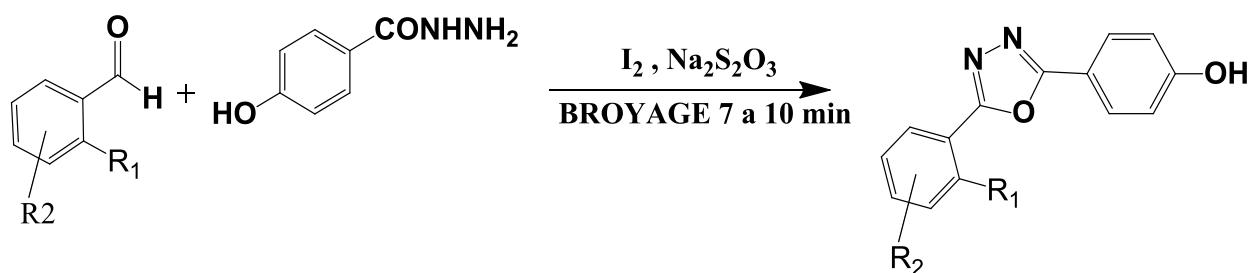


### III.1. Introduction :

Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire des matériaux inorganiques, département de chimie, faculté des sciences université de M'sila. Nous avons procédé à la synthèse de nouveaux dérivés de 1,3,4-oxadiazole par voie verte, en utilisant l'acide 4-hydroxybenzoïque comme produits de départ. La synthèse consiste, en premier lieu, de réagir le 4-hydroxybenzoïque avec le méthanol pour donner naissance au 4-hydroxybenzoat, puis l'addition d'hydrazine hydrate sur le 4-hydroxybenzoate, qui va donner par suite le 4-hydroxybenzohydrazone avec des aldéhydes substitués en présence d'agents oxydants qui est, dans ce cas, l'iode selon le chemin réactionnel global ci-dessous.



**Schéma. III. 1.** Étapes pour la synthèse des dérivés 1,3,4-oxadiazole.

Les produits synthétisés ont été caractérisés par le point de fusion, UV, IR et afin de pouvoir distinguer entre les réactifs de départ et les produits préparés, l'avancement des réactions a été suivi par CCM.

Enfin, Les dérivés oxadiazoliques élaborés au cours de ce travail seront testés pour ses propriétés antibactériennes et antioxydantes.

### III.2. Réactifs et solvants utilisés :

Les propriétés physiques des réactifs et solvant utilisés au cours de cette partie ont été fournis et utilisés sous forme commerciale et sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau. III. 1.spécifications des réactifs et solvant utilisés.

Réactifs et solvants	Structure	M (g/mole)	T <sub>f</sub> (°C)	T <sub>éb</sub> (°C)	Densité
Acétate d'éthyle (99%)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	88,11	-	75-77	0,89
Acétone	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	58,08	-		0,79
Dichlorométhane (99,5%)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84,93	-	-	1,33
Diméthyle Sulfoxyde DMSO (99%)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	78,13	18,4	189	1,84
Eau distillée	H <sub>2</sub> O	18	0	100	100
Ethanol (97%)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	46,07	-117,4	78,5	0,81
Méthanol (99%)	CH <sub>3</sub> OH	32,04	-98	64,5	0,79
N, N-diméthylformamide (DMF)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NCO H	73,1			0,95

### III.3. Méthodes d'analyses

#### III.3.1. Spectre infrarouge

##### III.3.1.1. Principe :

La spectroscopie l'infrarouge est une technique de caractérisation des composés organique fonctionnels, permet d'identifier les principales fonctions chimiques existant dans une molécule organique quelconque. Cette méthode est basée sur le phénomène d'absorption des radiations dans le domaine infra-rouge du spectre électromagnétique est lié à la variation de l'énergie de vibration moléculaire. Cette vibration implique une variation du moment dipolaire. Les radiations infrarouges constituent la partie du spectre électromagnétique.

Le domaine qui représente le plus grand intérêt pour les chimistes est compris entre 4000 et 400 cm<sup>-1</sup>. Les radiations infrarouges dont les longueurs d'onde dépassent 100 mm sont absorbées par les molécules en modifiant leur énergie de rotation. Cette absorption est quantifiée. En revanche, les

longueurs d'ondes comprises entre 1 et 100  $\mu\text{m}$  correspondent à des transitions dans les énergies de vibrations moléculaires.

