

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE d'ORAN
Mohamed BOUDIAF**



Faculté de Chimie

Département de Chimie Organique Industrielle

Spécialité : Chimie

Option : Chimie Organique Bioactive

MEMOIRE

Présenté par

M^{elle} MAHI Fatima Imane

Pour l'obtention du diplôme de Magister en Chimie Organique Bioactive

Thème

**ANALOGUE DU SECO-ACYCLOAZOLYL GLYCOSIDE DERIVES
DE L'ACIDE LACTIQUE : SYNTHÈSE, CARACTÉRISATION ET
ACTIVITÉ ANTI-BACTÉRIENNE**

Soutenu le 11/06/2015 devant la commission d'examen composé de :

Qualité	Nom et Prénoms	Grade	Etb. d'Origine
Président	HADJEL Mohamed	Professeur	USTO - MB
Examineur	KIHAL Mebrouk	Professeur	Univ. Es-Sénia
Examineur	M'HAMED Ahmed	M. C. A.	Univ. Mostaganem
Examineur	MEHDID Mohamed Amine	M. C. A.	USTO - MB
Rapporteur	ALI OTHMANE Adel	Professeur	USTO - MB

Année Universitaire 2014 / 2015

المخلص

يركز العمل في هذه الرسالة على صنع مركبات كيميائية جديدة لنظائر الغليكوزيدات ، بدءا من صنع مختلف المركبات خماسية الحلقة غير المتجانسة للديازولات من مشتقات حمض الحليب. تربط هذه الأخيرة بسكر غير طبيعي ، متحصل عليه بتفاعل حماية مجموعتان وظيفيتان كحولية من أصل ثلاثة لجزئية الغليسرين. أكدت التراكيب الكيميائية بالاستعانة بالأشعة تحت الحمراء و الرنين النووي المغناطيسي. يشمل هذا العمل في اختبار فعالية هذه المركبات الجديدة ضد مجموعة من بكتيريا مرضية و/أو مفسدة و الذي من خلاله كان النشاط المثبط ملحوظا.

المصطلحات الرئيسية : الغليكوزيدات ، ديازولات ، حمض الحليب ، المركبات خماسية الحلقة ، نشاط مثبط.

Résumé

Notre travail consiste à la synthèse de nouvelles molécules, analogues de glycosides seco-acycliques, partant de la synthèse de différents composés hétérocycliques à cinq chaînons, dérivés de l'acide lactique, tel que le 5-(1-hydroxyéthyle)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione, le 3-(1-hydroxyéthyl)-4-amino-1,2,4-triazole-5-thiol et le 1-(5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-yl) éthanol. Et de les greffer sur un sucre synthétisé, obtenu par la protection sélective des groupements alcool du glycérol. Leur structure a été caractérisée par spectroscopie infrarouge et résonance magnétique nucléaire. Le test antibactérien des produits de synthèse contre des bactéries pathogènes et/ou d'altération à Gram positif montre une activité inhibitrice remarquable.

Mots Clés : glycoside, acide lactique, 1,3,4-oxadiazole, 4-amino-1,2,4-triazole, 5-amino-1,3,4-thiadiazole, bactéries à Gram positif, bactéries à Gram négatif.

Abstract

This work consists of the synthesis of new molecules, analogues of seco-acyclo glycosides. Starting with the synthesis of different five-membered heterocyclic compounds, derivatives of lactic acid, such as 5-(1-hydroxyéthyle)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione, 3-(1-hydroxyéthyl)-4-amino-1,2,4-triazole-5-thiol and -(5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-yl) éthanol. To achieve the aim of this work, it has been necessary to link the latest five-membered heterocyclic compounds to a synthetic carbohydrate. Glycerol was taken as a seco-acyclo sugar moiety. The structures of all compounds have been characterized by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The antimicrobial test of our products has shown an interesting activity against Gram-positive bacteria.

Key Words : glycoside, lactic acid, 1,3,4-oxadiazole, 4-amino-1,2,4-triazole, 5-amino-1,3,4-thiadiazole, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria.

Remerciements

Cette thèse est le fruit d'un travail de recherche de plus de trois ans. En préambule, je veux adresser tous mes remerciements aux personnes avec lesquelles j'ai pu échanger et qui m'ont aidé à rédiger cette thèse.

Je commence par adresser ma profonde gratitude et mes très sincères remerciements à mon directeur de recherche, Professeur ALI OTHMANE Adel, pour sa supervision, son orientation et sa disponibilité au laboratoire.

Je remercie également Pr. KHARROUBI, Dr. BELMAHDI, chef de service du Laboratoire Central de l'Hôpital Universitaire Militaire Régional d'Oran, et toute son équipe pour leur accueil si chaleureux au sein du laboratoire de bactériologie afin de compléter ce travail. Je ne pourrais jamais oublier à remercier Dr. LOUIL pour son encadrement durant le stage et son orientation vers de bonnes références.

Je souhaite témoigner mes remerciements au Pr. HADJEL Mohammed, Pr. KIHAL Mebrouk, Dr. M'HAMEDI Ahmed et Dr. MEHDID Mohamed El Amine pour le temps accordé afin de lire et juger ce travail en tant que membres du jury.

J'adresse également toute ma reconnaissance à mes enseignants qui ont contribué à ma formation au cours de ce Magister.

Un grand merci au Dr. M'HAMEDI Ahmed, Maître de conférence A à l'université de Mostaganem, qui m'a accordé un peu de son temps pour m'expliquer et discuter certains résultats.

Je tiens à remercier grandement mes collègues et toute l'équipe du Laboratoire de Synthèse Organique Physico-Chimie, Biomoléculaire et Environnement. Département de Chimie Organique Industrielle. Faculté de Chimie. Université des Sciences et de la Technologie d'Oran-Mohamed BOUDIAF: TAIEB BRAHIMI Fawzia, BELKHADEM Fatima, BELMILOUDI Fatima, TIGHANIT Ismahan, AMAROUCH Lamia, RAHMOUNI Mustapha, BENALI Fadila, HABECHE Amel et BELBOULA Amal pour la qualité de leur travail, leur bonne écoute, leurs conseils et astuces, et leurs aides morales et matériels. Sans oublier un spécial merci à l'ingénieur de notre laboratoire ABED Karima pour sa disponibilité, sa générosité et son humeur.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille : Ma très chère maman, ma sœur, mon beau frère, ma tante et tous mes amis qui m'ont aidé, accompagné, soutenu et encouragé et toutes personnes qui ont participé de loin ou de près à atteindre mon objectif.

Merci.

