherchés aussi comme indicateurs de contamination fécale des eaux de consommation et des produits alimentaires<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> H. Leclerc, J-L. Gaillard et M. Simonet. *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien*. Doin Editeurs, Paris, 1995, 605.

**I-1-3-9- Autres activités des flavonoïdes :** Les flavonoïdes possèdent aussi d'autres activités biologiques et pharmaceutiques, ils sont notamment : antiallergiques<sup>1</sup>, anti-inflammatoires<sup>2</sup>, anti-influenzas<sup>3</sup>, antifongiques<sup>4</sup>, antivirales<sup>5</sup>, **analgésiques**<sup>6</sup> cette dernière n'a pas été bien étudiée auparavant par les chercheurs d'où le choix de cette activité dans notre travail de recherche.

### **I-1-3-10- L'activité analgésique :**

#### **I-1-3-10-1-La douleur :**

**I-1-3-10-1-1- Définition :** Elle est définie comme une impression anormale et pénible reçue par une partie vivante et perçue par le cerveau. C'est un phénomène perceptif pluridimensionnel qui signifie une perte de l'intégrité physiologique<sup>7</sup>.

Elle est définie aussi par L'association Internationale d'Etude de la Douleur (IASP International Association for the Study of Pain) comme « une sensation et une expérience émotionnelle désagréable en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle ou décrites en ces termes ».

La douleur résulte de processus physiologiques complexes déclenchés lorsque les terminaisons nerveuses périphériques libres réagissent à des stimuli nociceptifs de natures diverses : brûlure, piqure, pincement, compression, agents algésiques de nature physique et chimique, produits toxiques...etc.

**I-1-3-10-1-2- Médiateurs de la douleur :** au cours du processus douloureux, l'histamine, la bradykinine, les prostaglandines (PGEI, PGF) interviennent. Les données récentes de la neuropharmacologie permettent de penser que les enképhalines (neuropeptides) et leurs

---

<sup>1</sup> T. Nakajima, M. I. Manishi, K. Yamamoto, J. C. Cyong et K. HIRAI, *Inhibitory effects of Baicalein, A Flavonoid in Scutellaria Root, on Eotaxin Production by human Dermal Fibroblasts*, *Planta Med*, **2001**, 132.

<sup>2</sup> J. A. Emin, A. B. Oliveira et A. J. Lapa, *Pharmacological Evaluation of the anti-Inflammatory activity of a Citrus Bioflavonoids, Hesperidin, and the isoflavonoids, Durtin and Claussequinone in rats and mice*, *J. Pharm. Pharmacol*, **1994**, 118.

<sup>3</sup> H. K. Kim, W. K. Jeon et B.S. Ko, *Flavanone Glycoside from Citrus junos and their Anti-influenza Virus Activity*, *Planta Med*, **2001**, 548.

<sup>4</sup> H. N. Y. Elsohl, A. S. Joshi, A. C. Nimrod, L. A. Walker et A. M. Clark, *Antifungal Chalcones fom Maclura tinctoria*, *Planta Med*, **2001**, 87.

<sup>5</sup> A. A. Shahat, P. Cos, T. D. Bruyne, S. Apers, F. M. Hammouda, S. I. Ismail, S. Azzam, M. Claeys, E. Goovaerts, L. Pieters, D. V. Berghe et A. J. Vlietinck, *Antiviral and Antioxidant activity*, **1993**, 208.

<sup>6</sup> E. M. Galati, M. T. Monforte, S. Kirjavainen, A. M. Forestieri, A. Trovato et M. M. Tripodo, *Biological Effects of Hesperidin, A Citrus Flavonoid (Note I), Anti-inflammatory and Analgesic Activity*, **1994**, 709.

<sup>7</sup> M. Bourin, M. Pièvre et A.Ervé, *cours de pharmacologie.Ed. 3 Ellipses. paris. 1993*, 324.

récepteurs sont impliqués dans l'analgésie morphinique, ils sont de deux types : la leucine-enképhaline et la méthionine enképhaline.

La substance P (peptide), inhibée par la stimulation des récepteurs enképhalineergiques. La sérotonine apparait comme un neurotransmetteurs synaptique indispensable, une déplétion en sérotonine provoquée pharmacologiquement supprime l'analgésie enképhalinergique<sup>1</sup>.

**I-1-3-10-1-3- Mécanisme de la douleur :** ils dépendent de l'étiologie de celle-ci ;

**I-1-3-10-1-1-a- la douleur nociceptive :** elle est due à une hyperstimulation des terminaisons libres entraînant hyperesthésie ou hyperalgésie. Le stimulus peut être mécanique (douleur osseuse), chimique (douleur de l'ulcère, goutte aigue) ou inflammation (dépôt d'urate par production de médiateurs endogènes tels que les kinines, les prostaglandines, la sérotonine, l'histamine). Le siège se trouve au niveau du foyer lésionnel ou à distance (douleur projetée ou référée). Cette douleur est sensible aux inhibiteurs des prostaglandines comme les AINS.

**I-1-3-10-1-1-b- la douleur neurogène :** elle survient à la suite d'une lésion périphérique médullaire ou central (traumatisme, troubles métabolitiques ou ischémiques), elle résulte également d'un dysfonctionnement de la transmission de messages : c'est le cas de brûlure, d'une décharge électrique, d'un coup de poignard, d'une hyperpathie. La douleur neurogène est peu sensible aux antalgiques, elle est plutôt traitée par les antidépresseurs.

**I-1-3-10-1-1-c la douleur psychogène :** la douleur psychologique ou psychopathologique relève de la psychologie, elle n'est pas traitée par les antalgiques<sup>2</sup>.

**I-1-3-10-2- Evaluation de la douleur :**

**I-1-3-10-2-1-Evaluation de l'intensité :** classiquement il existe deux formes de douleur :

La douleur aiguë.

La douleur chronique (3- 6 mois).

Pour évaluer la douleur il existe :

**I-1-3-10-2-1-a-Une échelle verbale simple :** Avec ;

0 : absence de douleur.

1 : douleur faible.

2 : douleur modérée ou moyenne.

3 : douleur forte.

4 : douleur extrêmement forte ou vive.

---

<sup>1</sup> E. M. Galati, M. T. Monforte, S. Kirjavainen, A. M. Forestieri, A. Trovato et M. M. Tripodo, *Biological Effects of Hesperidin, A Citrus Flavonoid (Note I), Anti-inflammatory and Analgesic Activity*, **1994**, 709.

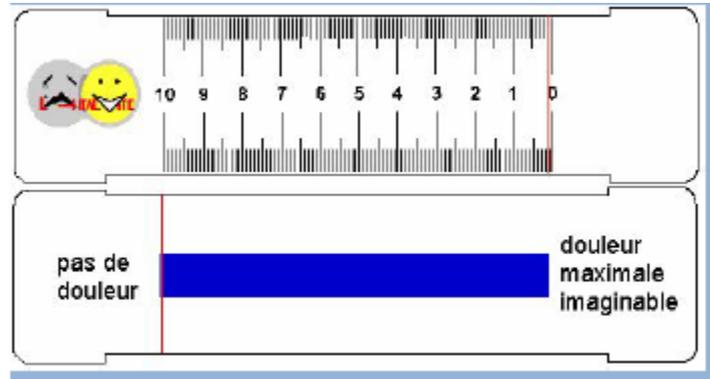
<sup>2</sup> F. Pieri, S. Kirkiacharian, *Pharmacologie et thérapeutique*. Ed. 2 Masson, Paris, **1992**, 463.

Le patient choisi le chiffre qui correspond le mieux à son état.

**I-1-3-10-2-1-b-Une échelle visuelle** (fig 02) : elle est analogue à la précédente, avec :

0 : pas de douleur.

10 : douleur maximale.



**Figure 02 : l'échelle visuelle de la douleur**

**I-1-3-10-2-2-Evaluation du retentissement** : le retentissement de la douleur est évalué par :

**I-1-3-10-2-2-a- Les signes émotionnels** : cris, pleurs, crispation, agitation, prostration...

**I-1-3-10-2-2-b- Les neuropostures** : attitude antalgique, protection de la région douloureuse...

Il existe également d'autres notions comme :

- Les troubles de sommeil.
- L'anorexie.
- La restriction des activités...

**I-1-3-10-3-Traitement conventionnel** :

**I-1-3-10-3-1-Test d'études expérimentales antalgiques** :

**I-1-3-10-3-1-a-Test de Randall et Selitto** : il consiste à soumettre à une pression mesurée la patte du rat qui réagit par un cri, l'animal analgésié ne réagit pas<sup>1</sup>.

**I-1-3-10-3-1-b-Test d'Amour et Smith** : Il s'agit de focaliser un rayon lumineux calorifique sur la queue de la souris, en moins de 6 secondes la souris déplace la queue. L'animal est considéré analgésié s'il n'y a pas de réponse au bout de 12 secondes.

**I-1-3-10-3-1-c-Test à la plaque chauffante ou hot plate test, (woolf et Mc Donald)** : le stimulus est également thermique, la souris est placée sur une plaque à la température de 56 °C. Si elle n'est pas analgésiée, elle se lèche la patte en moins de 8 secondes. Les réactions de groupes de souris naïves sont comparées<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> M. Colot, *Notions techniques de pharmacologie générale*, Edition Masson, Paris-France, 1976, 137.

**I-1-3-10-3-1-d-Test de charpentier** : la base de la queue du rat est stimulée électriquement, l'animal présente une réaction de fuite avec cris. Le seuil d'intensité de courant électrique déterminant le cri et sa variation après analgésie sont évalués.

**I-1-3-10-3-1-e-Test de torsion ou writhing test (siegmund)** : une solution de phénylbenzoquinone ou d'acide acétique à 3% est injectée par la voie intrapéritonéale à la souris ou rat. Sur des groupes d'animaux la dose analgésique empêchant le phénomène de torsion induit par le stimulus chimique est déterminée<sup>1</sup>.

**I-1-3-10-3-2-Antalgiques conventionnels** : ce sont des médicaments à action symptomatique qui atténuent ou abolissent les sensations douloureuses sans provoquer une perte de conscience ou une dépression des autres sensations contrairement aux anesthésiques. Ils constituent une famille hétérogène du point de vue chimique et pharmacologique, on distingue :

**I-1-3-10-3-2-1-Les antalgiques centraux ou majeurs** :

Il s'agit de la morphine et dérivés et les analgésiques de synthèse dont la structure est dérivée de celle de la morphine.

**I-1-3-10-3-2-1-a-Mécanisme d'action** : pour expliquer le mécanisme d'action morphinique, il est admis qu'il y aurait une action directe au niveau médullaire sur la transmission de l'influx douloureux et une action indirecte au niveau du tronc cérébral par renforcement des contrôles inhibiteurs. Sur la conscience et la sensation de la douleur, les régions les plus sensibles sont les structures du cerveau moyen (région aqueducalri-ventriculaire ainsi que le noyau médullaire du raphé).

Les effets multiples morphiniques sont expliqués par l'existence de divers récepteurs U, K,  $\delta$ . Sur le plan biochimique, il se produit un déplacement des enképhalines vers leurs récepteurs avec analgésie.

**I-1-3-10-3-2-1-b- Interaction médicamenteuse** : ils potentialisent les effets des anesthésiques locaux, des barbituriques ; leur action antalgique est potentialisée par les neuroleptiques, les spasmolytiques ; par contre les anesthésiques généraux volatils, les neuroleptiques, les antidépresseurs tricycliques augmentent l'action dépressive respiratoire des morphiniques<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> F. Pieri, S. Kirkiacharian, *Pharmacologie et thérapeutique*. Ed. 2 Masson, Paris, 1992, 463.

**I-1-3-10-3-2-1-c-Effet secondaires :** manifestations dysphoriques, effet émétisant, constipation, dépression respiratoire, hypotension orthostatique, rétention urinaire, effet toxicomanogène<sup>1</sup>.

**I-1-3-10-3-2-1-d- Contre indications :** l'emploi des analgésiques morphiniques doit être évité chez les enfant, la femme enceinte ou allaitante, voire le vieillard et l'insuffisant rénal ou hépatique.

La prise est contre- indiquée dans les cas suivants :

- Insuffisance respiratoire aigue ou chronique.
- Diverticulose sigmoïdienne.
- Traitement par les IMAO.

### **Figure 03 : Structure de quelques Antalgiques centraux**

#### **I-1-3-10-3-2-2-Les analgésiques périphériques :**

Ils regroupent des composés chimiques très hétérogènes et agissent localement au niveau du stimulus douloureux, leur mode d'action souvent proche fait intervenir pour l'essentielle l'inhibition de prostaglandine.

Ce sont :

**I-1-3-10-3-2-2-a-les analgésiques purs :** comme les phénines, floctaphénine : IDARAC.

**I-1-3-10-3-2-2-b- Les antalgiques antipyrétiques :**

-les anilides.

Paracétamol : DOLIPRANE.

-Les pyrazolés.

Aminophénazone : PYRAMIDON.

---

<sup>1</sup> M. Bourin, M. Pièvre et A.Ervé, *cours de pharmacologie.Ed. 3 Ellipses. paris. 1993*, 315.

**Figure 04 : Structure de quelques Antalgiques périphériques**

## I-2- Résultats et discussions :

### I-2-1- L'activité antibactérienne :

On a utilisé 3 souches ; Une souche bactérienne à Gram positif et deux souches à Gram négatif :

1 - *Staphylococcus aureus* 25923 ATTC. (Gram +).

2- *Proteus mirabilis* 4738 ATTC (Gram -). (Gram -).

3- *Escherichia coli* 25922 ATTC. (Gram -).

Les résultats du criblage antibactérien (Tableau 2) ont montré que l'extrait butanolique de *Tetraclinis articulata* possède une activité contre *Staphylococcus aureus* 25923 ATTC (Gram +) et *Escherichia coli* 25922 ATTC (Gram -) et non pas à *Proteus mirabilis* 4738 ATTC (Gram -) .

**Tableau 2 : L'activité antibactérienne mesurée comme une zone d'inhibition (mm)**

Type de bactérie	l'extrait butanolique
<i>Escherichia coli</i> 25922 ATTC (Gram -)	D (07mm, 16 mm)
<i>Proteus mirabilis</i> 4738 ATTC (Gram -)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923 ATTC (Gram +)	D (15 mm, 24 mm)

D : Diamètre d'inhibition.

### I-2-2- L'activité Analgésique:

#### I-2-2-1- Les Animaux :

L'étude a utilisé des souris albinos mâles et femelles de souche Swiss de 18-24 g, elles ont été fournies par l'animalerie du département de pharmacie de Constantine (Algérie).

#### I-2-2-2- Les lots d'animaux :

- Lot témoin (contrôle): sérum physiologique à 0.5 ml /souris.
- Lot 1: l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à une dose de 200 mg / kg per os.
- Lot 2: l'extrait d'AcOEt à une dose de 200 mg / kg per os.
- Lot 3: l'extrait du n-butanol à une dose de 200 mg / kg per os.
- Lot de référence: acide acétylsalicylique (Aspirine) à la dose de 300 mg / kg per os.