### **III.3.1.2. Appareillage :**

Le spectre infra-rouge de tous les composés synthétisés a été enregistré au moyen de l'appareil Shimadzu FT/IR spectrophotomètre d'infrarouge à transformation de Fourier. La gamme d'intérêt est entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Les pastilles bromure de potassium sont employées pour la préparation des échantillons à analyser. L'appareil est calibré par une pastille qui contient uniquement le bromure de potassium KBr pour l'infra-rouge.

### **III.3.2. Spectres électroniques d'absorption UV-visible :**

#### **III.3.2.1. Principe :**

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode qui se base sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde qui appartiennent au domaine UV-visible s'étendant entre de 800 à 10 nm.

- visible: 800 nm (rouge) - 400 nm (indigo)
- Proche-UV : 400 nm - 200 nm
- UV-lointain : 200 nm - 10 nm.

L'absorption de ces radiations provoque des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules.

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration  $C$  contenue dans une cuve d'épaisseur  $l$ .

Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise. Bouguer, Lambert et Beer ont étudié les relations qui existent entre  $I_0$  et  $I$  : l'intensité d'une lumière monochromatique traversant un milieu où elle est absorbée décroît de façon exponentielle  $I = I_0 e^{-klC}$

$I_0$  : est l'intensité de la lumière incidente

$I$  : est l'intensité après passage à travers la cuve contenant la solution (intensité transmise)

$l$  : est la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) (en cm)

C : est la concentration des espèces absorbantes

k : est une constante caractéristique de l'échantillon. Cette équation peut se réécrire

$$\log(I_0/I) = k l C / 2.3 = \epsilon l C.$$

$\log(I_0/I)$  est appelé absorbance (A)

$I/I_0 = T$  est la transmission

% T est la transmittance

Est le coefficient d'extinction molaire ;  $\epsilon$  est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. Si C est la molarité,  $\epsilon$  est en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ .

On obtient alors la relation connue sous le nom de loi de Beer-Lambert :  **$A = -\log T = \epsilon l C$**

### **III.3.2.2. Appareillage :**

Les spectres d'absorption électronique UV-vis des inhibiteurs synthétisés dissous dans des solvants appropriés ont été enregistrés dans une cellule de quartz de 1 cm en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis Shimadzu 1650 PC dans la gamme de 200 à 400 nm ( $\lambda_{max}$ ).

### **III.4. Tests biologiques :**

Tous les tests biologiques sont effectués au niveau du laboratoire microbiologie département de biologie et biochimie (Université Mohammed Boudiaf M'sila).

L'évaluation de l'activité biologique des produits préparés est l'un des méthodes pratiques utilisées pour mesurer la tendance des produits d'être un bioactives. Les oxadiazoles, fait l'objet de ce travail qui est la recherche de nouveaux composés biologiquement actifs suscite un intérêt de plus en plus Croissant, notamment dans le domaine pharmaceutique. C'est pourquoi nous avons souhaité d'évaluer l'activité antibactérienne de nos produits préparés vis-à-vis de diverses souches bactériennes choisis.

De nombreuses méthodes sont disponibles pour tester l'activité biologique des produits nouvellement synthétisé ou des composés naturels (Fisch et al, 2003). Antioxydants ou Essais de piégeage des radicaux libres, antimicrobiens (par exemple, antifongique, antibactérien, etc), et tests de cytotoxicité sont parmi les nombreux tests disponibles pour les essais biologiques. Dans tous (ou

plus) de ces tests, un test de contrôle, qui omet l'échantillon d'essai ou emploie un composé avec une activité biologique connue, est utilisé comme comparaison.

### III.4.1. L'activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des produits obtenus (C1, C2, C3, C4, et C5) est effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie.

Le but de cette étude est de voir l'évolution antimicrobienne de nos produits sur les différentes souches bactériennes. Nous avons tenu à vérifier leur pureté par les caractéristiques cellulaires, par des tests biochimiques et culturaux.