Dedication

*To my beloved Mother,
I dedicate this Thesis.*

ترحم

عرفانا للمرحوم الأستاذ المحترم علي حسون الطيار، الذي نشهد له بكل خير، و انه أفنى حياته في خدمة العلم، و لم يتوانى عن العطاء لطالبيه و لا نزكي في ذلك على الله أحدا، أسأل الله العلي القدير أن يرحم أستاذنا المحترم و يسكنه جنة الفردوس انه ولي ذلك و القادر عليه. فاللهم أغفر له و أرحمه، آمين.

"إِنَّا لِلَّهِ وَإِنَّا إِلَيْهِ رَاجِعُونَ"

Table de Matières

Table des matières

Introduction Générale.....	2
----------------------------	---

Partie A. (Théorie)

Chapitre A. I.

Etude de l'Acide Lactique

A.I.1. Définition	6
A.I.2. Historique.....	6
A.I.3. Synthèse de l'acide lactique	7
A.I.3.1. Production industrielle	7
A.I.3.2. Production par les cellules musculaires.....	8
A.I.3.3. Production par fermentation bactérienne.....	9
A.I.3.4. Production par les levures	11
A.I.4. Chimie de l'acide lactique.....	11
A.I.4.1. Chiralité de l'acide lactique.....	11
A.I.4.2. Solubilité de l'acide lactique	12
A.I.5. Utilisation de l'acide lactique	12
A.I.6. Dérivées de l'acide lactique et leurs utilisations.....	13
A.I.7. Conclusion	21

Chapitre A. II.

Les Nucléosides et les Glycosides

A.II.1. Introduction.....	23
A.II.2. Les Nucléosides	23
A.II.2.1. Les Nucléotides et les Nucléosides	23

A.II.2.1.1. Les Nucléosides	24
A.II.2.1.2. Les Nucléotides	24
A.II.2.2. Classification des Nucléosides	24
A.II.2.2.1. Les nucléosides naturels	24
A.II.2.2.2. Les analogues des nucléosides	25
A.II.3. Les Glycosides	29
A.II.3.1 Définition	29
A.II.3.2. Classification des Glycosides.....	29
A.II.3.2.1. Classification selon le glycone	29
A.II.3.2.2. Classification selon la liaison glycosidique.....	30
A. II.3.2.3. Classification selon l'aglycone.....	30
A.II.4. Conclusion	37

Partie B. (Résultats et Discussion)

Chapitre B. I.

Synthèse Organique

B.I.1. Introduction	40
B.1.2.Synthèse de 2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol / 2-phenyl-1,3-dioxolan-4YI – methanol(B.3)..	42
B.1.3. Synthèse de 2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl 4-methylbenzenesulfonate (B.4)	42
B.I.4. Synthèse du 2-Hydroxypropanoate d'éthyle (lactate d'éthyle) (B.5)	43
B.I.5. Synthèse du 2-hydroxypropanehydrazide (hydrazide lactique) (B.6).....	44
B.I.6. Synthèse du 5-(1-hydroxyéthyle)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione (B.7).....	44
B.I.7.Synthèse de 4-amino-5-(1-hydroxyethyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione(B.8)	45
B.I.8. Synthèse du thiosemicarbazide lactate (B.9).....	46
B.I.9. Synthèse de 1-(5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-yl) éthanol (B.10)	47
B.I.10. Synthèse de 1-{5-[(phenyl-1,3-dioxan-5-yl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazol-2-yl} ethanol (B.11).....	47
B.I.11. Synthèse de 4-[(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl)amino]-5-{1-[(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl)oxy]ethyl}-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (B.12)	48

B.I.12. Conclusion.....	49
-------------------------	----

Chapitre B. II.

Activité Antibactérienne

B.II.1. Introduction.....	51
B.II.2.Evaluation de l'effet antibactérien	51
B.II.3. Mise en évidence des effets antibactériens	52
B.II.3.1. Effet des produits testés sur les bactéries à Gram positif.....	52
B.II.3.2. Effet des produits testés sur les germes à Gram négatif.....	53
B.II.4. Détermination de la CMI	55

Partie C. (Expérimentale)

Généralité

C.a. Techniques et appareillages utilisés.....	59
C.b. liste des produits chimiques et solvants utilisés	61
C.c. Caractéristiques de l'acide lactique.....	63

Chapitre C. I.

Synthèse Organique

C.I.1. Synthèse du 2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol (B.3).....	66
C.I.2 Synthèse de 2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl 4-methylbenzenesulfonate (B.4).....	66
C.I.3. Synthèse du 2-Hydroxypropanoate d'éthyle (lactate d'éthyle) (B.5)	67
C.I.4. Synthèse du 2-hydroxypropanehydrazide (hydrazide lactique) (B.6).....	68
C.I.5. Synthèse du 5-(1-hydroxyéthyle)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione (B.7).....	68
C.I.6. Synthèse de 4-amino-5-(1-hydroxyéthyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (B.8)	69

C.I.7. Synthèse du thiosemicarbazide lactate (B.9).....	70
C.I.8. Synthèse de 1-(5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-yl) éthanol (B.10)	71
C.I.9. Synthèse du 1-{5-[(phenyl-1,3-dioxan-5-yl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazol-2-yl} ethanol (B.11).....	71
C.I.10. Synthèse de 4-[(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl)amino]-5-{1-[(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl)oxy]ethyl}-2,4-dihydro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazole-3-thione (B.12)	72

Chapitre C. II.

Activité Antibactérienne

C.II.1. Introduction.....	74
C.II.2. Les micro-organismes et les antibiotiques de référence utilisés	74
C.II.3. Mise en évidence de l'effet antibactérien	75
C.II.3.1. Principe.....	75
C.II.3.2. Mode opératoire	76
C.II.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	78
C.II.4.1. Détermination de la CMI en milieu liquide	78
C.II.4.2. détermination de la CMI en milieu solide	79
C.II.5. Conclusion	80
 Conclusion Générale	 82
Références Bibliographiques.....	85