Chaque lot comprend un groupe de 6 souris.

L'activité antalgique est apprécié grâce un paramètre pharmacodynamique ; qui est Le pourcentage d'inhibition (PI), ce dernier est calculé par la formule suivante:

**PI = [Nombre de contorsions (témoin) -Nombre de contorsions (test)] / Nombre de contorsions (témoin).**

Le nombre des contractions dans les groupes traités ont été comparés au groupe témoin (groupe de contrôle).

Le test sur cette activité a donné les résultats suivants :

Le groupe témoin recevant le sérum physiologique présent, après l'injection intrapéritonéale d'acide acétique à 1%, un nombre de 125 contorsions sur une période de 20 minutes (Tableau 03).

L'administration orale de acétylsalicylique acide (aspirine) à une dose de 300 mg / kg, empêche de manière significative l'apparition de contorsions liées à l'administration d'acide acétique 34 (tableau 3).

L'administration orale de l'extrait de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> empêche l'apparition de contorsions chez les souris. Avec 200 mg / kg de l'extrait, les contorsions observées sont significativement différentes de celles observées avec le groupe témoin (85 vs 125) (tableau 3).

L'administration orale extrait d'AcOEt empêche l'apparition de contorsions chez les souris. Avec 200 mg / kg de l'extrait, les contorsions observées sont significativement différentes de celles observées avec le groupe témoin (57 vs 125) (tableau 3).

L'administration orale de l'extrait n-butanol empêche d'une manière significative, l'apparition de contorsions chez les souris. Avec 200 mg / kg de l'extrait, les contorsions observées sont significativement différentes de celles observées avec le groupe témoin (42 vs 125) (tableau3).

**Tableau 3 : l'activité analgésique chez les souris traitées avec un extrait hydroalcolique de feuilles de *Tetraclinis articulata* et de l'acide acétylsalicylique**

Traitement	Number of writhes	Pourcentage d'inhibition (%)
Lot témoin	125	-
Lot de Référence	34	72,8
Extrait 1	85	32,0
Extrait 2	57	54,4
<b>Extrait 3</b>	<b>42</b>	<b>66,4</b>

Extrait 1: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Extrait 2: AcOEt, Extrait 3: n-butanol

n-butanol extrait de l'espèce *Tetraclinis articulata* a un important effet analgésique (avec un pourcentage d'inhibition égale à **66,4%**) qui justifie son utilisation traditionnelle. Ces propriétés sont probablement liées à la présence de flavonoïdes.

### **I-2-3- Conclusion et perspectives :**

Les résultats du criblage anti-bactérien (voir le tableau 02) ont révélé que l'extrait butanolique de *Tetraclinis articulata* possède une activité contre l'espèce *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram +) et *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram -).

L'Extrait n-butanol de l'espèce *Tetraclinis articulata* a un important effet analgésique (Tableau 03 ; avec un pourcentage d'inhibition égale à **66,4%**) qui justifie son utilisation traditionnelle. Ces propriétés sont probablement liées à la présence de flavonoïdes.

Des expériences ultérieures utilisant des extraits purifiés sont programmées afin d'identifier précisément les composés responsables des deux activités : antibactérienne et analgésique et comprendre leur mécanisme d'action.

### **I-3-La partie expérimentale :**

#### **I-3-1-La matière végétale :**

##### **I-3-1-1-L'étude chimique de l'espèce *Tetraclinis articulata*:**

La matière végétale a été récoltée durant le mois de juin 2011 du foret de Zakor des environs de la wilaya de Mascara (ouest de la capitale algérienne), nous n'avons pris en considération que les parties aérienne de la plante.

L'opération de séchage est effectuée dans l'ombre, et loin de l'humidité, la masse de la plante était de 1000 g.

##### **I-3-1-2-Description botanique de la plante : (fig 05).**

*Tetraclinis articulata* (Thuya de Berbérie), endémique en Afrique du Nord, elle couvre environ 1 million d'hectares dans les trois pays du Maghreb (Algérie, Maroc et Tunisie)<sup>1</sup>. En Algérie, elle occupe une superficie estimée à 160 000 ha, location Lissée principalement dans la région occidentale du pays. La quasi-totalité support prend la forme halliers ceci est l'un des rares conifères capables de rejeter la souche, sa densité varie entre 1000 et 8000 arbres / ha. Leur âge varie de 10 à 60 ans<sup>2</sup>.

Cette espèce est un Arbre ou arbuste persistant (haut : 6-8 m), à la couronne large, à l'écorce brun grisâtre. Feuilles imbriquées, sur 4 rangs, squami formes. Cônes fructifères quadrangulaires (diam : 10-12 mm), solitaires et terminaux, bruns, avec 4 écailles ligneuses, triangulaires mucronées, avec des graines ailées<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> A. Benabid, *Etude écologique, phytosociologique et sylvopastorale de la Tetraclinaie de l'Amsittene*, Thèse de doctorat, Université d'Aix- Marseille III, **1976**, 3-4.

<sup>2</sup> A. Benabid, *Étude sylvo-pastorale de la tétraclinaie de l'Amsittène*, *Ecologia Mediterranea* 3, **1977**, 125.

<sup>3</sup> M. Barbero, Pquezel, R. Martinez, *Contribution à l'étude des groupements forestiers et préforestiers du Maroc*. *Phytocoenologia*, **1981**, 311-412.



**Fig 05 : Photo de l'espèce *Tetraclinis articulata***

### **I-3-1-3-Place dans la systématique**

Règne	Plantae
Division	Pinophyta
Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales
Famille	Cupressaceae
Genre	<i>Tetraclinis</i>
Espèce	<i>Tetraclinis articulata</i>

### **I-3-1-4-Intérêts thérapeutiques traditionnels de l'espèce *Tetraclinis articulata* :**

Au Maroc, les populations locales utilisent cette espèce d'arbres dans la médecine traditionnelle pour traiter divers types de maladies, y compris celles du système cardiovasculaire<sup>1</sup>, des études ont été menées sur la pharmacopée traditionnelle et les pratiques médicales en général<sup>2</sup>. Diverses parties de cet arbre sont utilisés pour ses multiples effets

<sup>1</sup> J. Bellakhdar, G. Honda, *MikiHerb—Drugs and Herbalists in the Maghrib, Institute of the Study of Languages and Cultures of Asia and Africa, Tokyo, 1982*, 33-45

<sup>2</sup> J. Belkhadar, R. Claisse, J. Fleurentin, C. Yaunos, « *Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia* », *Journal of Ethnopharmacology*. 35, **1991**,123-143.

thérapeutiques, il est principalement utilisé contre les maladies des enfants<sup>1</sup>, les infections respiratoires et intestinales<sup>2</sup>, les douleurs gastriques<sup>3</sup>, le diabète, l'hypertension artérielle<sup>4</sup>, antidiarrhéique, antipyrétique, diurétique, hypoglycémique antirhumatismal et orale<sup>5</sup>.

### I-3-1-5-Extraction

Après le broyage de la plante (1000 g), la matière végétale obtenue est mise à une macération dans une solution de méthanol chaud jusqu'à ébullition (H<sub>2</sub>O:MeOH/ 30 : 70), cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant, elle dure dans chaque fois 24 heures.

L'extrait MeOH a été concentré à sec, le résidu a été dissous dans de l'eau bouillante (600 ml). Après filtration, le résidu a été extrait successivement trois fois avec du DCM, AcOEt et du n-butanol (3 x 200 ml) pour donner 3.601g; 6.192 g et 31,146 g des résidus respectifs. Les solvants ont été évaporés et les résidus de chaque extrait ont été dissous dans de petits volumes de méthanol.

Le protocole d'extraction est résumé dans le Schéma 01:

---

<sup>1</sup> M. Bourkhiss, M. Ouhssine, M. Hnach, A. Amechrouq, A. Chaouch, *atrani Chemical composition of the essential oil of Tetraclinis articulata(Vahl) from Maroc* Phys. Chem. News, Volume 35, **2007**, 128–132.

<sup>2</sup> M. Bourkhiss, M. Ouhssine, M. Hnach, B. Satrani, A. Farah, *Chemical composition and bioactivity of branches essential oil of Tetraclinis Articulata* Bull. Soc. Pharm. Bord., Volume 146, **2007**, 75–84.

<sup>3</sup> M. Bourkhiss, M. Hnach, T. Lakhlifi, M. Ouhssine, B. Satrani, *Production and characterization of the sawdust of wood essential oil of Tetraclinis articulata (Vahl)* Masters Bull. Soc. Roy. Sci. Liège, Volume 79, **2010**, 4–11

<sup>4</sup> H. Ziyat, A. Legssyer, H. Mekhfi, A. Dassoili, M. Serhrouchni, W. Benjelloun, *Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco*, *Journal of opharmacology*. 58, **1997**, 45-54.

<sup>5</sup> R. Claisse, *Pharmacopée traditionnelle au Maroc: marché populaire de Yacoub El Mansour. Actes du Premier Colloque Européen d'Ethnopharmacologie, Metz 22–25 Mars*, **1990**, 448–449.

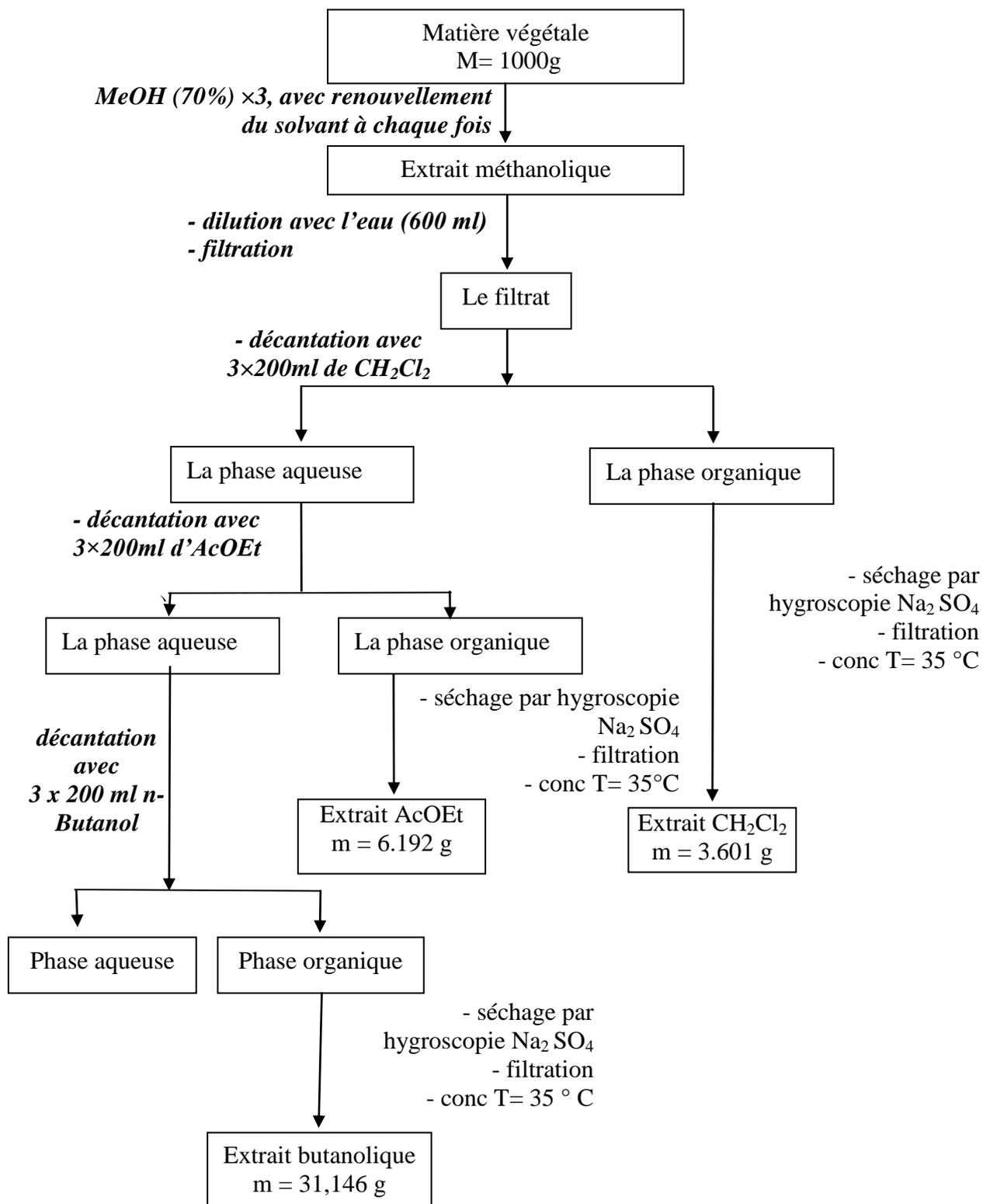


Schéma 01 : Protocole d'extraction de l'espèce *Tetraclinis articulata*

### **I-3-1-6-Séparation chromatographique de l'extrait butanolique :**

Le fractionnement d'une masse de l'extrait butanolique (1.5g) est réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice (60; 0,040-0,063mm) préparé dans le (n-Hexane).

L'éluant utilisé est le n-Hexane, avec l'addition progressive de l'acétate d'éthyle (AcOEt), le volume des échantillons prélevé de la colonne était de 100ml, et les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couche mince (feuilles d'aluminium, gel de silice 60 F<sub>254</sub> avec 0,2mm d'épaisseur), les plaques analytiques ont été développées avec différents systèmes, et visualisées sous lampe UV, à 254 et 365 nm, puis révélées avec un révélateur à base d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et d'acétate d'éthyle (AcOEt), et chauffées pendant 3 minutes à 100°C .

### **I-3-2-Activité antibactérienne :**

Le Protocole du test d'activité antibactérienne de l'extrait butanolique de l'espèce *Tetraclinis articulata* est composé des étapes suivantes : La figure 06.

#### **I-3-2-1- Préparation des disques de papiers buvard<sup>1,2</sup>:**

Le choix du papier buvard se fait par rapport à son épaisseur et à sa qualité d'absorption (après plusieurs essais).

- Découper le papier buvard sous forme de disques (6 mm de diamètre).
- stériliser au four Pasteur à 170°C pendant 4 heures.
- Verser dans les conditions d'asepsie totales une quantité suffisante de chaque extrait (butanolique, de l'acétate d'éthyle, et méthanolique) de l'espèce *Tetraclinis articulata* après leur stérilisation à froid par filtration en utilisant des filtres seringues dont le diamètre des pores est de 0.2µm dans des boîtes de Pétri stériles.
- Imprégner les disques du papier buvard dans les boîtes précédentes à raison de 4 disques par extrait et par boîte.
- Laisser un temps de contact (d'absorption).
- Récupérer les disques à l'aide d'une pince stérile ; mettez les dans une autre boîte de Pétri stérile.
- Sécher les disques à l'étuve 37°C pendant 30 minutes.
- Stériliser les disques sous UV (ultra violet) 254 nm pendant 20 mn à une distance de 20 cm<sup>1,2</sup>.