#### III.4.2.1. Technique d'étude par puits sur gélose :

La sensibilité des souches aux dérivées de 1, 3,4-oxadiazoles a été réalisée par la technique de diffusion en milieu gélose. Les milieux de Mueller Hinton ont étéensemencés par inondation après une dilution adéquate du microorganisme a testé réalisée suivant une échelle de Mc Farland où l'inoculum.

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, des puits d'environ 6 mm de diamètre ont été effectués dans la gélose. Chaque puits a reçu 50  $\mu$ L de 1, 3,4-oxadiazoles à tester aux différentes concentrations. Après 30 min de diffusion à température ambiante, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 h. La présence ou non d'une zone d'inhibition a été observée (TOTY et al, 2013). Les essais sont répétés 2 fois et les résultats enregistrés comme diamètre moyen de ces deux expériences.

(Figure 20).

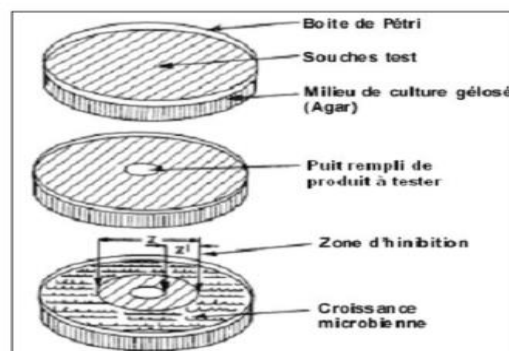


Figure.III.1. Méthode de diffusion sur boîte Pétri.

Chaque antibiotique diffuse à partir du puits au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des puits une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition.

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique.

Plus, il est petit, plus la bactérie est résistante.

#### **III.4.2.2. Micro-organismes utilisés :**

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

4 souches de référence ATCC, provenant du l'institut de pasteur d'Alger, sont testées :

**Tableau.III. 2.Souches bactériennes choisix.**

	<b>Bactéries</b>	<b>Code</b>	<b>Pathogénicité</b>
Gram positif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Infection Nosocominale
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Gastro-entérite et infection urinaire
Gram positif	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 25921	Infection alimentaire
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Intoxication alimentaire

#### **III.4.2.3. Mode d'opérateur**

- **Préparation de l'inoculum:**

Chaque souche est ensemencée au préalable sur une gélose nutritive, pour obtenir une culture de 18 à 24h. Ensuite, 4 à 5 colonies bactériennes bien isolées sont mis en suspension dans bouillon nutritif (ou en eau physiologique à 0,9 % NaCl). Puis cette suspension est ajustée au standard Mc Farland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une densité optique DO entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ 108 UFC/ml (CA-SFM, 2010).

### III.4.3. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet des dérivées de 1, 3,4-oxadiazoles. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés de dérivées de 1, 3,4-oxadiazoles.

Nous avons utilisé un antibiotique : Amoxicilline clavulanicacid 20/10 µg (AMC 30).

### III.4.4. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide :

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage à partir d'un inoculum dilué au 0,1 (environ 10<sup>7</sup> UFC/ml) (CA-SFM, 2010). À l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube, réaliser des stries parallèles et aussi serrées que possible à la surface d'une boîte de Pétri préalablement coulée avec la gélose de Mueller-Hinton. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte 60° et en tournant l'écouvillon sur lui-même.

Des disques de papier filtre, de 6 mm de diamètre, sont préparés et stérilisés. Ils sont ensuite imprégnés de 50 µL de dérivé testé dilué dans du DMSO pur, et déposés à la surface de la boîte de Pétri ensemencée. La quantité finale de dérivé sur le disque est 1 mg/disque.

Pour chaque type de dérivé, l'opération est répétée trois fois.. Les boîtes ont été enfin incubées pendant 24 h à 37 °C. La lecture a été effectuée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (exprimé en mm). à l'aide d'une règle graduée (y compris le diamètre des disques) en prenant la moyenne de trois mesures différentes.