Abréviations et Symboles

%	Pourcent
α	Alpha
Δ	Chauffage
β	Béta
°C	Degré Celsius
°D	Degré Dornique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Diphosphate
AHA	Acide α -hydroxylé
AMP	Ampicilline
ARN	Acide Ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine Triphosphate
ATPS	Acide Para Toluène Sulfonique
Ca	Calcium
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
cm	Centimètre
cm ⁻¹	Centimètre Réciproque
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CO	Oxyde de Carbone
CO ₂	Dioxyde de Carbone
CS ₂	Disulfure de Carbone
d	Densité
DEA	Diéthylamine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EM	Enzyme Malique
g	Gramme
GEN	Gentamicine

h	Heure
H ₂	Hydrogène
H ₂ O	Eau
H ₂ SO ₄	acide sulfurique,
HCl	Acide Chloridrique
HCN	acide cyanhydrique
HgO	oxyde mercurique
IR	Infrarouge
KBr	Bromure de Potassium
KMnO ₄	Permanganate de Potassium
KOH	Hydroxyde de Potassium
LDH	Lactate Déshydrogénase
M.H.	Muller Hinton
MDH	Malicodéhydrogénase
mg	Milligramme
MgSO ₄	sulfate de magnésium
min	minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
MM	Masse Molaire
Mn	Magnésium
N	Azote
Na	Sodium
NaBH ₄	tétrahydruroborate de sodium
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH ₂	NADH déhydrogénase
NaOH	Hydroxyde de Sodium
NH ₄ OH	Ammoniaque
O ₂	Oxygène
P	Pression
pH	Potentiel Hydrogène
Pi	Phosphate
ppm	Partie par Million

Pt	Platine
Réf.	Référence
R _f	Rapport Frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Ru	Ruthénium
S.M.	Solution Mère
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
<i>sp.</i>	Species (Espèce)
T ₁	Témoin 1
T ₂	Témoin 2
T _{éb}	Température d'ébullition
T _f	Température de Fusion
Ti	Titane
T _{max}	Température Maximale
Tosyl	Tosyl Chloride (Para Toluène Sulphonyl Chloride)
VHS	Virus d'Herpes Simplex
Zn	Zinc
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire Proton
RMN ¹³ C	Résonance Magnétique Nucléaire Carbone 13

Introduction Générale

Les composés bioactifs sont de plus en plus recherchés dans l'industrie en raison de leurs potentialités d'application dans différents domaines. La production et l'utilisation de ces composés a suscité une attention très particulière des chercheurs utilisant des méthodes et des technologies de pointes. Des études ont été menées pour les produire à partir des ressources renouvelables et écologiques.

L'objectif de ce travail est basé sur la synthèse d'analogues des glycosides et nucléosides, ayant des propriétés thérapeutiques très variables, des antitumoraux ou des antiviraux, comme le gancyclovir, acyclovir, pencyclovir, etc. Ces derniers sont classés parmi les nucléosides seco-acycliques, et donc comme objectif final c'est d'obtenir des composés seco-acycloazolyl glycoside avec une structure semblable à ceux connus.

Ces composés présentent un intérêt considérable en raison de leurs structures. Elles sont diversifiées et ouvrent de nouveaux domaines d'applications en plus de leurs nombreuses applications en biologie.

La disposition de cet ouvrage est faite de la manière suivante :

- La première partie du manuscrit consiste en une étude bibliographique qui s'articule autour de deux chapitres principaux, le premier comporte une étude globale sur l'acide lactique, sa production, son utilisation et ses dérivés synthétiques. Le deuxième chapitre concerne les généralités sur les nucléosides et les glycosides. Nous y abordons leurs classifications ainsi que leurs différents dérivés et analogues.
- La deuxième partie, regroupe toutes les interprétations et les discussions des résultats obtenus des synthèses des composés cités ultérieurement et leurs intermédiaires et l'étude de leur activité antibactérienne sur des souches pathogènes et/ou d'altérations.
- La troisième et la dernière partie, est la partie expérimentale qui comporte deux chapitres ; le premier chapitre est consacré à la synthèse organique des différents composés en partant de l'acide lactique. Et pour y atteindre, ce travail doit se dérouler en trois phases :
 - La première phase consiste à la protection de deux groupements -OH du glycérol à fin d'obtenir un sucre protégé.

- La deuxième phase consiste à la synthèse des hétérocycles à cinq chaînons à partir de l'acide lactique à savoir oxadiazoles, aminotriazole et aminothiadiazoles selon le schéma réactionnel global.
- Et la troisième phase représente le greffage des hétérocycles avec le sucre protégé.

Le deuxième chapitre de la partie expérimentale traitera le test antibactérien de tous les produits synthétisés sur une série de souches bactériennes. Pour les souches bactériennes à Gram positif nous allons utiliser *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.* et *Enterococcus faecalis* et à Gram négatif *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei* et *Salmonella sp.*

Enfin nous terminerons ce mémoire par une conclusion générale. Nous présenterons l'ensemble des résultats obtenus et quelques perspectives pour la suite de ce travail. Sans oublier l'annexe qui comporte tous les spectres IR et RMN ainsi que les références bibliographiques qui regroupent tous les articles et thèses sur lesquels nous nous sommes appuyés pour mener à bien ce travail.

Partie A. (Théorie)

Chapitre A. I.

Etude de l'Acide Lactique

Chapitre A. I.

Etude de l'Acide Lactique

A.I.1. Définition

L'acide lactique (**A.1**) est un acide organique rencontré tantôt libre, dans le lait et le vin, tantôt combiné dans l'organisme, dans certains fruits et légumes et dans les muscles [1][2].

L'acide hydroxy-2-propanoïque (acide lactique) est un acide alpha hydroxylé, de formule brute $C_3H_6O_3$ [1].

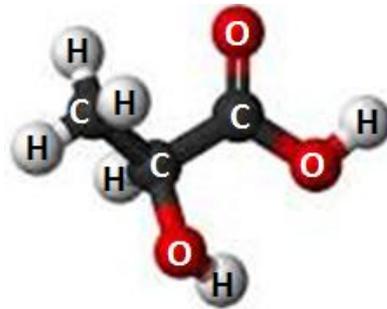


Figure A.I.1 - Structure modèle de l'acide lactique.

A.I.2. Historique

L'acide lactique a été isolé du lait aigre en 1780 par le chimiste suédois Karl Wilhelm Scheele [1][3]. En 1808, Jöns Jacob Berzelius constate que l'acide lactique est également produit dans des muscles pendant l'effort. En 1856, Louis Pasteur découvre le lactobacille et son rôle dans la fabrication de l'acide lactique. L'acide lactique a commencé à être produit commercialement par l'entreprise pharmaceutique allemande Boehringer Ingelheim dès 1895. La structure de l'acide lactique a été établie par Johannes Wislicenus en 1873 [3].

A.I.3. Synthèse de l'acide lactique

A.I.3.1. Production industrielle

Plusieurs procédés purement chimiques ont été proposés, dont la majorité date du XIXe siècle :

- Un procédé de synthèse pour la production d'acide lactique a été lancé en 1963. Ce processus commence par l'addition d'acide cyanhydrique (HCN) à l'acétaldéhyde (éthanal, CH_3CHO), résultant en la formation de lactonitrile ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCN}$). Le lactonitrile est ensuite hydrolysé à l'aide d'un acide fort, tel que l'acide sulfurique, en tant que catalyseur, pour fabriquer de l'acide lactique [4].