#### **I-3-2-2- Préparation du témoin<sup>1,2</sup>:**

Nous avons procédé avec la même technique en remplaçant chaque extrait par son solvant d'extraction.

#### **I-3-2-3- Préparation de la suspension des souches de référence<sup>1,2</sup>:**

**I-3-2-3-1- Souches cibles utilisées :** une souche bactérienne à Gram positif et deux souches à Gram négatif :

- 1 - *Staphylococcus aureus* 25923 ATTC. (Gram +).**
- 2- *Proteus mirabilis* 4738 ATTC. (Gram -).**
- 3- *Escherichia coli* 25922 ATTC. (Gram -).**

---

<sup>1</sup> K. Bouti, *Les genres rares Planomonospora, Planobispora, Spirillospora et Streptosporangium (Actinomycetes) dans les sols sahariens : Taxonomie numérique et études de quelques uns de leurs antibiotiques.* These de magister. ENS.EL Kouba, Alger, **1997**, 49.

<sup>2</sup> L. Hilali, *Isolement de Nouvelles souches d'actinomycetes productrices de substances antifongique à partir du milieu naturel marocain .Rev.Biol and Biotech by the marocain Society of Biology. Canada, 2, 2002, 49-53.*

### **I-3-2-3-2- Origine :**

Les souches nous ont été fournies par le laboratoire central de bactériologie médicale « CHU Constantine ».

### **I-3-2-3-3- Vérification de la pureté des souches :**

Nous avons vérifié la pureté des souches de référence cibles par observation microscopique.

### **I-3-2-3-4- Inoculum<sup>1</sup> :**

- A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

- décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

- bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland (illustré dans le control de l'inoculum) ou à une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.

- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

- L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

### **I-3-2-3-5- Ensemencement<sup>2</sup>:**

#### **- Milieux utilisés**

Géloses Muller Hinton (MH), coulées en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm (Les géloses sont séchées avant emploi).

#### **- Milieu Muller-Hinton :**

#### **-Composition : (g/l d'eau distillée)**

- Infusion de viande de bœuf déshydratée..... 300 g
- Hydrolysat de caséine..... 17.5 g
- Amidon..... 1.5 g
- Agar.....17 g

pH final : 7.4 ± 0.2

---

<sup>1</sup> K. Rahal, *Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle Nationale. Selon les recommandations de l'OMS ; Alger, ALGERIE, 2005*, 116.

<sup>2</sup> L. Hilali, *Isolement de Nouvelles souches d'actinomycetes productrices de substances antifongique à partir du milieu naturel marocain .Rev.Biol and Biotech by the marocain Society of Biology. Canada, 2, 2002*, 49-53.

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- le nombre de boîtes ensemencées est en fonction du nombre des extraits à tester par souches cibles.
- chaque boîte doit être séparée en deux compartiment le premier pour déposer le disque de l'extrait à tester et le deuxième c'est pour le témoin.

#### **I-3-2-3-6- Application des disques<sup>1</sup>:**

- Nous avons utiliser une pince stérile pour appliquer les disques à la surfaces des milieux déjà ensemencés à raison d'un seul disque de chaque extrait et du témoin par souche cible et par boîte de pétri . Sans oublier de marquer le compartiment du témoin.

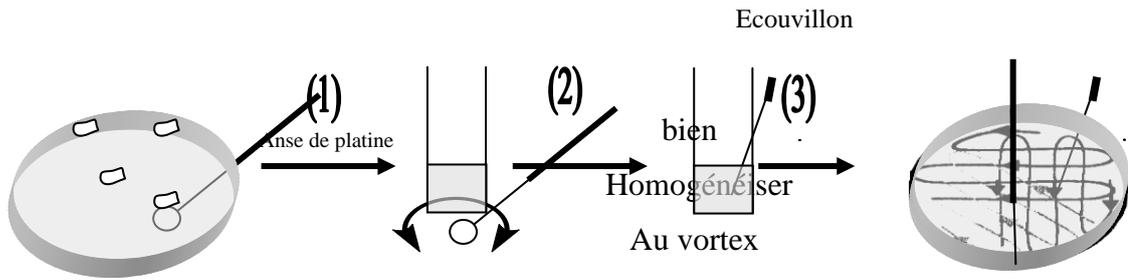
- les boîtes de pétri sont placées à 4°C pendant 2 heures puis incubé à 37°C.

**I-3-2-3-7- Lecture<sup>2</sup> :** S'il y a une activité ; mesurer avec précision, le diamètre des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique.

---

<sup>1</sup> K. Rahal, *Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle Nationale. Selon les recommandations de l'OMS ; Alger, ALGERIE, 2005*, 116.

<sup>2</sup> K. Rahal, *Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle Nationale. Selon les recommandations de l'OMS ; Alger, ALGERIE, 2005*, 116.



Prélever à l'aide d'une anse de  
Platine stérile des colonies pures  
frotter sur la totalité

Décharger le contenu de  
l'anse dans l'eau physiologique

imbiber l'écouvillon  
et l'essorer puis le

boîtes a deux

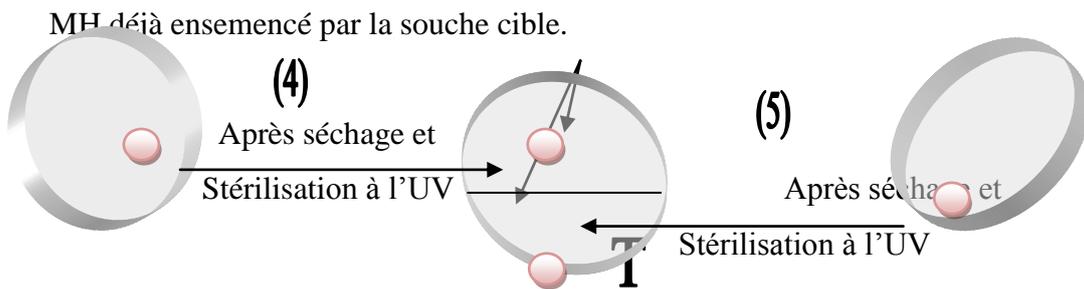
Stérile.

de la surface des

Compartiment

contenant le milieu MH.

Application des bandelettes sur le milieu



Imprégner les disques dans l'extrait.  
disques du témoin dans

Imprégner les

d'extraction stérile.

le solvant

Incuber à 37°C pendant  
24 à 48heurs.

Lecture

En cas d'activité ; Mesurer avec précision, le diamètre des zones d'inhibition  
A l'aide d'un pied à coulisse métallique.

**Figure 06: Protocole du test d'activité antibactérienne sur milieu liquide.**

### **I-3-3- l'activité analgésique :**

#### **I-3-3-1-les Animaux :**

L'étude a utilisé des souris de souche suisses des deux sexes pesant 18-24 g, ces dernières ont été fournies par l'animalerie de département de pharmacie de Constantine (Algérie).

#### **I-3-3-2-Méthodes :**

Des expériences ont été réalisées sur un modèle de douleur induite par l'acide acétique chez la souris à jeun 15 heures avant l'expérience. L'injection intrapéritonéale d'acide acétique à 1% chez la souris provoque un syndrome douloureux qui est manifestée par des contractions caractéristiques avec étirement des pattes postérieures et la musculature dorso-ventral. Le nombre d'étirage est enregistré 20 minutes après l'injection d'acide acétique<sup>1</sup>. Le gavage a été effectué en utilisant une sonde de gavage pour rongeurs et chaque groupe reçoit:

- Lot témoin (contrôle): sérum physiologique à 0.5 ml /souris.
- Lot 1: l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à une dose de 200 mg / kg per os.
- Lot 2: l'extrait d'AcOEt à une dose de 200 mg / kg per os.
- Lot 3: l'extrait du n-butanol à une dose de 200 mg / kg per os.
- Lot de référence: acide acétylsalicylique (Aspirine) à la dose de 300 mg / kg per os.

20 minutes après administrations des préparations à tester une solution d'acide acétique à 2%, est injectée par voie intrapéritonéale aux souris de chaque lot, on procède au dénombrement des contractions observées dans chaque lot pendant une période de 20 minutes. Le pourcentage d'inhibition (PI) est calculé par la formule suivante:

**PI = [Nombre de contorsions (contrôle) -Nombre de contorsions (test)] / Nombre de contorsions (contrôle)**

---

<sup>1</sup> S Gy, A Fall, W Diatta, M Gueye et E Badji, *Analgesic and anti-inflammatory activity of aqueous root extract of Cassia sieberiana D. C. (Caesalpiaceae) Afr.j. pharm. Pharmacol*, **2009**, 3, 651-653.

# **Partie 02 : synthèse organique**

## **Chapitre II**

**Couplages de Buchwald-Hartwig  
entre des thiosucres et des acides**

**aminés halogénés:**

**Vers la synthèse de glucoconjugués  
thioglycopeptides**

## II-1- Introduction :

Les glucoconjugués sont formés d'un ou plusieurs oses liés par leur fonction réductrice à une molécule, dite aglycone. Ils sont source inépuisable d'architectures moléculaires complexes et sont considérés comme des outils précieux pour étudier les interactions qui contrôlent les processus biologiques complexes du monde du vivant. Certains d'entre eux sont utilisés en cliniques, tels que la doxorobucine (anticancéreux)<sup>1</sup> ou le thiocolchoside (myorelaxant)<sup>2</sup> (Figure 07).

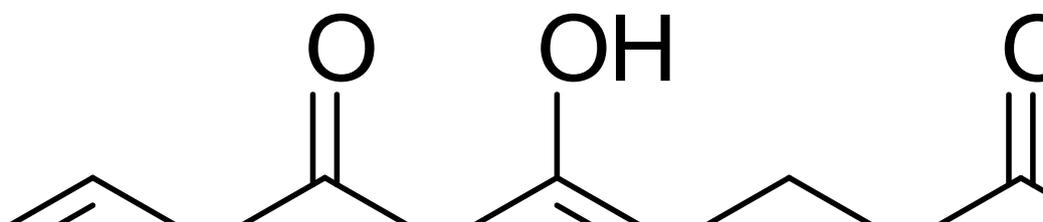


Figure 07 : hétérosides naturels ou non-naturels biologiquement actif

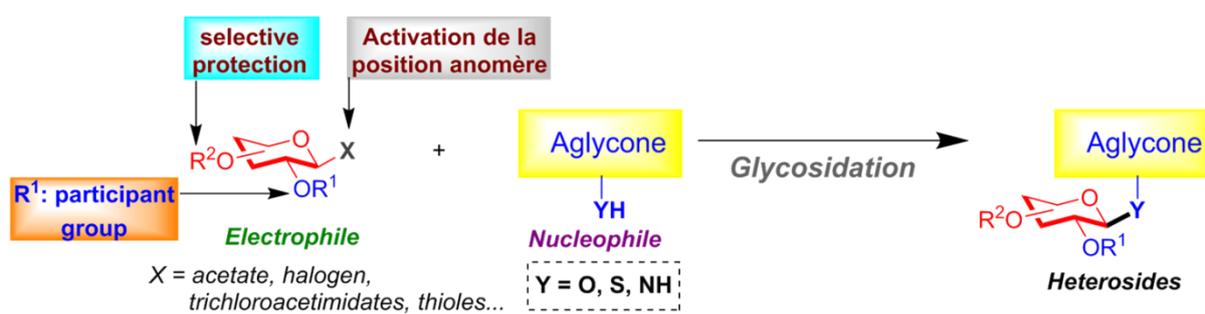
Ces unités oses, sous forme monosaccharides, disaccharides ou oligosaccharides, sont importantes voir essentielles pour l'activité biologique (participation dans la reconnaissance de cibles cellulaires)<sup>3</sup>. Elles sont souvent attachées à leur aglycone *via* une liaison glycosidique sous forme de liaison C-O, C-N, C-S ou C-C de configuration  $\alpha$  ou  $\beta$  bien définie (Figure 07).

<sup>1</sup> L. Vaccan, D. Canton, N. Zaffaroni, R. Villa, M. T. Enzo di Fabrizio. *Micro-and Nano- Enginneering MNE*, **2006**, 83, 1598-1601.

<sup>2</sup> M. Carta, L Murru, P. Botta, G. Talani, G. Pietro Sechi, P. Luigi De Riu, E. Sanna, g. Bigggio. *Neuropharmacology*. **2006**,51, 805-815.

<sup>3</sup> W. Wilson, *Nat. Prod. Rep.* **1997**, 14, 99-110.

Leur complexité structurale a contraint les glycochimistes à établir des stratégies de protection/déprotection successives<sup>1</sup> pour former les liaisons osidiques entre les aglycones et les sucres correspondants *via* des réactions de glycosylations. L'approche la plus développée pour créer une liaison glycosidique est l'attaque nucléophile irréversible d'une aglycone sur la position anomère d'un donneur de glycoside activé. Cette méthode est basée sur la glycosylation de Koenigs-Knorr qui utilise un halogénure de glycoside et des alcools simples en présence de sels d'argent. La plupart des réactions de glycosylations modernes sont basées sur une variante de cette méthode qui consiste à activer un sucre possédant un groupe partant en position anomère (par exemple un acétate, un atome d'halogène, un groupement trichloroacétimidates, un groupement thiol...etc) puis permettre l'attaque nucléophile d'une aglycone (Schéma 02).



**Schéma 02: Méthode classique utilisée pour la glycosidation d'un aglycone**

## II-2- Couplage de Buchwald-Hartwig :

### II-2-1- Historique et rappel bibliographique des couplages de Buchwald-Hartwig:

L'amination d'Ullmann<sup>2</sup> et Goldberg<sup>3</sup> d'halogénures d'aryles par un sel de cuivre date du début du XX<sup>ème</sup> siècle.<sup>4</sup> Cependant, l'une des limitations principales est l'utilisation de conditions opératoires draconiennes (températures élevées, bases fortes, temps de réaction longs et quantités stoechiométriques de cuivre). Les pionniers dans ce que l'on pourrait appeler la réaction de *N*-arylation moderne sont Stephen L. Buchwald<sup>5,6</sup> et John F. Hartwig,<sup>7,8</sup> qui ont rapporté la même année des études séparées sur la catalyse par le palladium de cette réaction (Schéma 03).

<sup>1</sup> K.C.Nicolaou, H. J.Mitchell, *Angew.Chem. Int.Ed.* **2001**, 40, 1576-1624.

<sup>2</sup> F. Ullmann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1903**, 36, 2382-2384.

<sup>3</sup> I. Goldberg, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, 39, 1691-1692.

<sup>4</sup> K. Kunz, U. Scholz, D. Ganzer, *Synlett*, **2003**, 2428-2439

<sup>5</sup> A. S. Guram, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7901-7902.

<sup>6</sup> A. S. Guram, R. A. Rennels, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Edit.* **1995**, 34, 1348-1350.