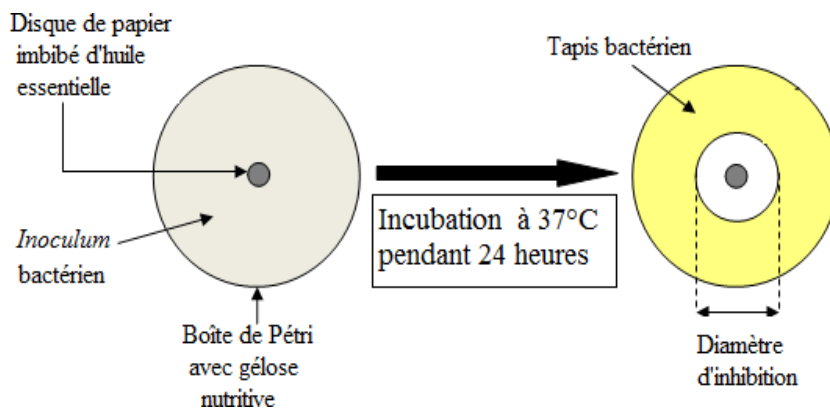


Figure.III. 1.Principe de la méthode de diffusion par disque.

L'activité antibactérienne est considérée comme positive à partir d'un diamètre supérieur à 6 mm

- Très forte activité : diamètre  $\geq 30$  mm
- Forte activité : diamètre entre 21-29 mm
- Moyenne activité : diamètre entre 16-20 mm
- Faible activité : diamètre entre 11-15 mm
- Petite ou pas d'activité : diamètre  $\leq 10$  mm.

#### **III.4.5. Test de sensibilité aux dérivées de 1, 3, 4-oxadiazoles**

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

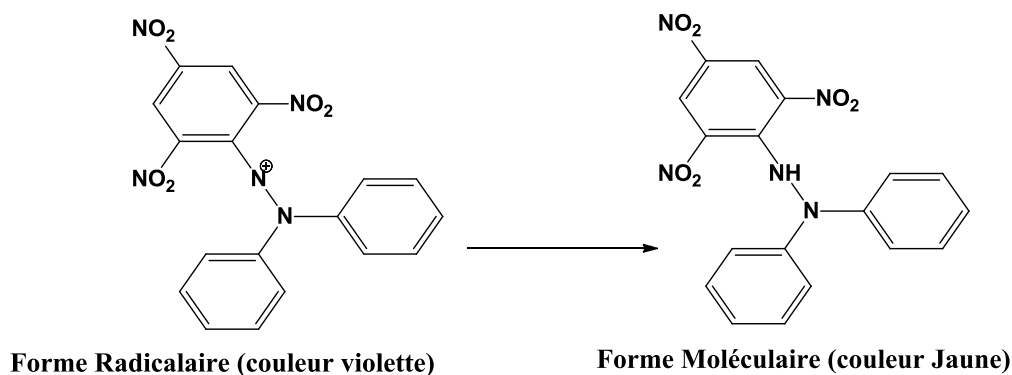
L'ensemencement a été réalisé en écouvillonnant trois fois toute la surface de la gélose en faisant tourner la boîte de 60° à chaque fois pour assurer une répartition uniforme de l'inoculum (ensemencement en nappe).

Des disques de papier Wattman stériles (6 mm de diamètre) ont été imprégnés avec 25 $\mu$ L de la dérivée de 1, 3,4-oxadiazoles (0.02g/ml) et on laisse sécher puis on place sur des boîtes de pétrie. Les boîtes ont été laissées au repos à 4°C pendant 2 h avant d'incubation avec les agents microbiens à tester (Matar et al., 2013).

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

#### **III.5. L'activité antioxydante :**

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



**Schéma. III. 2.** mécanisme de transfert d'électrons dans le radical libre DPPH.

L'activité des dérivés 1,3,4 oxadiazoles synthétisés vis-à-vis le radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (Zhang et al., 2011). Dans des tubes à essai on introduit 0.1 ml de chaque dérivés oxadiazoles (solubilisé dans le DMF) à différentes concentrations et 3.9 ml de la solution méthanolique de DPPH (0.004 % P/V), après l'agitation par un vortex, les tubes sont incubés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

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

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

Où : % : pourcentage de l'activité anti-radicalaire ;

Abs Échantillon : absorbance de l'échantillon ;

Abs Contrôle négatif : absorbance du contrôle négatif ;

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

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire « pédagogique » département microbiologie et biochimie, Faculté des sciences, Université Mohammed Boudiaf-Msila.