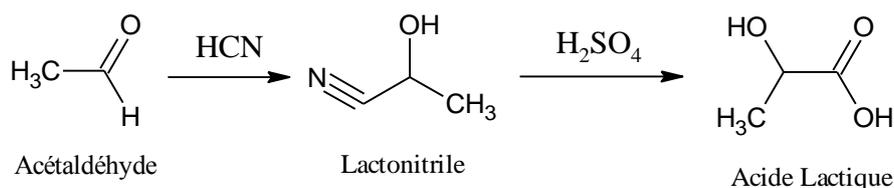


Schéma A.I.1 – Production industrielle de l'acide lactique à partir de l'acétaldéhyde.

- On peut également obtenir de l'acide lactique par oxydation du propylène glycol en présence de noir de platine [4].

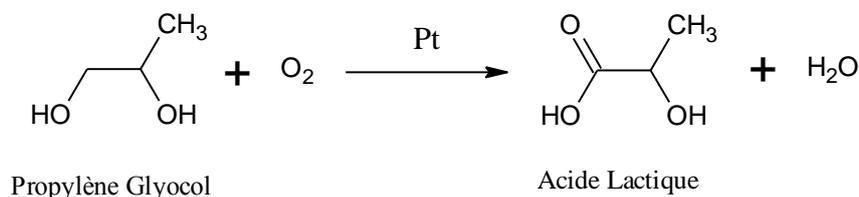


Schéma A.I.2 - Production industrielle de l'acide lactique à partir du propylène glycol.

- L'oxydation de l'acétol par différents agents oxydants, tels que les sels cuivriques et l'oxyde mercurique en présence d'alcali [4], donne de l'acide lactique avec formation d'aldéhyde pyruvique comme produit intermédiaire d'où ce dernier est réduit en présence du tétrahydroborate de sodium (NaBH_4) [5].

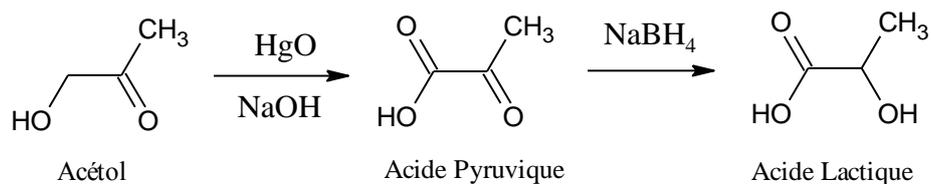


Schéma A.I.3 - Production industrielle de l'acide lactique à partir de l'acétol.

Cependant, la rareté de l'acétol ne permet pas l'utilisation industrielle de ce procédé.

- Le traitement de l'acétaldéhyde par un mélange d'oxyde de carbone et d'eau, en présence d'acide sulfurique et en opérant à température et à pression élevée [4].

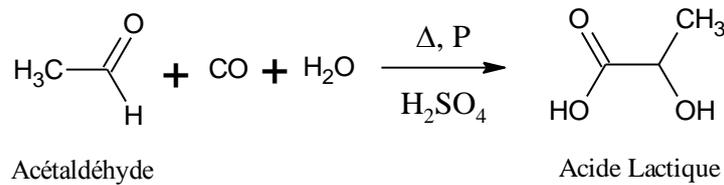


Schéma A.I.4 - Production industrielle de l'acide lactique à partir de l'acétaldéhyde.

A.I.3.2. Production par les cellules musculaires

Dans les cellules musculaires, l'acide lactique est le produit d'une respiration anaérobie, le processus par lequel le glucose qui se retrouve dans le sang ou bien obtenu par la dégradation du glycogène musculaire, puis oxydé en absence d'oxygène pour produire de l'énergie requise par les cellules.

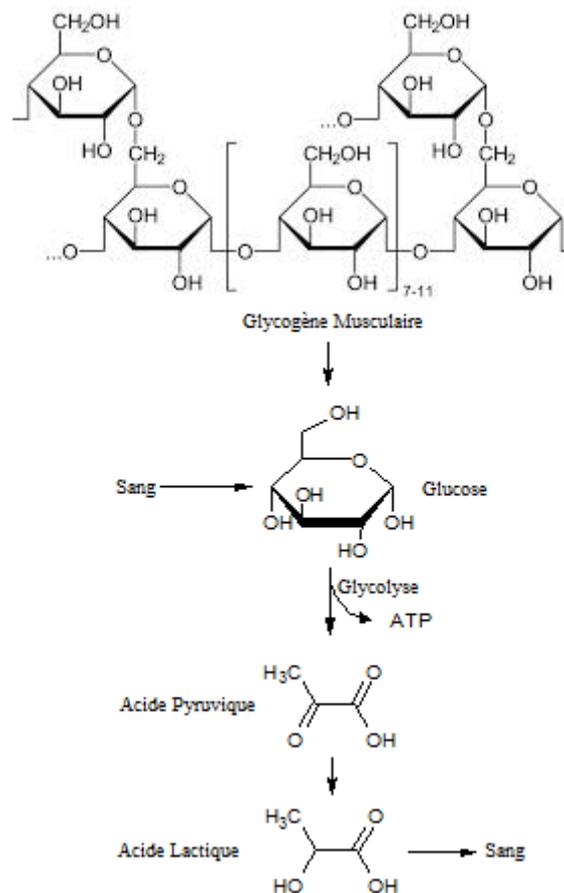


Schéma A.I.5 – Production de l'acide lactique par les cellules musculaires.

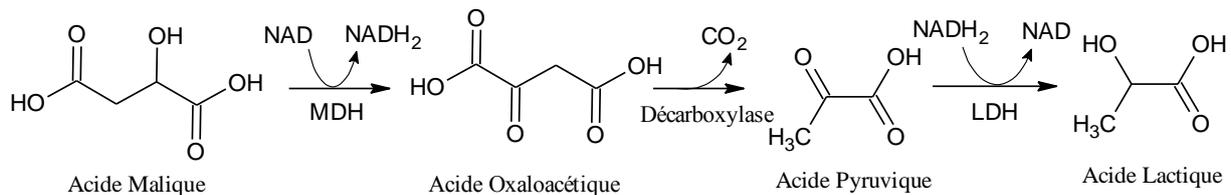
Bien que peu d'acide lactique soit toujours produit dans les cellules musculaires à de très faibles concentrations, il a tendance à s'accumuler au cours d'exercice physique, lorsque les cellules ne reçoivent pas des quantités suffisantes d'oxygène pour métaboliser l'oxygène par les voies normales. L'acide lactique produit pendant l'exercice reste dans le corps que pour de courtes périodes de temps, parfois en moins de trente minutes. Il est métabolisé dans les cellules musculaires, où il a été produit, d'où la production d'énergie, le dioxyde de carbone, l'eau et les autres produits [6].