<sup>7</sup> F. Paul, J. Patt, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 5969-5970.

<sup>8</sup> M. S. Driver, J.F. Hartwig, *J Am Chem Soc* **1996**, 118, 7217-7218.

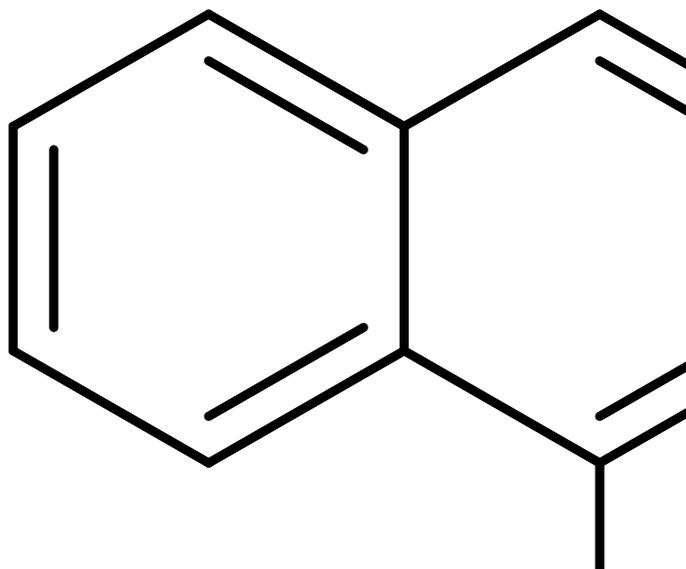
### Schéma 03 : Création de la liaison C-N métallo-catalysée

Ces dernières années, cette réaction est devenue polyvalente et a permis de synthétiser plusieurs dérivés auparavant difficiles d'accès.<sup>1</sup> Les recherches effectuées ont permis de diversifier les catalyseurs, les rendant moins sensibles à l'air et à l'humidité, d'utiliser des solvants et des bases plus communs, de réduire les temps de réactions, d'abaisser la température (même à température ambiante<sup>2</sup>) et d'augmenter ainsi les rendements et la sélectivité. La réaction de *N*-arylation nécessite l'utilisation d'une base, d'un catalyseur et d'un ligand approprié. Dans ce cas, les complexes de palladium Pd(OAc)<sub>2</sub> ou Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> se sont avérés être des catalyseurs de choix, et divers ligands de type phosphine ou carbénoïde favorisent la réaction (Figure 08).

---

<sup>1</sup> (a) G. Evano, N. Blanchard, M. Toumi, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3054–3131. (b) J. F. Hartwig, *Organotransition Metal Chemistry*, University Science Books, Sausalito, **2010**, 907; (c) J. F. Hartwig, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1534–1544; (d) R. Martin, S. L. Buchwald, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1461–1473 (e) Surry D. S. ; Buchwald, S. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6338–6361.

<sup>2</sup> J. P. Wolfe, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2413–2416.



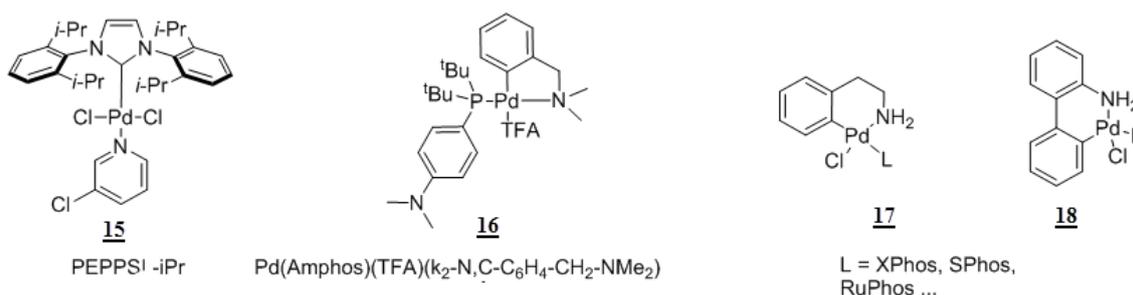
**Figure 08: Ligands utilisés dans diverses réactions d'aminations**

De plus, lors de cette réaction, il est nécessaire d'avoir comme point de départ un palladium au degré d'oxydation zéro à la base du cycle catalytique. Si le complexe de palladium utilisé est un  $\text{Pd(II)}$ , une étape de réduction en  $\text{Pd(0)}$  est nécessaire pour amorcer le cycle catalytique. Cette réduction peut avoir lieu *via* le ligand ou la base.<sup>1</sup> Afin d'éviter les

---

<sup>1</sup> a) C. Amatore, E. Carre, A. Jutand, M. A. M'Barki, G. Meyer, *Organometallics* **1995**, *14*, 5605, b) A. Jutand, , *Chem.Rev.* **2008**, *108*, 2300.

réactions parasites pendant le processus de réduction du palladium, différents groupes ont travaillé sur le développement de pré-catalyseur, en lieu et place du catalyseur et du ligand, stable à l'air et à l'humidité, qui est réduit *in-situ* en espèce réactive par la base ajoutée dans le milieu. Quelques exemples sont représentés illustrant la possibilité de faire réagir des espèces très peu réactives et des systèmes fortement encombrés en utilisant de faible charge catalytique (Figure 09).<sup>1</sup>



**Figure 09 : Pré-catalyseurs dans les réactions d'aminations**

Le mécanisme de l'amination de Buchwald-Hartwig (Schéma 04) est similaire à celui décrit pour la formation d'une liaison C-C.<sup>2,3</sup> Le complexe phosphine-palladium(0) subit une addition oxydante avec l'halogénure aromatique, le complexe **II** formé évolue après une étape de coordination de l'amine en complexe **III**. Cette coordination va exacerber l'acidité de l'amine qui subit en présence de la base l'élimination de HX et conduire au complexe **IV**. Après élimination réductrice, l'amine aromatique est obtenue, régénérant ainsi le complexe **I**.<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> a) R. B. Bedford, C. S. Cazin, J. Simon, T. Gelbrich, P. N. Horton, M. B. Hursthouse, M. E. Light, *Organometallics* **2003**, 22, 987. b) A. Chartoire, M. Lesieur, A. M. Slawin, S. P. Nolan, C. S. J. Cazin, *Organometallics* **2011**, 30, 4432. c) T. Kinzel, Y. Zhang, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 14073. d) C. J. O'Brien, E. A. B. Kantchev, C. Valente, N. Hadei, G. A. Chass, A. Lough, A. C. Hopkinson, M. G. Organ, *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 4743. e) A. Bruneau, M. Roche, M. Alami, S. Messaoudi, *ACS. Catal.* **2015**, 5, 1386

<sup>2</sup> U. K. Singh, E. R. Stierter, D. G. Blackmond, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 14104

<sup>3</sup> L. M. Alcazar-Roman, J. F. Hartwig, A. L. Rheingold, L. M. Liable-Sands, I. A. Guzei, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 4618

<sup>4</sup> D. S. Surry, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47, 6338.

<sup>5</sup> S. Shekhar, P. Ryberg, J. F. Hartwig, J. S. Mathew, D. G. Blackmond, E. R. Stierter, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3584.

### Schéma 04 : Mécanisme de Buchwald-Hartwig

Ces dernières années, la réaction a été étendue à différents nucléophiles azotés (amides,<sup>1</sup> azoles,<sup>2</sup> ...), oxygénés (alcools, phénols) et soufrés (thiols et thiophénols) ainsi que divers électrophiles (tosylates,<sup>3</sup> mésylates,<sup>4</sup> ...). Ce couplage a été très étudié et ainsi des conditions relativement douces (base faible, température peu élevée...) ont été développées pour différents substrats, cependant peu d'exemples décrivent le couplage de thiols sur des halogénures aromatiques. Nous rapporterons ici quelques exemples de la littérature.

#### II-2-2-Création de la liaison C-S par des métaux de transition :

##### II-2-2-1-Création de liaison C-S pallado-catalysée :

Généralement, la création de la liaison C-S est possible grâce à une réaction de type Buchwald-Hartwig. Cette réaction initialement développée pour créer la liaison carbone-azote a ensuite été étendue à la création de la liaison carbone-oxygène puis carbone-soufre. La création de la liaison carbone-soufre a été plus tardivement développée car il est admis que les liaisons entre les métaux de transitions et les thiols forment des complexes d'interactions très stables dont beaucoup ont été rapportés dans la littérature<sup>5</sup>. Cette coordination forte a laissé

---

<sup>1</sup> J. Yin, S. L. Buchwald, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1101-1104.

<sup>2</sup> K. W. Anderson, R. E. Tundel, T. Ikawa, R. A. Altman, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2006**, 45, 6523-6527.

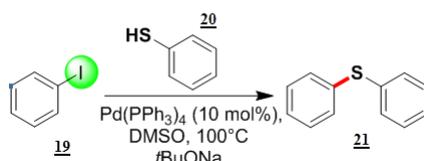
<sup>3</sup> X. Huang, K. W. Anderson, D. Zim, L. Jiang, A. Klapars, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6653-6655.

<sup>4</sup> B. P. Fors, D. A. Watson, M. R. Biscoe, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13552-13554.

<sup>5</sup> a) A. Bastero, C. Claver, A. Ruiz, *Catal. Lett.* **2002**, 82, 85-88. b) A. M. Masdeu-Bulto, M. Diéguez, E. Martín, M. Gomez, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, 242, 159-201. c) G. Paladino, D. Madec, G. Prestat, G. Maitro, G. Poli, A. Jutand, *Organometallics* **2007**, 26, 455-458.

penser qu'il serait impossible d'utiliser les thiols dans des couplages pallado-catalysés. Cependant des travaux récents de la littérature révèlent que les thiols sont de très bons réactifs nucléophiles avec les halogénures d'aryles conduisant après une étape d'élimination réductrice aux thioéthers souhaités.

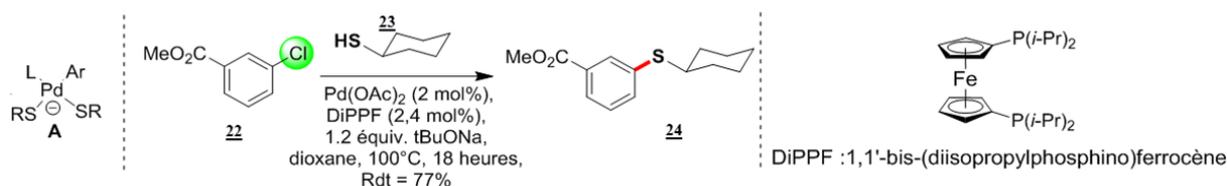
Dans ce contexte Migita *et al.* en 1978, ont rapporté pour la première fois le couplage de thiols aliphatiques et aromatiques sur des aryles halogénés<sup>1</sup> en présence de palladium tétrakis dans le DMSO (Schéma 05). Le mécanisme de cette transformation est similaire à celui proposé pour la création de la liaison C-N par Buchwald-Hartwig.



**Schéma 05 : Premier report de la création de la liaison C-S**

Cette réaction a ensuite été rapidement développée par différentes équipes dans le but d'étendre son champ d'application à différents thiols et différents électrophiles.

La plus grande avancée dans cette transformation est l'étude décrite par l'équipe de Buchwald<sup>2</sup> démontrant l'intérêt de l'utilisation du ligand bidentate DiPPF pour créer la liaison C-S (Schéma06). En effet, ce ligand en se coordonnant bien au palladium empêcherait sa désactivation *via* la formation d'un complexe **A** résultant de la réaction de deux molécules de thiolates sur le métal. Ainsi le système catalytique Pd(OAc)<sub>2</sub>/DiPPF a permis d'élargir le champ d'application de cette réaction aux alkyles thiols ainsi qu'aux électrophiles chlorés.



**Schéma 06 : Utilisation de ligand bidentate pour la création de la liaison C-S**

Peu de temps après Hartwig *et al.*<sup>3</sup> ont rapporté la performance de ligands bidentates dans les créations de liaisons C-S pallado-catalysées. Ainsi l'utilisation de JosiPhos (CyPF-*t*Bu), ligand extrêmement encombré développé précédemment pour la création de la liaison C-N<sup>4</sup>, permet d'avoir un excellent TON (Turn-Over Number) pour le couplage de différents

<sup>1</sup> M. Kosugi, T. Shimizu, T. Migita, *Chem. Lett.* **1978**, 13-14.

<sup>2</sup> M. Murata, S. L. Buchwald, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7397-7403.

<sup>3</sup> (a) M. A. Fernandez-Rodriguez, Q. L. Shen, J. F. Hartwig, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7782-7796, (b) M. A. Fernandez-Rodriguez, Q. L. Shen, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2180-2181.

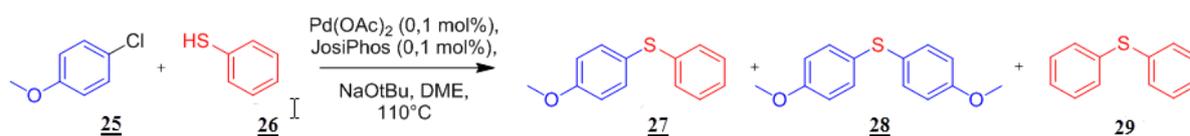
<sup>4</sup> Q. Shen, S. Shekhar, J. P. Stambuli, J. F. Hartwig, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1371-1375.

thiols (aromatiques, aliphatiques primaires et secondaires) sur des électrophiles chlorés possédant des groupements fonctionnels sensibles (nitriles, esters, aldéhydes, acide carboxyliques). Il est à noter que ces électrophiles peuvent aussi comporter des fonctions non-protégées comme des phénols, anilines ou encore amides.

L'utilisation de ligands bidentates encombrés permet d'augmenter le « TON » et par conséquent de réduire la charge catalytique. Le rôle du ligand est donc d'éviter la formation des complexes **A** et **B** durant le cycle catalytique tout en favorisant les étapes d'insertion oxydante, transmétallation et élimination réductrice (Schéma 07).

### Schéma 07 : Création de la liaison C-S catalysé par le palladium

La formation de **A** résultant de l'addition d'un deuxième équivalent de thiolate sur l'espèce réactive entraîne la désactivation de l'espèce catalytique si le processus n'est pas réversible. De plus, l'espèce **B** qui est un complexe bimétallique ponté par les atomes de soufre a été observé ; Il possède une cinétique d'élimination réductrice beaucoup plus faible que l'espèce non-pontée. Dans cette étude, il a aussi été rapporté l'obtention de thioéthers symétriques provenant de l'électrophile ou du thiol lui-même (Schéma 08). La formation de ces deux produits secondaires pourrait être expliquée par analogie avec le couplage au nickel rapporté par Takagi *et al*<sup>1</sup> pour former la liaison C-S (Schéma 09).



### Schéma 08 : Produits secondaires observés lors de cette réaction

<sup>1</sup> K. Takagi, *Chem. Lett.* **1987**, 11, 2221-2224.