A.I.3.3. Production par fermentation bactérienne

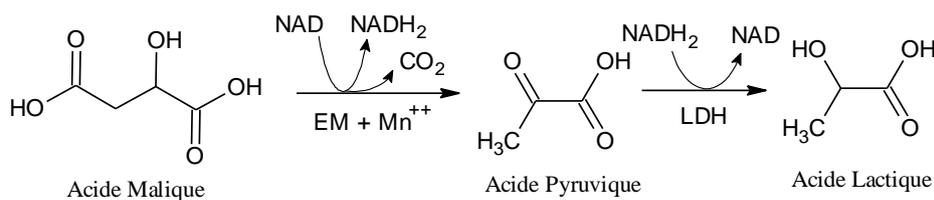
Il existe deux grands types de fermentation bactérienne qui produisent de l'acide lactique : dans le vin et les produits laitiers :

- Dans le vin, il s'agit de la **fermentation malolactique** : l'acide malique, naturellement contenu dans le vin, est dégradé en acide lactique sous l'action des bactéries.

a. Malicodéshydrogénase (MDH)



b. Enzyme Malique (EM)



Schema A.I.6 - Production d'acide lactique par fermentation malolactique.

- Dans le lait et les produits laitiers, l'acide lactique provient de la dégradation du lactose par les bactéries. Plus un lait est frais, moins il contient d'acide lactique. La concentration en acide lactique dans un lait s'exprime en degré Dornic (°D) : 1 °D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait. Un lait frais contient de 15 à 18 °D, il caille à 60–70 °D [7].

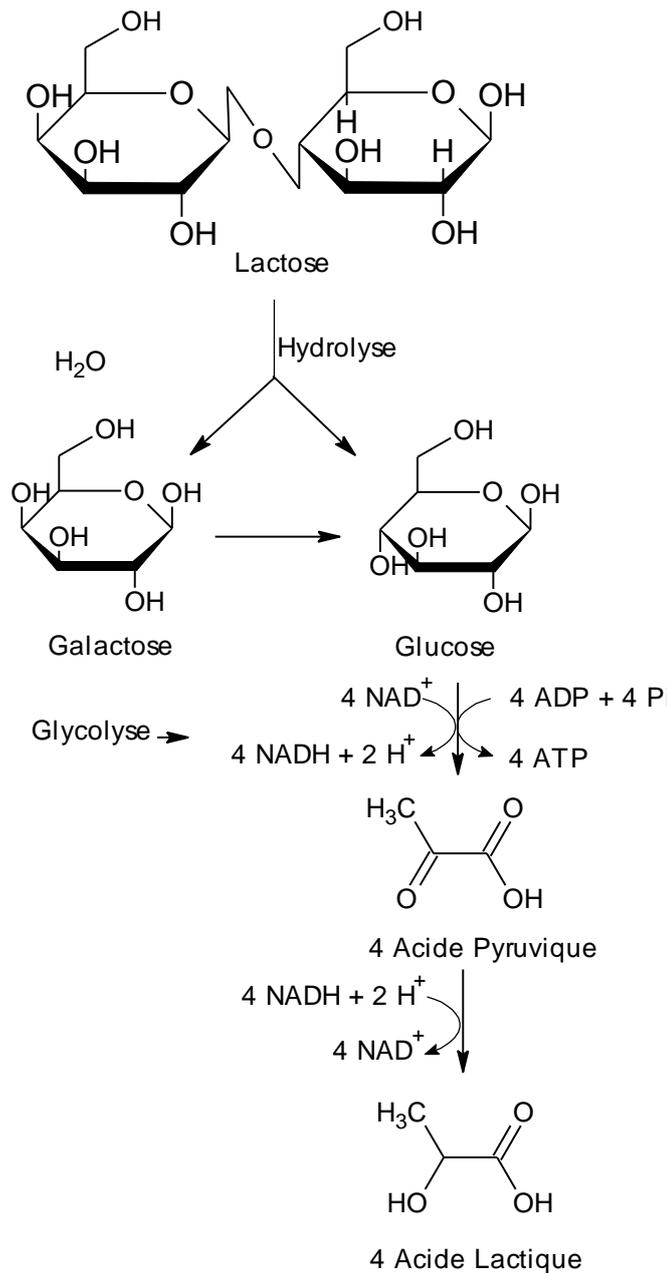


Schéma A.I.7 - Production d'acide lactique par fermentation lactique.

De nombreuses bactéries peuvent provoquer la transformation des sucres en acide lactique, mais nombreuses d'entre elles fournissent en même temps des quantités importantes d'autres acides organiques et seules les bactéries lactiques ne fournissent que de l'acide lactique.

Commercialement, la fermentation du glucose s'effectue à l'aide de *Lactobacillus delbruckii* et convient également pour le maltose. Cependant cette dernière ne fermente pas le lactose et dans ce cas la bactérie *Lactobacillus bulgaricus* est employée [4].

Lorsqu'ils opèrent dans la bouche, l'acide lactique produit peut entraîner des caries [6][7][8][9][10].

Ce mode de fermentation lactique se produit aussi sur certains légumes (chou = choucroute, et autres légumes dits « lacto-fermentés »). L'acide lactique utilisé comme AHA dans les cosmétiques n'est pas extrait du lait mais, par exemple, du sucre de betterave, de myrtille, etc. [6].

A.I.3.4. Production par les levures

L'acide lactique est également produit par les levures au cours du processus de fermentation. La fermentation est le processus par lequel les cellules de levures transforment le glucose en alcool et en gaz carbonique. Les cellules de levure utilisent presque exactement la même enzyme en fermentation que les cellules musculaires utilisent dans la respiration anaérobie. L'enzyme des cellules du muscle et l'enzyme de levure ne diffèrent que par l'orientation d'un groupe d'atomes, conduisant à la production de l'isomère D dans un cas, et l'isomère L de l'autre [11].

A.I.4. Chimie de l'acide lactique

A.I.4.1. Chiralité de l'acide lactique

L'atome du carbone 2 portant le groupe hydroxyle est asymétrique rendant la molécule d'acide lactique chirale. Il se présente donc sous forme de deux énantiomères :

- (*R*)-acide lactique ou D(-)-acide lactique
- (*S*)-acide lactique ou L(+)-acide lactique

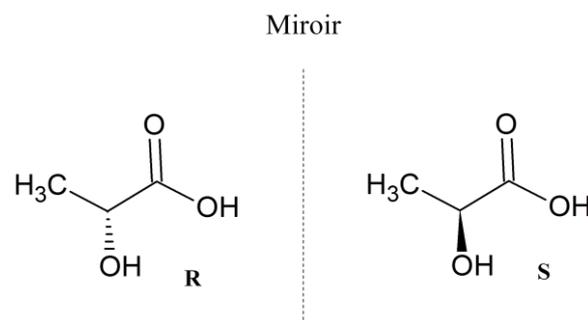


Figure A.I.2 - Chiralité de l'acide lactique.

L'acide contenu dans le lait est un mélange équimoléculaire des formes D et L, donc il s'agit d'un mélange racémique, tandis que le produit extrait du tissu musculaire est de l'acide lactique L pur [12].

A.I.4.2. Solubilité de l'acide lactique

L'acide lactique est soluble dans l'eau et considéré comme un acide faible ($pK_a=3,90$), c'est-à-dire que la réaction de dissociation dans l'eau n'est pas totale :

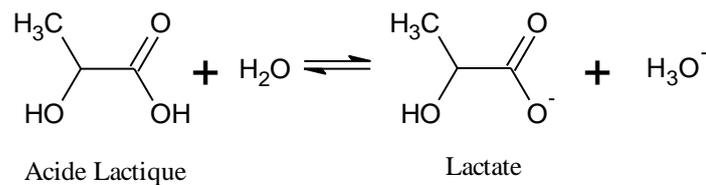


Schéma A.I.8 - Solubilité de l'acide lactique dans l'eau.

On trouve donc à la fois en solution l'acide lactique et sa forme basique, l'ion lactate, en proportions variables selon le pH [12].

A.I.5. Utilisation de l'acide lactique

On trouve aux Etats-Unis au moins quatre qualités commerciales d'acide lactique qui sont : l'acide lactique brut dilué, l'acide lactique comestible à 50%, la qualité plastique et l'acide à 85% répondant aux spécifications de la pharmacopée américaine. Que-ce soit sous l'une ou sous l'autre de ses formes, l'acide lactique a déjà des applications très variées et importantes [1] :

Dans la fabrication des produits pharmaceutiques, le pouvoir instantané de l'acide lactique dans le traitement de la douleur liée aux aphtes buccaux. Un simple contact avec un coton-tige imbibé d'acide lactique blanchit l'aphte et calme immédiatement la douleur, Il agit comme agent bactériostatique notamment sur des bactéries pathogènes comme la salmonelle (ou la listeria). On peut se procurer de l'acide lactique ou bien d'autres produits contenant cet acide dans certaines pharmacies comme le gel Gynofit[®] à usage hygiénique [13].



Figure A.I.3 - L'acide lactique commercialisé dans les pharmacies.

D'après des recherches ayant eu lieu au Québec, il semblerait que l'acide lactique soit un des moyens les plus naturels pour prévenir le cancer de la vessie, mais aussi celui de la peau [14]. En effet les instituts de beauté l'utilisent pour le peeling du visage et pour les soins de cheveux en éliminant les pellicules. Ce peeling à l'acide lactique permet d'atténuer les défauts cutanés, lisser la surface de la peau en éliminant la peau morte de l'épiderme et de traiter les premiers signes du vieillissement cutané.

Dans l'industrie alimentaire comme additif (E270) en tant qu'antioxygène, exhausteur de goût ou acidulant: essence de fruits, extraits, sirops, levure, crèmes glacées, pickles, etc. Ainsi que pour la fabrication des eaux gazeuses et limonades à la place de l'acide citrique.

Il a été employé également dans la teinture pour le rouge turc, dans la teinture des soies et autres textiles, comme mordant pour les impressions sur calicot, pour le traitement des plumes, pour le traitement des peaux et dans le tannage végétal. Dans la préparation des résines phénoliques coulables, on l'utilise comme catalyseur et plastifiant [1].

A.I.6. Dérivées de l'acide lactique et leurs utilisations

Comme la formule de l'acide lactique l'indique, il possède deux groupements -OH actifs, l'un est le groupement carboxyle normal, et l'autre en position alpha est un groupement alcool secondaire [1]. Il est par conséquent possible d'obtenir divers dérivés en partant d'acide lactique en modifiant une seule position ou bien deux positions en même temps.

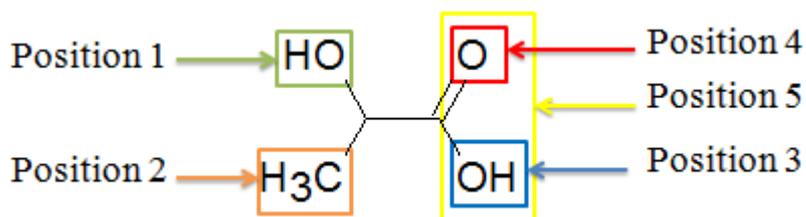


Figure A.I.4 – Les positions des groupements fonctionnels de l'acide lactique.