### Schéma 09 : Formation des produits secondaires

La clé de tout ce mécanisme tient dans l'aptitude du nickel à s'insérer dans la liaison carbone-soufre (étape **A** ou **B**) et donc entraîner l'obtention des deux produits secondaires. Bien que minoritaires, ces produits secondaires sont évidemment difficiles à séparer du produit final, il est donc nécessaire de diminuer au maximum leur présence. Différentes conditions de couplages ont donc été développées pour s'affranchir de ces problèmes<sup>1, 2</sup>. Il a été remarqué que l'utilisation d'une amine tertiaire telle que la triéthylamine permet de supprimer la formation de thioéthers symétriques.

Des études ont été mises en œuvre pour mettre à jour les étapes élémentaires du mécanisme réactionnel. Ces travaux ont été entrepris sur des thiolates d'étain dans un premier temps<sup>3, 4, 5</sup>. Plus récemment, Campagne et Jutand<sup>6</sup> ont étudié le mécanisme de la réaction de thiolation d'iodobenzène par la cystéine en utilisant les techniques d'électrochimie et de spectroscopie RMN (Schéma 10).

---

<sup>1</sup> C. S. Bryan, J. A. Braunger, M. Lautens, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7064-7068.

<sup>2</sup> C. C. Eichman, J. P. Stambuli, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4005-4008.

<sup>3</sup> D. Baranano, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2937-2938.

<sup>4</sup> J. Louie, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11598-11599.

<sup>5</sup> G. Mann, D. Baranano, J. F. Hartwig, A. L. Rheingold, I. A. Guzei, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9205-9219.

<sup>6</sup> X. Moreau, J. M. Campagne, G. Meyer, A. Jutand, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3749-3760.

### **Schéma 10: Mécanisme proposé par Campagne et Jutand**

Ils ont notamment montré grâce à la RMN  $^{31}\text{P}$  que le thiol se complexait au palladium avant d'être déprotoné par la triéthylamine. De plus, l'étape limitante de ce mécanisme serait l'élimination réductrice.

#### **II-2-2-2-Création de la liaison C-S catalysée par le nickel :**

La création de la liaison entre un thiol et un électrophile halogéné a aussi été étudiée en présence d'un complexe de nickel. L'équipe de Cristau<sup>1</sup> a rapporté les premiers travaux dans ce contexte (Schéma 11).

### **Schéma 11 : Première catalyse au Nickel pour créer la liaison C-S**

Les conditions développées sont assez draconiennes mais ont le mérite de décrire pour la première fois la formation de la liaison C-S à l'aide de nickel. Les rendements obtenus varient de 65 à 100% et la réaction tolère la présence de différents groupements électro-attracteurs (p-CN, p-amide) ou encore électro-donneurs (p-Me, p-NH<sub>2</sub>, p-OMe). La méthode a pu être étendue par la suite à des mésylates d'aryles réputés peu réactifs en utilisant 10mol%

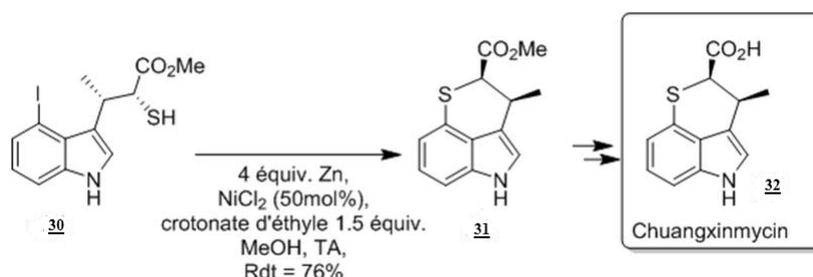
---

<sup>1</sup> H. J. Cristau, B. Chabaud, A. Chene, H. Christol, *Synthesis* **1981**, 892-894.

de NiCl<sub>2</sub>dppf en présence de 20mol% de dppf supplémentaire. Récemment,<sup>1</sup> l'emploi de ligand de type NHC (N-hétérocyclic carbene) a accru ce champ d'application vis-à-vis de substrats fonctionnalisés comportant des groupements (nitro, nitrile ou cétone) (Schéma 12). De plus, contrairement aux ligands phosphines, l'utilisation de NHC améliore le « TON »<sup>2</sup> de la réaction et permet de réduire la charge du catalyseur (1- 4mol%).

### Schéma 12 : Catalyse grâce à un carbène de Nickel

La dernière méthode qui a retenu notre attention est celle de Peng *et al.*<sup>3</sup> rapportant pour la première fois un couplage à température ambiante en utilisant du chlorure de nickel en présence de crotonate d'éthyle comme ligand. Une quantité stœchiométrique de Zn est employée pour réduire *in-situ* le nickel(II) en nickel(0). Cette méthode développées avec divers substrats fonctionnalisés a été utilisée et appliquée à la synthèse de la chuangxinmycin *via* un couplage intramoléculaire (Schéma 13).



### Schéma 13 : Création de la liaison C-S à température ambiante

#### II-2-2-3-Création de la liaison C-S par d'autres métaux de transition (Cu, Mn, Fe, Co, In, Rh)

D'autres méthodes permettant la création de la liaison C-S ont été réalisées grâce à l'emploi d'autres métaux de transition (Tableau 04). Bien qu'elles soient complémentaires à celles utilisant des complexes de palladium ou de nickel, ces méthodes sont peu utilisées dans la littérature.

<sup>1</sup> Y. G. Zhang, K. C. Ngeow, J. Y. Ying, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3495-3498.

<sup>2</sup> a) O. Baldovino-Pantaleon, S. Hernandez-Ortega, D. Morales-Morales, D. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 236-242. b) Y. Yatsumonji, Y. Ishida, A. Tsubouchi, T. Takeda, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4603-4606. c) S. Jammi, P. Barua, L. Rout, P. Saha, T. Punnlyamurthy, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 1484-1487.

<sup>3</sup> X. B. Xu, J. Liu, J. J. Zhang, Y. W. Wang, Y. Peng, *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 550-553.

**Tableau 04: Création de la liaison C-S par d'autres métaux**

**Buchwald *et al.*<sup>1</sup>**

Caractéristiques :

-Temps de réaction important, limité aux électrophiles iodés aromatiques,  
- compatibles avec des thiols aromatiques ou aliphatiques.

**Bolm *et al.*<sup>2</sup>**

Caractéristiques :

-Temps de réaction important, limité aux aromatiques iodés et thiophenols,  
-catalyse possible grâce à une quantité infime de cuivre.

**Cheng *et al.*<sup>3</sup>**

Caractéristiques :

-Temps de réaction important,  
-applicable aux électrophiles aromatiques,  
- compatibles avec des thiols aromatiques ou aliphatiques,  
-faible quantité de catalyseur.

**Rao *et al.*<sup>4</sup>**

Caractéristiques :

-Temps de réaction important, quantité de catalyseur importante,  
-applicable aux électrophiles aromatiques,  
- compatibles avec des thiols aromatiques ou aliphatiques.

**Lee *et al.*<sup>5</sup>**

Caractéristiques :

-temps de réaction important, catalyseur coûteux,  
applicable seulement aux aromatiques iodés,  
-thiols aromatiques ou aliphatiques compatibles

Il est à noter que différents métaux ont donc été utilisés afin de former la liaison C-S entre différents thiols et différents électrophiles halogénés. Dans la majorité des cas, les thiols aliphatiques se révèlent être de moins bon partenaires que les dérivés aromatiques. De plus, la diversité par rapport à l'électrophile halogéné (halogénures vinyliques et halogénoalcynes) n'a pas été explorée et mérite d'être étudiée.

<sup>1</sup> F. Y. Kwong, S. L. Buchwald, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3517-3520.

<sup>2</sup> a) A. Correa, M. Carril, C. Bolm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2880-2883. b) S. L. Buchwald, C. Bolm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5586-5587.

<sup>3</sup> Y. C. Wong, T. T. Jayanth, C. H. Cheng, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 5613-5616.

<sup>4</sup> V. P. Reddy, K. Swapna, A. V. Kumar, K. R. Rao, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3189-3191.

<sup>5</sup> C. S. Lai, H. L. Kao, Y. J. Wang, C. F. Lee, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4365-4367.

### II-3-Conclusion

En conclusion, nous avons vu à travers ces méthodes que l'utilisation des motifs thioglycosides dans les couplages de type Buchwald-Hartwig a été extrêmement peu abordée. En effet une seule étude rapporte ce type de couplage avec des thiosucres, cependant le groupement triazène nécessaire au couplage rend la méthode limitée aux substrats préfonctionnalisés. De plus, cette méthode utilise une quantité stœchiométrique de cuivre pour pouvoir former correctement la liaison C-S.

### II-4- Objectifs

Nous souhaitons développer une méthode générale permettant d'introduire un motif de type thiosucre sur un électrophile halogéné de type acide aminé *via* une réaction de type Buchwald-Hartwig (Schéma 04). Nous évaluerons l'influence de la nature des thiosucre (thioglycose, thiogalactose, thioribose,...) mais aussi sa configuration anomérique ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) sur la réactivité (Schéma 14).

#### Schéma 14 : Objectif du travail

Il sera aussi examiné le champ d'application de la méthode et sa compatibilité vis-à-vis de divers groupement fonctionnels, en vue de l'appliquer à la synthèse de molécules complexes (peptides ou protéines) et/ou bioactives (Schéma 15)

#### Schéma 15 : Stratégie envisagée pour les glycoconjugués

# **Chapitre III**

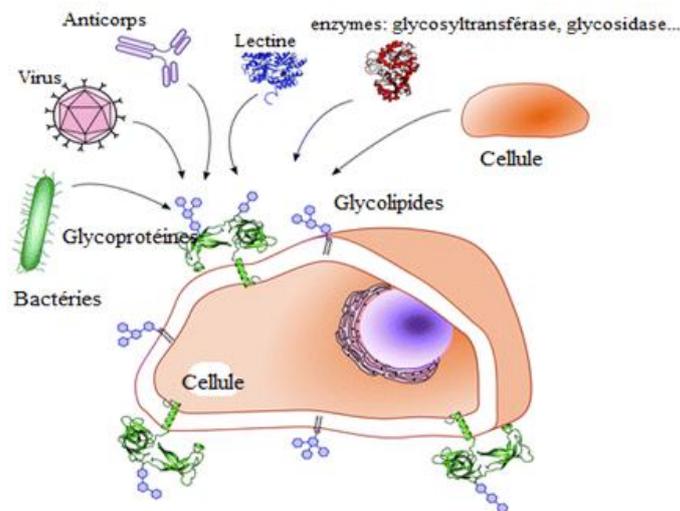
## **Résultats et discussions**

### III- Résultats et discussions :

#### III-1- Introduction: la liaison thioglycosidique, forme rare chez les protéines glycosylées.

##### III-1-1-Les sucres et les protéines, partenaires clés du monde du vivant :

La glycosylation est un processus ubiquitaire considérée comme la modification co- et post- traductionnelle la plus complexe rencontrée chez les protéines et joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques<sup>1</sup>. Les fonctions de ces oligosaccharides qui recouvrent la surface des protéines sont multiples, ils assurent par exemple l'expression et le repliement correct des protéines mais également leur solubilité, ou encore favorise leur stabilité thermique et *vis-à-vis* de la protéolyse. Par conséquent, des erreurs de glycosylation peuvent entraîner des modifications importantes de ces protéines et conduire à l'apparition de différentes pathologies ; diabète, cancer, maladies neurodégénératives ou auto-immunes... d'autre part les protéines membranaires sont les médiateurs de la communication cellulaire, les oligosaccharides, qui servent alors de récepteurs, sont déterminants dans les processus de virulence microbienne, d'inflammation ou encore de réponse immunitaire (Figure 10)<sup>1</sup>.



**Figure 10 : les glycanes, médiateurs de la communication cellulaire<sup>2</sup>**

La glycosylation est le résultat de l'activité d'une variété de GT et GH au sein de l'appareil de Golgi ou du Reticulum Endoplasmique, travaillant ensemble pour la biosynthèse de glycanes complexes reliés à un acide aminé (AA) spécifique<sup>3</sup>. Les oligosaccharides sont majoritairement rattachés *via* l'oxygène O<sub>y</sub> d'une Sérine (Ser) ou Thréonines (Thr) (O-glycanes) ou *via* l'azote N<sub>δ</sub> d'une Asparagine (Asn) (N-glycanes). Parmi la variété de motifs sucres disponibles, 5 entités sont fréquemment retrouvées dans les séquences

<sup>1</sup> A. Varki, *Glycobiology*, **1993**, 3, 97-130.

<sup>2</sup> P. Lafite, R. Daniellou, *Nat. Pod. Rep*, **2012**, 29, 729-738.

<sup>3</sup> H. Mrazek, L. Weignerova, P. Bojarova, P. Novak, O. Vanek, K. Bezouska, *Biotechnol. Adv*, **2013**, 31, 17-37.

oligosacharidiques, le glucose (Glc), le galactose (Gal), le mannose (Man), le *N*-acétylglucosamine (GlcNac) ou le *N*-acétylgalactosamine (GalNac)<sup>1</sup>. Dans la nature, les glycoprotéines sont biosynthétisées sous la forme de mixture de protéines, ces dernières partageant le même squelette peptidique différent par la nature, le nombre et le site de glycosylation, aussi appelé glycoforme. Cependant, d'autres formes de glycosylation ont été répertoriées dans la nature, mettant en jeu des motifs sucres ou lien glycosidiques exotiques qui suscitent de plus d'intérêt parmi la communauté scientifique.

### III-1-2-Les formes rares de protéines glycosylées :

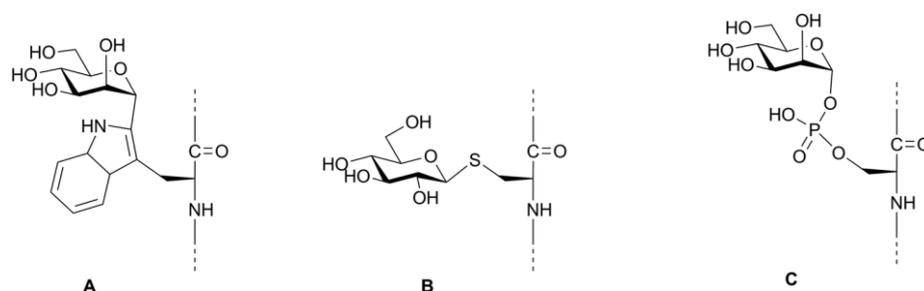
Comme développé ci-dessus, la glycosylation des protéines fait intervenir 2 types de liaisons principales, *O*-glycosidique et *N*-glycosidique, à partir des 5 motifs sucre récurrents Glc, Gal, Man, GlcNac et GalNac. D'autres types de glycosylation ont par la suite été identifiées dans la nature, et varient dans l'identité de l'unité sucre couplée à l'AA de la chaîne peptidique ou dans la nature du lien sucre-AA<sup>3</sup>. Parmi les hexoses, le fucose a été le premier exemple de sucre non-usuel reporté sur une protéine de l'urine humaine (pro-urokinase) (A, Figure 11). Le xylose et le rhamnose, très abondants dans la nature, sont rarement impliqués dans le phénomène de glycosylation. Les *O*-xylosylation (B) et *O*-rhamnosylation (c) ont cependant été décrites sur les protéoglycanes (protéines de surface) de cellules mammifères et bactériennes respectivement. Des documents font également référence à la présence de motifs furanoses, tel que l' $\alpha$ -L-arabinofuranose (D) glycosylé aux protéoglycanes ou lectines de plante (son de riz et pomme de terre respectivement)<sup>2</sup>.