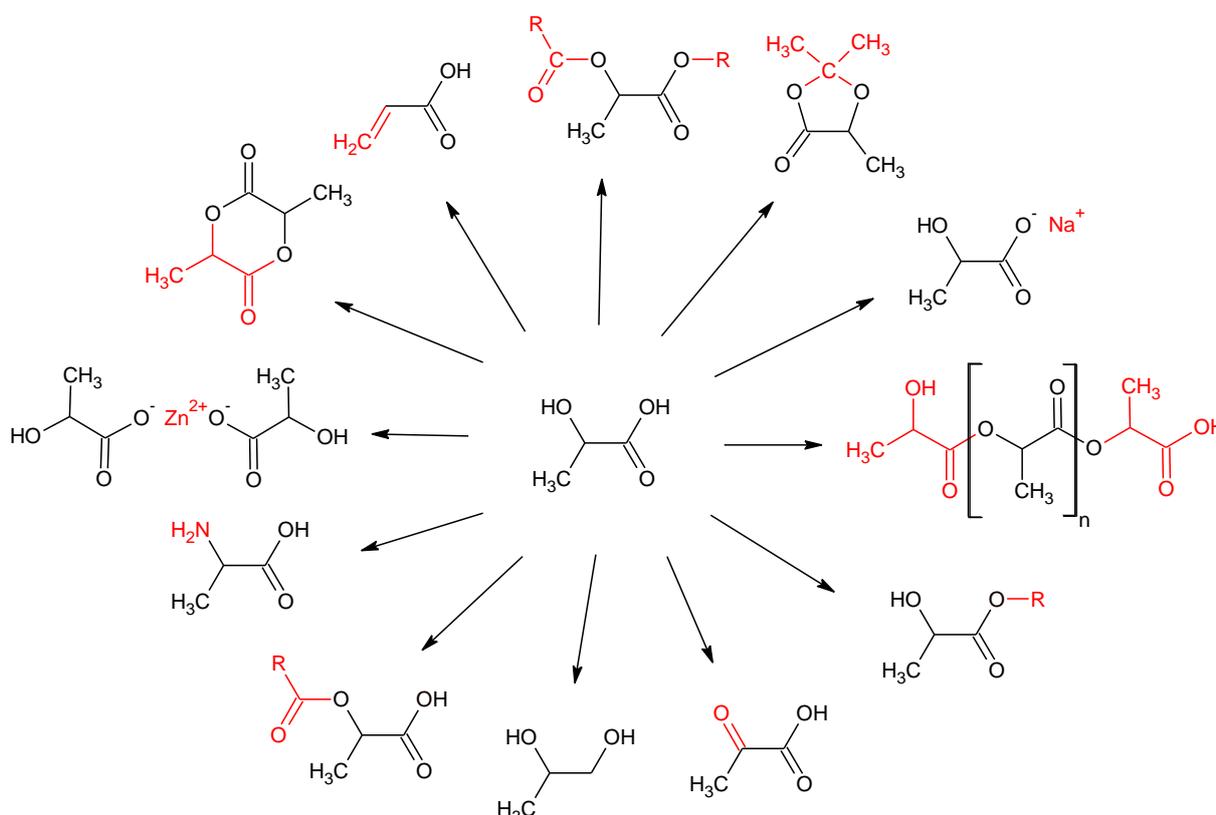


Schéma A.I.9 – Représentation générale des dérivés de l'acide lactique.

- **Position 1** : le groupement -OH en position α

a. Ester lactique de catégorie 2

Enfin, pour obtenir un ester de la 2^{ème} catégorie, on fait réagir le groupe alcool secondaire de l'acide lactique avec de l'anhydride acétique et un chlorure d'acide [15] de façon à obtenir un produit répondant à la formule générale démontrée dans le schéma suivant :

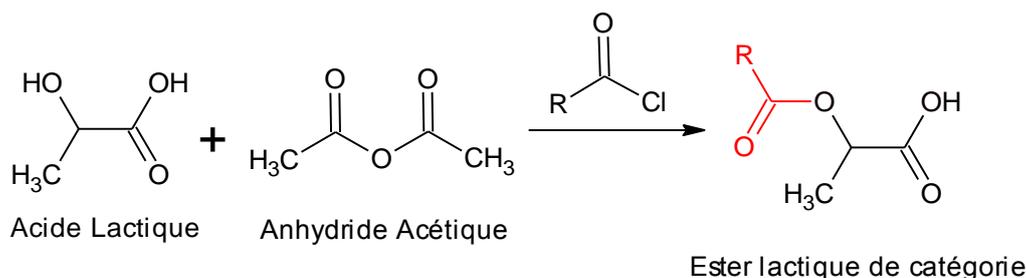


Schéma A.I.10 - préparation de l'ester lactique de catégorie 2.

Ce composé peut être également préparé par saponification partielle de l' α -oxypropionate d'éthyle [16].

b. Oxydation de l'acide lactique en acide pyruvique

C'est une déshydrogénation oxydative de l'acide lactique, elle se fait dans le laboratoire en présence de permanganate de potassium acidifié à l'acide sulfurique [4].

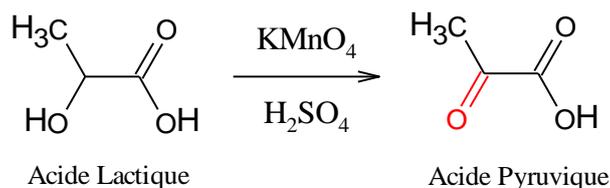


Schéma A.I.11 - Oxydation de l'acide lactique en acide pyruvique

c. Synthèse d'un acide aminé

Cette invention consiste à une méthode d'introduire un groupement amine dans un acide organique ou un ester organique en faisant réagir un sel organique ou un ester organique avec de l'ammoniaque sous haute température et haute pression d'eau. L'objectif de cette méthode est de d'industrialiser un composé acide aminé en partant d'un acide organique [17].

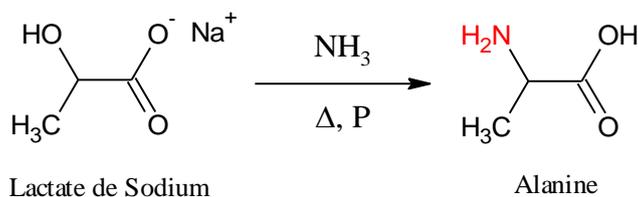


Schéma A.I.12 – Synthèse d'un acide aminé à partir de l'acide lactique.

- **Position 1 et 2** : groupement -OH en position α et groupement -CH₃

a. Formation de l'acide acrylique

Cette méthode consiste à la déshydratation catalytique de l'acide lactique en acide acrylique avec un rendement élevé et une sélectivité sans l'obtention d'autres produits comme l'acétaldéhyde, l'acide propionique et l'acide acétique. [18]

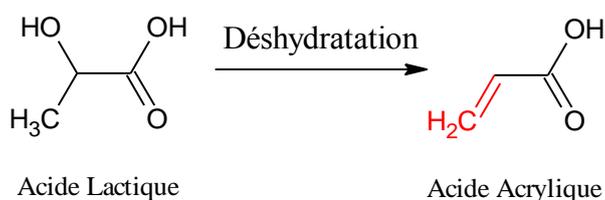


Schéma A.I.13 - Formation de l'acide acrylique.

- **Position 1 et 4** : Groupement -OH en position α et le -OH du carboxyle

a. L'ester lactique de catégorie 3

Pour obtenir un ester de la 3^{ème} catégorie, on fait réagir le groupe alcool secondaire en position α (en **position 1**) restant dans l'éther de la 1^{ère} catégorie, soit avec des chlorures d'acide [19], soit avec des anhydrides d'acide [20] pour obtenir un produit répondant à la formule générale comme démontré sur le schéma suivant :

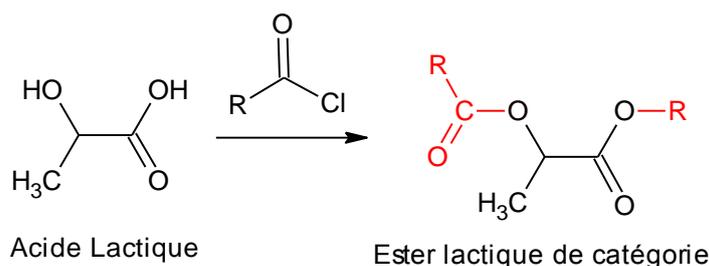


Schéma A.I.14 – Production de l'ester de catégorie 3.