**Figure 11 :** Motifs sucre non-usuel des glycoprotéines. (A)  $\alpha$ -L-fucosylation, (B)  $\beta$ -D-xylosylation, (C)  $\alpha$ -L-rhamnosylation et (D)  $\alpha$ -L-arabinofuranosylation.

---

<sup>1</sup> P. Lafite, R. Daniellou, *Nat. Pod. Rep*, **2012**, 29, 729-738.

Parmi les liaisons glycosidiques exotiques, on retrouve les C- glycosylations qui sont le résultat d'une liaison covalente C-C entre une unité  $\alpha$ -mannosyle et le carbone indolique C-2 d'un résidu tryptophane (Trp) (A, Figure 12). Les liaisons phosphoglycosidiques (C) sont également représentées et ont été identifiées majoritairement chez les parasites protozoaires (tels que les leishmanies ou Tripanosomes). Enfin les liaisons S- glycosidiques font partie des modifications de protéines les moins connues (B)<sup>1</sup>. A l'heure actuelle la littérature recense 3 exemples de peptides naturels S- glycosylés. La création de telles liaisons glycosylées. Malgré tout, peu d'études ont été réalisées sur ces biocatalyseurs naturels ou artificiels à ce jour.



**Figure 12 :** Liaison sucre-acides aminés rares. (A) Trp C- mannosylé, (B) Ser phosphomannosylée et (C) Cys S-glucosylée.

**III-1-3- Biosynthèse des thioglycoprotéines, les S-glycosyltransférases naturelles :** d'un point de vue historique, Lote *et coll.* ont reporté pour la première fois la glycosylation d'un résidu Cystéine de 2 peptides à partir d'extraits humains. Ainsi dans l'urine ils ont identifié un octapeptide S-glycosylé *via* un motif digalactose<sup>2,3</sup>. Puis un décapeptide de motif similaire portant un triglucoside a été caractérisé à partir de membranes d'erythrocytes<sup>4</sup> malgré l'intérêt de ces études, elles ont été pendant de nombreuses années sujettes à controverses faute de nouveaux exemples de peptides S-glycosylés identifiés<sup>5</sup>. C'est en 2011, en plus récemment en 2014, que la présence de S- glycosylation dans la nature a été confirmée grâce à 3 études indépendantes faisant référence à la découverte de nouveaux thioglycopeptides aux propriétés antimicrobiennes, la sublancine, le glycocine F, et le thurandacine.

Le glycopeptide sublancine produit par *Bacillus subtilis 168* est constitué d'un enchainement de 37 acides aminés dont un résidu Cystéine est S- Glucosylé (figure 13)<sup>6</sup>. La S- glycosyltransférases (appartenant à la famille des GT2) a été identifiée, exprimée chez *E. coli* et caractérisée comme catalyseur efficace du transfert du motif glucose de l'UDP- $\alpha$ -D-

<sup>1</sup> P. Lafite, R. Daniellou, *Nat. Pod. Rep*, **2012**, 29, 729-738.

<sup>2</sup> C.J. Lote, J. B. Weiss, *Biochem.J*, **1971a**, 123, 25P.

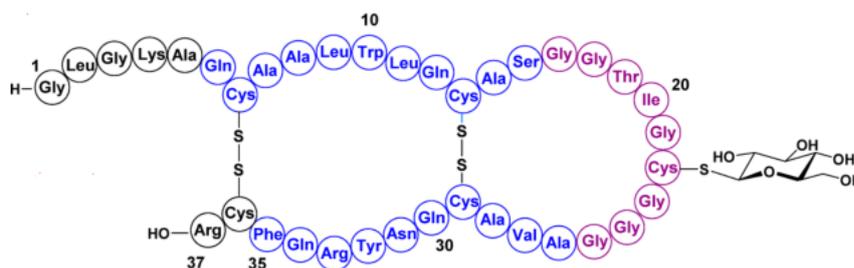
<sup>3</sup> C.J. Lote, J. B. Weiss, *FEBS Lett*, **1971b**, 16, 81-85.

<sup>4</sup> J. B. Weiss, C. J. Lote, H. Bobinski, *Nat. New. Biol*, **1971**, 234, 25-26.

<sup>5</sup> R. Sardzik, P. Both, S. L. Flitsch, *Nature chemical Biology*, **2011**, 7, 69-70.

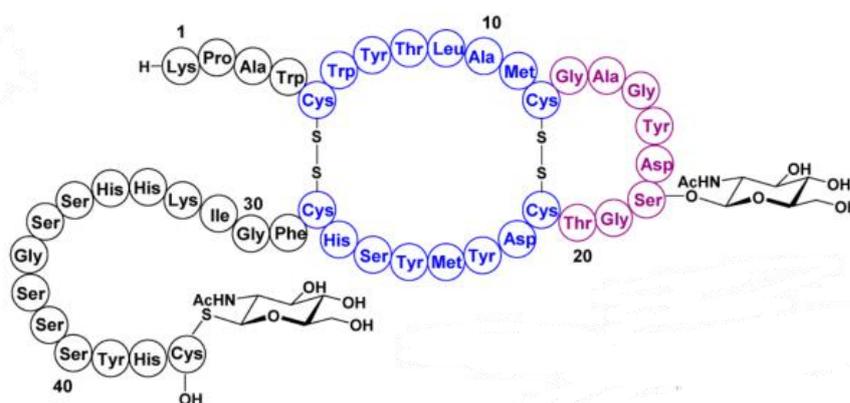
<sup>6</sup> T. J. Oman, J. M. Boettcher, H. Wang, X. N. Okalibe, W. A. Van der donk, *Nature Chemiocal Biology*, **2011**, 7, 78-80.

glucose sur le résidu Cystéine. Si les GT sont reconnues par leur étroite spécificité vis-à-vis du substrat, SunS présente quant à elle une relative flexibilité dans la reconnaissance du nucléotide-sucre. En effet Wang *et coll.* ont mis en évidence la synthèse de divers analogues glycosylés à partir d'UDP- $\alpha$ -D-N-acétylglucosamine, UDP- $\alpha$ -D-galactose, GDP- $\alpha$ -D-mannose et d'UDP- $\alpha$ -D-xylose comme donneurs activés. Suite à ces résultats prometteurs, l'exploitation de SunS pour la biosynthèse d'analogues peptidiques de la sublancine a été approfondie en s'appuyant sur des études de relation structure-activité de SunS en fonction du peptide substrat<sup>1</sup> (Figure 13).



**Figure 13 : structure de la sublancine**

La caractérisation du bactériocine glycocin F, sécrété chez *lactobacillus plantarum* KW30, a permis l'identification d'une liaison thioglycosidique non usuelle entre un motif N-acétylglucosamine et un résidu Cystéine de la chaîne peptidique (Figure 14)<sup>2</sup> des études structurales réalisées par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont confirmées l'existence de 2 unités N- acétylglucosamine, l'une fixée sur l'atome d'oxygène d'une Sérine, la seconde sur l'atome de soufre d'une Cystéine.<sup>3</sup>



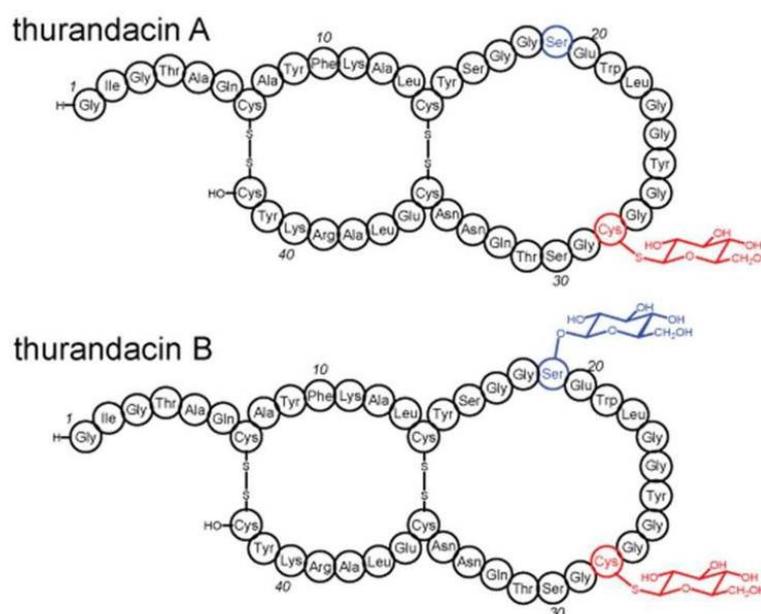
**Figure 14: structure du glycocin F.**

<sup>1</sup> H. Wang, W. A. Van der donk, *J. Am. Chem.Soc.* **2011**, 133, 16394-16397.

<sup>2</sup> J. Stepper, S. Shastri, T. S. Loo, J. C. Preston, P. Novak, P. Man, C. H. Moore, V. Havlicek, M. L. Patchett, G. E. Norris, *FEBS Lett*, **2011**, 585, 645-650.

<sup>3</sup> H. Venugopal , P. J. B. Edwards, M. Schwalbe, J. K. Claridge, *Biochemistry*, **2011**, 50, 2748-2755.

En 2014, Wang *et coll.* ont mis en évidence la voie de biosynthèse des thurandacines A et B produits chez *Bacillus thuringiensis serovar andalousiensis* BGSC 4AW. A partir d'un clusterv de gènes présentant de grandes similitudes avec ceux impliqués dans les voies de biosynthèse de la substance et du glycocone F, ils ont ainsi pu identifier le gène de la glycosyltransférase ThuS. Les glycopeptides thurandacine sont constitués d'une séquence de 42 acides aminés, la forme A est monoglycosylée sur le résidu Cystéine 28 tandis que la forme B présente 2 sites de glycosylations, sur le résidu Cysteine 28 et le résidu Sérine 19 (Figure 15). La transférase ThuS représente ainsi le premier catalyseur de O- et S-glycosylation de peptides *in vitro*<sup>1</sup>



**Figure 15: structure de la thurandacine A et B.**

L'étude des glycoprotéines est devenue d'un intérêt majeur dans le domaine de la glycobiologie pour tenter de comprendre les relations de structure/activité inhérentes à ces molécules et permettre le développement de nouveaux traitements thérapeutiques<sup>2</sup> l'inconvénient majeur de tels travaux repose sur l'obtention de formes homogènes de glycoprotéines. A partir d'extraits naturels leur isolation reste difficile, le challenge à l'heure actuelle porte donc sur la mise au point de méthodologies de synthèse permettant la glycosylation spécifique de protéines à partir de glycanes bien définis<sup>3</sup> dans cette optique les efforts se sont tournés vers la génération de thioglycoprotéines synthétiques comme modèles

<sup>1</sup> H. Wang, T. J. Oman, R. Zhang, C. V. Garcia De Gonzalo, Q. Zhang, W. A. Van der donk, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 84-87.

<sup>2</sup> D. P. Gamblin, E. M. Scalan, B. G. Davis, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 131-163.

<sup>3</sup> K. Pachamuthu, R. R. Schmidt, *Chem.Rev.*, **2006**, 106, 160-187.

d'étude. En effet, la relative faible abondance de l'atome de soufre dans les structures de protéines ainsi que sa forte nucléophilie facilite le couplage spécifique de glycanes sur la chaîne peptidique. D'autre part, comme décrit précédemment les liaisons thioglycosidiques sont tolérées par la plupart des systèmes biologiques et restent peu sensibles à l'hydrolyse enzymatique, elles sont donc compatibles avec leur étude *in-vivo*. Enfin, l'obtention de formes homogènes de protéines S-glycosylées permettrait d'accroître nos connaissances sur la S-glycosylation des protéines, phénomène rare et récemment identifié dans le monde du vivant.

### **III-2-Travaux antérieur de l'équipe de Chimie thérapeutique de l'université paris sud**

#### **11 et but du projet :**

Le développement de nouvelles stratégies efficaces et stéréosélectives de glycosylation d'acides aminés, peptides et de protéines reste un défi majeur de la communauté des chimistes. Bien qu'il existe diverses méthodes robustes pour la synthèse de glycopeptides, elles nécessitent toutes l'utilisation des étapes de protections et déprotections laborieuses et très coûteuses en temps, en matière et en énergie. Dans ce contexte, nous souhaitons développer une nouvelle approche aux glycopeptides sans faire appel à ces étapes de protection/déprotection.

Le but principal de mon stage consiste à développer une nouvelle approche de glycosylation innovante d'acides aminés et de peptides basée sur des couplages métallocatalysés (Buchwald-Hartwig) de thiosucres avec des peptides possédant un acide aminé halogéné.

Une avancée importante dans ce domaine a été apportée au sein de l'équipe du Dr Messaoudi en 2013 quant à l'utilisation de 1-thiosucres nucléophiles dans les couplages avec des aglycones halogénés. Cette équipe décrit le couplage de thiols glycosylés protégés avec des aryles électrophiles<sup>1</sup> puis des alcènes et alcynes halogénés (Schéma 16).<sup>2</sup>

### **Schéma 16 : Couplage palladié pour la formation de thiohétérosides**

---

<sup>1</sup> E. Brachet, J. D. Brion, M. Alami, S. Messaoudi, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355, 477.

<sup>2</sup> E. Brachet, J. D. Brion, M. Alami, S. Messaoudi, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355, 2627.

Le couplage est réalisé en présence d'une quantité catalytique de palladium (5% mol.), de ligand (2,5% mol.), 1 équivalent de triéthylamine dans le dioxane de 75 à 100°C. Ce protocole est très efficace et tolère plusieurs groupements fonctionnels sur la partie aglycone y compris des fonctions sensibles (imines, esters, cétones énolisables.)

Ce système est également compatible avec différents groupements protecteurs sur le sucre (Ac, Bn). C'est un couplage stéréosélectif avec un contrôle parfait de la configuration anomérique.

Cette méthode est efficace avec les thiols glycosylés protégés, mais n'est pas utilisable avec leurs pendants déprotégés, qui se dégradent dans les conditions de couplage. C'est pourquoi une seconde méthode permettant le couplage des thiosucres déprotégés a été développée au laboratoire (Schéma 17).<sup>1</sup>

L'utilisation de sels de Ni, préalablement réduits en présence de Zinc, permet d'obtenir les thiohétersides déprotégés avec d'excellents rendements et un champ d'application similaire à la méthodologie précédente.

L'avancée majeure étant la possibilité d'effectuer le couplage à température ambiante contrairement au protocole au palladium qui nécessite d'être à une température minimale de 75°C.

### Schéma 17 : Couplage au Nickel de thiosucres déprotégés

Les deux méthodes présentées sont complémentaires et permettent l'utilisation des thiosucres protégés ou non. Elles possèdent néanmoins des inconvénients, notamment l'utilisation d'un excès de réactifs (1,5 éq. de sucre avec le Pd et 1,5 éq. d'électrophile avec le Ni, respectivement), le chauffage dans un cas et l'emploi d'une quantité importante de sels métalliques toxiques (30% mol. de Ni) dans l'autre cas.

Récemment, le groupe du Dr Messaoudi a décrit une autre méthode générale de couplage de thiols glycosylés avec des électrophiles halogénés<sup>2</sup> pour former des S-hétérosides. Des très

---

<sup>1</sup> E. Brachet, J. D. Brion, M. Alami, S. Messaoudi, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 15276.

<sup>2</sup> A. Bruneau, M. Roche, A. Hamze, J. D. Brion, M. Alami, S. Messaoudi, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 8375 – 8379

bons résultats sont obtenus avec les thiols glycosylés protégés ainsi qu'avec les autres nucléophiles soufrés testés (Schéma 18).

### Schéma 18 : Couplage général de couplage au Palladium de thiosucres

Contrairement aux méthodes présentées précédemment, aucun excès de réactifs n'est nécessaire. Ce qui se révèle particulièrement utile lors de l'utilisation de substrats onéreux ou complexes à synthétiser. La charge catalytique est également plus faible que nos deux précédents protocoles mais permet néanmoins un couplage à température ambiante.

### III-3-Travaux personnels :

#### III-3-1-Synthèse des matières premières:

##### III-3-1-a-Synthèse des thiosucres:

La synthèse des thioglycosides de départ est bien décrite dans la littérature. Diverses méthodes ont été utilisées en fonction du thioglycoside envisagé. Une stratégie en trois étapes<sup>1</sup> nous a permis l'obtention des 1-thio-β-D-glucopyranose **S3**, 1-thio-β-D-galactose **S7** et 1-thio-β-D-cellobiose **S6** avec de très bons rendements sur trois étapes (Schéma 19).

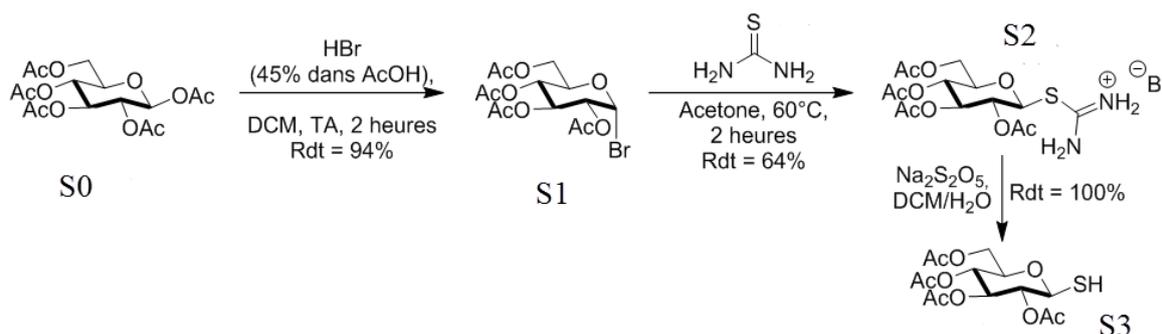
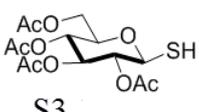
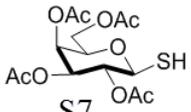
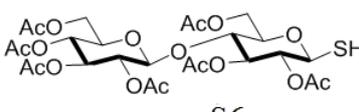


Schéma 19: Synthèse de β-thioglycoside grâce à la thiourée

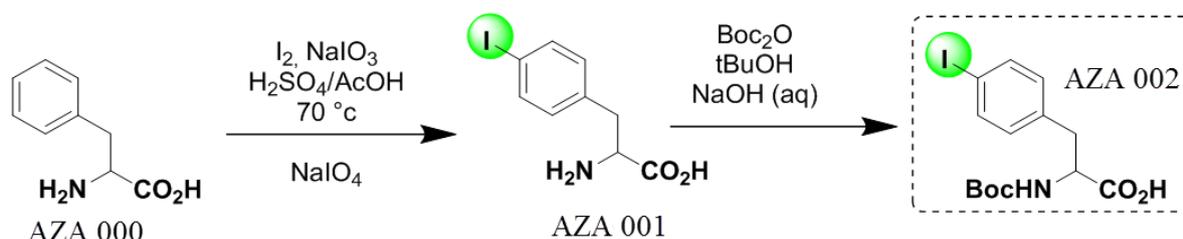
<sup>1</sup> N. Floyd, B. Vijaykrishnan, J. R. Koeppe, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7798–7802.

**Tableau 05 : Matières premières et rendements obtenus**

 <b>S3</b>	 <b>S7</b>	 <b>S6</b>
<b>60%</b>	<b>65%</b>	<b>55%</b>

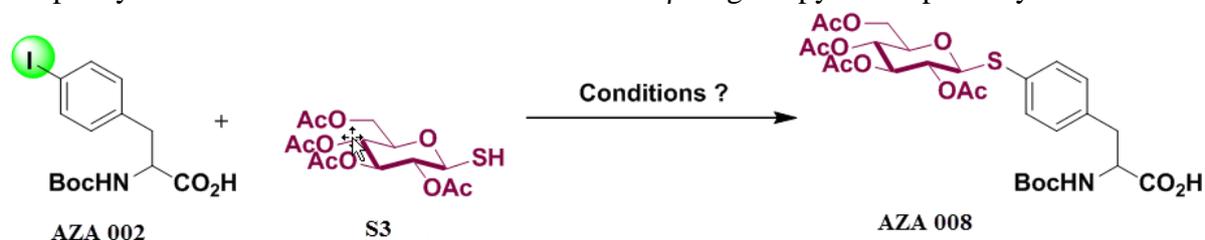
### III-3-1-b- Synthèse de le phenylalanine iodée:

La phenyl alanine iodée a été synthétisée en deux étapes selon la procédure décrite par Dumas *et al.*<sup>1</sup> (Schéma 20). La première étape est une réaction d'iodation régiosélective de la phenylalanine commerciale en présence de l'Iodine (I<sub>2</sub>) et du iodate de sodium en tant qu'agent oxydant. La réaction est chauffée dans un mélange de l'acide sulfurique et de l'acide acétique. Dans ces conditions, le produit d'iodation AZA 001 a été obtenu avec un rendement quantitatif. Ce dernier est engagé dans une étape de protection de la fonction amine par un groupement Boc. En opérant dans des conditions basiques aqueuses, le produit AZA 001 est convertit en composé N-Boc aniline AZA 002 avec un excellent rendement de 60 %.



**Schéma 20 : préparation de 4-iodo-L-phenylalanine**

Après avoir synthétisé les thiosucres de départ, nous avons étudié le couplage de ces substrats avec la 4-iodophénylalanine NHBoc AZA 002. Pour ce faire, nous avons choisi la réaction modèle représentée sur le (schéma 21). Elle fait intervenir le couplage de la 4-iodophénylalanine NHBoc AZA 002 avec le 1-thio-β-D-glucopyranose peracétylé S3.



**Schéma 21 : Réaction modèle envisagée**

<sup>1</sup> A. Dumas, C. Spicer, G. Zhanghua Tsuyoshi, A. Yuya, T. Yasukohchi, D. Benjamin, *Angewandthe chemie*, **2013**, 55-56.

En utilisant les conditions décrites récemment au laboratoire : Pd-G3 Xantphos (3mol%), Et<sub>3</sub>N (1 equiv) dans un mélange (THF : H<sub>2</sub>O) (1 : 2 ), le produit de couplage **AZA 008** a été obtenu pour la première fois avec un rendement acceptable de 55% (Tableau 07 essai 1). Différents essais ont ensuite été menés afin d'améliorer le processus de couplage (Tableau 06).

Au cours de cette étude, nous avons remarqué que le solvant THF favorise la formation du produit désiré : conduire la réaction uniquement dans le THF conduit au produit de couplage avec une conversion totale et un excellent rendement de 96% (Tableau 06 essai 2). Enfin, le temps de la réaction est réduit à 30 minutes au lieu d'une 1h tout en conservant le même rendement (Tableau 06 essai 3).

**Tableau 06: Optimisation des conditions opératoires**

Essai	Pd	Ligands	Base	Température	Temps de la réaction	Solvant	Rendement
1	Pd G3	Xantphos (3 mol %)	Et <sub>3</sub> N	25 C°	1 heure	(THF/H <sub>2</sub> O) (1:2)	55
2	Pd G3	Xantphos (3 mol %)	Et <sub>3</sub> N	25 C°	1 heure	THF 100%	96
3	Pd G3	Xantphos (3 mol %)	Et <sub>3</sub> N	25 C°	30 minutes	THF 100%	96

### III-3-2- Commentaires sur le mécanisme de la réaction de couplage par Pd-G3 :

La particularité de ce système catalytique repose sur le fait de générer une espèce de palladium très réactive à 12 électrons de valence **PdL1**. Pour ce faire, la base (Et<sub>3</sub>N) vient dans un premier temps, déprotonner le NH du précatalyst qui ensuite subira une élimination réductrice pour fournir une quantité catalytique de carbazole et l'espèce réactive Pd-L1 (avec L = Xantphos) (Schéma 22). Cette espèce Pd(0) peut catalyser une réaction d'addition oxydante avec un aryle halogéné à température ambiante.

### Schéma 22 : mécanisme d'activation du précatalyseur PdG3-Xantphos

Une fois le système catalytique déterminé, nous avons exploré son efficacité en l'appliquant à divers partenaires électrophiles ainsi qu'à divers thiosucres préparés

préalablement.<sup>1</sup> Dans un premier temps, nous avons évalué la généralité de nos conditions opératoires en faisant varier la nature des thiosucres. Les résultats sont rassemblés dans la figure 16. Nous constatons que les conditions optimales sont générales, elles ont été appliquées à différents thiosucres comme le 1-thio-D-glucopyranose peracétylé, 1-thio-D-galactopyranose peracétylé et 1-thio-N-acétyl-D-glucopyranose peracétylé. De plus, le partenaire électrophile la 4-iodophénylalanine NHBoc **AZA 002**, peut être sous forme acide ou ester. Il est important de signaler que la réaction de couplage s'effectue avec une parfaite rétention de la configuration anomérique S- glycosidique.

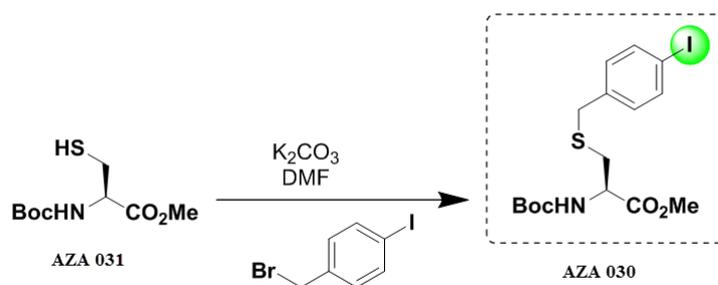
#### **Figure 16 : Étendues et limites du couplage en série phényl aniline iodée**

Pour repousser les limites de cette réaction, nous avons réalisé le couplage de la 4-iodophénylalanine NHBoc **AZA 002** avec un disaccharide : le cellobiose. Le produit de couplage **AZA 028** est obtenu avec un bon rendement et une parfaite conservation des configurations anomériques S- glycosidique ainsi que la 1-4-O- glycosidique.

Dans une autre partie de ce travail, nous avons voulu étendre cette méthode à d'autres acides aminés électrophiles (halogénés) notamment des dérivés de la cystéine. Ainsi, le composé **AZA 031**, a été préparé selon la méthode décrite dans la littérature en faisant réagir la N-Boc cystéine ester **AZA 030** avec le 1-(bromométhyl)-4-iodobenzène en présence de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans le DMF (Schéma 23). Le produit benzylé attendu **AZA 031** a été obtenu avec un bon rendement de 84 %.

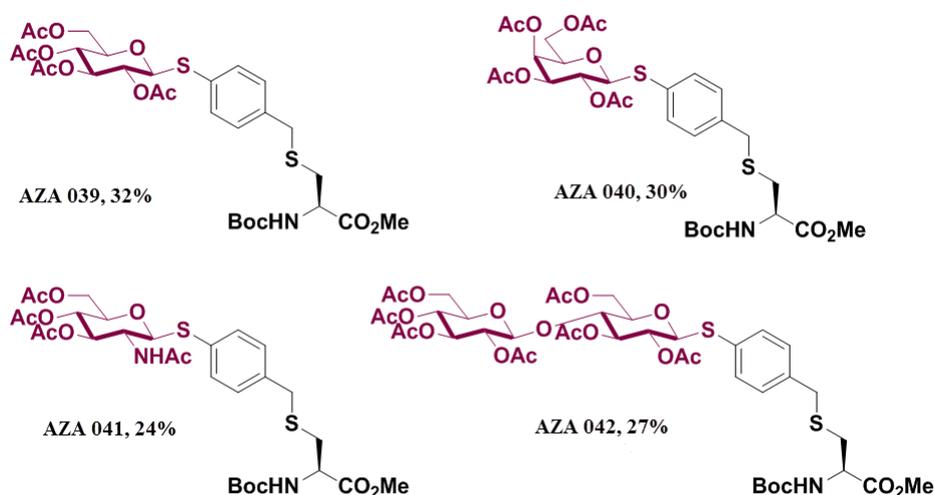
---

<sup>1</sup> E. Brachet, J. D. Brion, S. Messaoudi, M. Alami, *Adv. Synth. Catal.* **2013** 355, 477-490



**Schéma 23 : synthèse du substrat AZA 030, dérivé de la cystéine**

Les conditions développées auparavant sont appliquées sur le substrat **AZA 030** et se sont révélées efficaces néanmoins les rendements obtenus sont sensiblement plus faibles (24% à 32%) que ceux obtenus dans la série phénylalanine iodée (Figure 17). Ces faibles rendements sont probablement dus à la faible stabilité du substrat de départ ainsi que les produits de couplages. enZyme

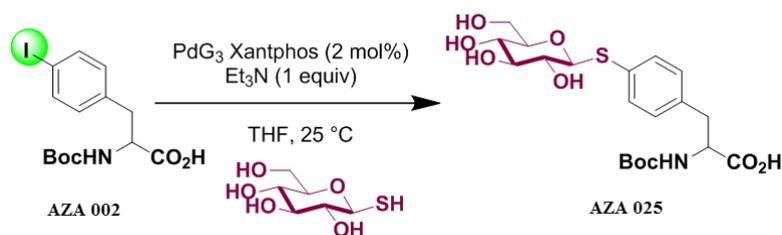


**Figure 17: Étendues et limites du couplage en série cystéine**

### III-4- Conclusion et perspectives :

En conclusion, nous avons développé un système catalytique efficace à température ambiante, qui permet le couplage de différents thiosucres avec des acides aminés halogénés dérivés de la phénylalanine ou de la cystéine. La réaction est stéréorétentive et permet un parfait contrôle de la configuration anomérique. Cette méthode ouvre une voie prometteuse pour la synthèse de peptides et de protéines thioglycosylées.

De plus, des résultats préliminaires ont montré que le thiosucre déprotégé, dérivé de thioglucose, est un bon substrat pour ce couplage (schéma 24).



### Schéma 24 : Couplage de thiosucre déprotégé

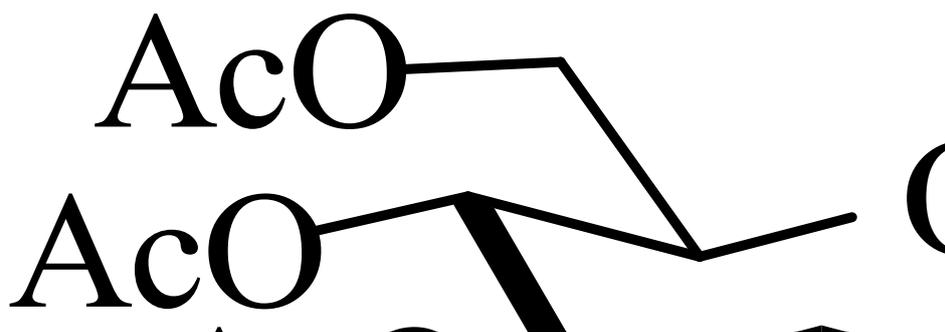
En perspective, nous souhaitons généraliser cette méthode à différents thiosucres déprotégés. De plus, nous envisageons appliquer cette méthode à des peptides de différentes longueurs ayant une phenylalanine iodée. Enfin, le « graal » sera l'application de ce couplage à une protéine (Figure 18).

### Figure 18 : perspectives

### III-5- partie expérimentale :

#### III-5-1- les sucres :

(2,3,4,6- Tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranoside) S3.



(2,3,4,6- Tetra-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl bromide) : S1

Penta-aetyl- β-D-glucopyranose (20.0g, 51.2 mmol, 1 eq) est dissout dans DCM (150 ml). Puis ajouter le bromide d'hydrogene (33% dans l'acide acétique. 120 ml). Le mélange réactionnel est agité à la température ambiante sous Argon. Après 2 heures tester sur CCM (ethyl acetates/petrol : 1 :1) qui indique la formation d'un produit (Rf > 0.5) avec la consommation complète des produits de départ (Rf 0.5). le mélange réactionnel est partagé entre DCM (200 ml) et l'eau (200 ml). Puis la phase aqueuse est ré extraite avec DCM (3 fois 200ml). La phase organique combinée est lavée avec sodium hydrogène carbonates (1 l de sulation aqueuse saturée) jusqu'à l'obtention d'un pH = 8, puis laver avec Brine (500 ml) et sécher avec le MgSO<sub>4</sub>, après filtrer et évaporer sous vide, formation de 2,3,4,6- Tetra-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl bromide sous forme d'un crystal solide à partir de l'ethyl acetate/petrol.

(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl-1-isothiuronium bromide) : S2

Thiourea (5.5g, 72.0 mmol, 1.5 eq) et 2,3,4,6- Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl bromide (19.7g, 48.0 mmol, 1 eq) sont dissouts dans l'acétone (100 ml) sous Argon. le mélange réactionnel est chauffé jusqu'à 60°C. après 2 heures, un précipité blanc est formé. Ce dernier est récupéré via filtration puis le filtrat sera retourné au reflux. Ce procédé est répété jusqu'à que le solide cesse d'être précipité. Tous les précipités sont combinés et recristallisés de l'acétone / pétrole afin d'obtenir le 2,3,4,6- Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-isothiuronium bromide sous forme d'un solide blanc crystal.

**(2,3,4,6- Tetra-O-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranoside) : S3**

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (6.0g, 31.7 mmol, 1.4 eq) et 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-isothiuronium bromide (11.0g, 22.6 mmol, 1 eq) sont ajoutés sous agitation à un mélange de DCM (100 ml) et H<sub>2</sub>O (50 ml). Le mélange réactionnel est chauffé sous Argon. Après 3 heures contrôler via CCM petrole / acétates d'ethyl ; 1 :1 ) qui indique la formation d'un produit (Rf05) avec une complète consommation des produits de départ (Rf0.0). le mélange réactionnel est refroidie à la température ambiante et les phases sont séparées. la phase aqueuse est ré extraite avec DCM (2 fois 100 ml), séché avec le Mg SO<sub>4</sub> puis filtré et concentré sous vide afin d'obtenir le 2,3,4,6- Tetra-O-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranoside sous forme d'un solide Crystal blanc.

**2,3,4,6- tetra-o-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranose :S7**

Le même mode opératoire pour la synthèse du sucre **(2,3,4,6- Tetra-O-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranoside) : S3**

**2-Acetamido- 3,4,6- tri-O-acetyl-2-deoxy-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose : S8**

2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-1-isothiuronium chlorure (4,5 g, 10,6 mmol, 1 éq) et du métabisulfite de sodium (2,5 g, 12,7 mmol, 1,2 éq) ont été ajoutés à un mélange agité du DCM (30 ml) et de H<sub>2</sub>O (20 ml). Le mélange a été chauffé au reflux sous Argon. Après de 2 heures, un contrôle CCM (acétate d'éthyle, 100%) a indiqué la formation d'un produit (Rf > 0,0), avec une consommation complète de la matière de départ (Rf 0,0). Le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante et les phases ont été séparées. La phase aqueuse a été soumise à une réextraction avec DCM (2 x 50 ml). Les couches organiques combinées ont été lavées avec H<sub>2</sub>O (50 ml), de la saumure (50 ml), séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et le solvant a été éliminé sous vide. La résultante solide blanc a été cristallisé à partir d'acétate d'éthyle / éther de pétrole pour donner le 2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose (3,30 g, 89%) sous forme d'un solide blanc.

### **III-5-2- les substrats :**

#### **III-5-2-1-Dérivés de phényl alanines :**

##### **4-iodo-L-phenylalanine**

iodine (24.6g, 96.9mmole) et sodium iodate (9.57g, 48.4 mmole) sont ajoutés à une solution de L-phenylalanine (40g, 242 mmole) dans l'acide acétique (220ml) et l'acide sulfurique concentré (29 ml).le mélange est chauffé à une température de 70°C pendant toute une nuit.Après ; ajouter en deux portions le periodate de Sodium (2 fois 940 mg) pendant 5 minutes. Le mélange doit être agité jusqu'à que la couleur devient orange (environ 1 heure). L'acide acétique est enlevé sous vide. Le mélange brut est dilué avec l'eau et lavé avec l'éther et le dichloro méthane, la phase aqueuse est neutralisé avec le NaOH (2M) jusqu'à la formation d'un précipité blanc. Le solide est collecté par filtration et recristallisé du mélange eau chaude : ethanol. Le Crystal obtenu est collecté et séché sous vide.

##### **N-Boc-4-iodo-L-phenylalanine :**

4-iodo-L-phenylalanine (1.5g, 5.14 mmole) est dissout dans tert-butanol (4ml) et hydroxide de sodium (1M, 6.4ml). puis Di-tert-butyl dicarbonate (1.17g,5.35mmol) est ajouté autant qu'un liquide pendant 3 minutes jusqu'à la formation d'une suspension blanche. Ajouter l'hydroxide de sodium (1M , 2ml) afin de faciliter la solvatation du solide. Le mélange est agité à température ambiante pendant 18 heures, pendant laquelle un couleur

orange claire sera formé. (10 ml) d'eau est ajouté et le mélange est extrait avec (20 ml) de sat. NaHCO<sub>3</sub>. la phase aqueuse combinée doit être acidifié avec le KHSO<sub>4</sub> (1 M, 200ml) jusqu'à pH 1.7. Le solide résultant est dissolvé dans le diethyl ether, et la phase aqueuse est extraite avec 4 fois diethyl ether (3 fois 50 ml). L'extrait combiné est séché avec le Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, puis filtré et évaporé. l'huile obtenu est traité avec l'hexane (50ml), jusqu'à la formation d'au solide blanc. Ce dernier est collecté via filtration puis séché sous vide.

### **III-5-2-2- dérivés de cystéines :**

#### **Aryl iodide : ((S)-methyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-((4-iodobenzyl)thio)propanoate :**

Dissoudre le Boc Cys OMe (1.4g, 4.17 mmole) dans un ballon de 100 ml avec le DMF (20 ml), puis ajouter le K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.73 g, 12.5 mmole) et le 4- Iodo- bensylbromide (742 mg, 2.5 mmole). La réaction est rincée avec nitrogène sous argon et mélangée à la température ambiante pendant 2 heures, puis diluer avec AcOEt (200ml) puis laver avec H<sub>2</sub>O (200 ml) et saumure puis extraction. La phase organique est séchée par MgSO<sub>4</sub> puis filtrée et évaporée sous vide afin d'obtenir le produit final.

Purification de ce produit via colonne chromatographique (pétrole : AcOEt ; 8 :2).

#### **Aryl iodid= COOH : ((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-((4-iodobenzyl)thio)propanoic acid) :**

Environ (51.13g, 2.50 mmole) est dissoute dans THF (10 ml) et agité à température ambiante. Ajouter sous agitation une solution aqueuse de LiOH. H<sub>2</sub>O (1.05g, 25.0 mmol dans 10 ml H<sub>2</sub>O). le mélange réactionnel est agité vigoureusement pendant 1 heure à air ouvert. Effectuer un contrôle CCM (petrole : AcOET ; 6 :4) qui indique la consommation complète des produits de départ. La réaction est neutralisée avec HCl 1M (100 ml) puis extraite avec AcOET 3 fois 75 ml). La phase organique combinée est lavée avec Brine (100 ml) puis séchée via MgSO<sub>4</sub> et filtrée puis concentrée sous vide afin d'obtenir le produit final.

Le produit obtenu est purifiée via colonne chromatographique (20% MeOH dans dichlorométhane et 2% NH<sub>4</sub>OH).

## ملخص

ينقسم عملنا الى قسمين: قسم خاص بكيمياء النباتات وقسم خاص بالاصطناع العضوي. في القسم الاول، قمنا بدراسة فعالية النوع *talucitra sinilcarteta* من العائلة Cupressaceae ضد البكتيريا وقدرة هذا النوع على تسكين الألم. وقد أظهرت النتائج المتحصل عليها ان مستخلص الب ياتانول له فعالية ضد كل من *Staphylococcus aureus* 25923 ATTC (Gram +) و *Escherichia coli* 25922 ATTC (Gram -) كما ان نفس المستخلص له قدرة معتبرة على تسكين الألم. في القسم الخاص بالاصطناع الكيميائي، باستعمال آلية التفاعل للعالمين Buchwald-Hartwig انتجنا 10 مركبات تجمع بين السكريات والبيبتيدات، ستة منها تحصلنا عليها انطلاقا من مشتقات le phényl alanine، والأربعة الباقية من مشتقات la cystéine. القيمة العلمية لهذا الجزء من دراستنا هي تطوير طريقة جديدة تسمح بمزاوجة الوظيفة -SH للسكريات الكبريتية مع البيبتيدات وهذا بطريقة chimiosélective بوجود وظائف حمضية والأمين NHBoc للحمض الأميني، وهذا من دون تغيير ذرة الكربون الموجودة في الموقع ألفا الخاصة بالحمض، وقد حققنا كل هذا في درجة الحرارة الاعتيادية وزمن قصير وهذا ما تتطلبه الكيمياء الخضراء الصديقة للبيئة.

**الكلمات المفتاحية:** Cupressaceae, *talucitra sinilcartet* فعالية ضد البكتيريا ، تسكين الألم، مستخلص البوتانول، آلية التفاعل للعالمين Buchwald-Hartwig، مشتقات le phényl alanine، مشتقات -SH، مشتقات la cystéine، للسكريات الكبريتية.

## Abstract :

Our work is divided into two parts: phytochemical part and organic synthesis part.

In the phytochemical part we studied the Anti-bacterial and analgesic activities of *Tetraclinis articulata* species of Cupressaceae family; the results of the antibacterial screening showed that the butanol extract of the species studied has activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram +) and *Escherichia coli* ATCC 25922 (gram -), the test on the analgesic activity has proved that 'butanol extract of the same species has an important percentage of inhibition of pain.

In the synthesis part, using the Buchwald-Hartwig mechanism 10 products was synthesized saccharides Coupling products with peptides, six products obtained derivatives of phenylalanine, and 4 products obtained from cysteine derivatives.

The scientific value of this last part is the development of a new method to couple chemoselectively the function -SH of thiosugar with peptides, in presence of acid functions acid functions and amino function of NHBoc amino acid without altering (epimerize) the asymmetric carbon in position  $\alpha$  of the acid and this in an ambient temperature and low time (green chemistry).

**Keywords:** *Tetraclinis articulata*, Cupressaceae, the antibacterial activity, analgesic activity, the butanol extract, Buchwald-Hartwig mechanism of phenylalanine derivatives, derivatives of cysteine, thiosugar.

## **Résumé :**

Notre travail est divisé en deux parties : partie phytochimique et partie synthèse organique.

Dans la partie phytochimique on a étudié l'activité Anti-bactérienne et Analgésique de l'espèce *Tetraclinis articulata* de la famille Cupressaceae; les résultats du criblage antibactérien ont montré que l'extrait butanolique de l'espèce étudiée possède une activité contre *Staphylococcus aureus* 25923 ATTC (Gram +) et *Escherichia coli* 25922 ATTC (Gram -), le test sur l'activité analgésique a prouvé que l'extrait butanolique de la même espèce a un important pourcentage d'inhibition des douleurs.

Dans la partie synthèse, en utilisant le mécanisme de Buchwald-Hartwig, on a synthétisé 10 produits de Couplage des saccharides avec des peptides, 6 produits obtenus des dérivés du phényl alanine, et 4 produits obtenus des dérivés de cystéine.

La valeur scientifique de cette dernière partie est le développement d'une nouvelle méthode permettant de coupler chimiosélectivement la fonction -SH du thiosucre avec des peptides en présences des fonctions acide et l'amine NHboc de l'acide aminé, sans altérer (épimériser) le carbone asymétrique en position  $\alpha$  de l'acide et ceci dans une température ambiante et un temps réduit (chimie verte).

**Les mots clés:** *Tetraclinis articulata*, Cupressaceae, l'activité Antibactérienne, l'Activité Analgésique, l'extrait butanolique, mécanisme de Buchwald-Hartwig, dérivés du phényl alanine, dérivés de cystéine, thiosucre.