Les esters inférieurs, c'est-à-dire les esters méthyliques, éthyliques et propyliques sont solubles dans l'eau et ont tendance à s'hydrolyser; aussi ces caractéristiques tendent à limiter leurs emplois. Tandis que les esters supérieurs : esters butyliques, amyliques, lauryliques, stéaryliques, etc., sont insolubles dans l'eau et plus stables [1].

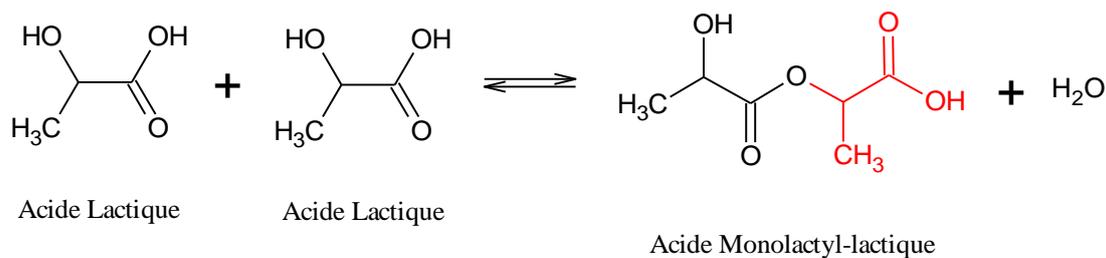
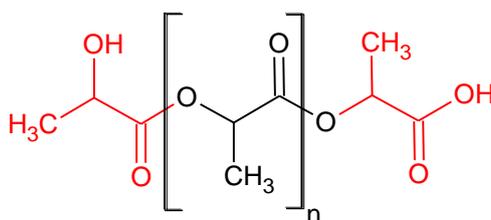


Schéma A.I.16 - Condensation de l'acide lactique en acide monolactyl-lactique.

La réaction est réversible et l'élimination progressive de l'eau favorise la formation de l'ester acide. En poursuivant la déshydratation, l'inter-estérification se poursuit avec formation de l'acide dilactyl-lactique, de l'acide trilactyl-lactique et finalement des produits fortement condensés et polymérisés [4] répondant à la formule générale :



Acide Polylactyl-lactique

Figure A.I.5 – L'acide polylactyl-lactique.

La déshydratation peut être réalisée en chauffant l'acide lentement de 100 à 180°C., elle est facilitée en opérant sous pression réduite en présence d'un catalyseur comme l'acide sulfurique et d'un agent entraînant l'eau formée [4]. Ces produits peuvent être employés dans la préparation d'adhésifs ou de vernis destinés à être cuits au four [1], par exemple le vernissage des récipients pour produits alimentaires, des siccatifs non toxiques à base de zinc, de cobalt ou de fer sont employés et les vernis, après application, subissent une cuisson entre 160 et 200°C. Ces vernis résistent (insolubles) aux acides dilués, aux alcalis, aux alcools, à l'eau et en général à tous les produits employés dans la fabrication des aliments, ces vernis conviennent particulièrement bien pour protéger le matériel utilisé dans l'industrie laitière [4].

- **Position 4**

- a. **L'ester lactique de catégorie 1**

L'hydroxyle du groupe -COOH peut réagir avec un alcool et former un ester de l'acide lactique répondant à la formule $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOR}$ [24].

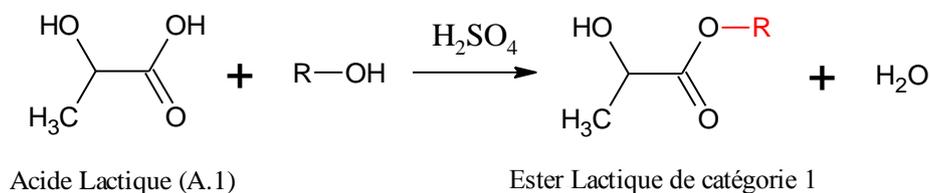


Schéma A.I.19 – Production de l'ester lactique de catégorie 1.

- b. **Les sels métalliques**

Les sels métalliques industriels s'obtiennent en neutralisant au moyen de sels alcalins l'acide lactique tel qu'il se forme dans les récipients où s'effectue la fermentation du lactose. Lorsque la neutralisation est terminée, les solutions sont concentrées et les sels de l'acide lactique cristallisent. Lorsqu'on désire obtenir des sels purs, il faut raffiner les sels bruts, et employer une méthode assez longue de purification [1].

En solution, le groupe carboxyle -COOH peut perdre un proton, donnant un ion lactate (sel de l'acide lactique) : $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$ [4].

Le lactate de calcium (E327) se prépare facilement et jusqu'ici, c'est le sel de l'acide lactique qui est le plus important. Il est employé, en médecine, dans les poudres destinées à faciliter la cuisson du pain, etc.

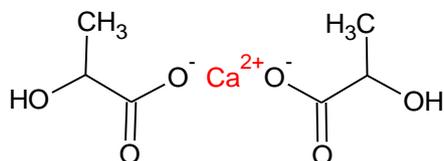


Figure A.I.6 – Lactate de calcium.

On a récemment utilisé le sel de sodium (E325) à la place de la glycérine, car ce produit a l'avantage d'absorber et de retenir l'humidité, on l'ajoute donc au tabac pour éviter le séchage de ce dernier.

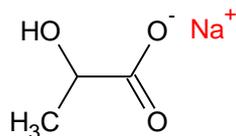


Figure A.I.7 – Lactate de sodium.

Des brevets signalent également l'emploi du lactate de cuivre dans la préparation de bains électrolytiques.

Le sel de zinc est enfin employé parfois dans la préparation de l'acide lactique pur [1].

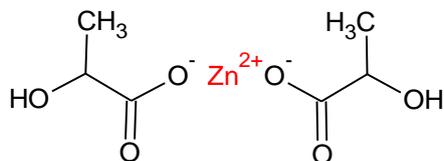


Figure A.I.8 – Lactate de zinc.

Ses sels sont sous formes de poudre et sont également solubles dans l'eau. Ils agissent comme agent bactériostatique notamment sur des bactéries pathogènes comme la salmonelle (ou la listeria) [1][13].

- **Position 5** : le groupement carboxylique -COOH

La fonction carboxylique de l'acide lactique peut réagir avec des réactifs différents pour former les esters, les amides et les sels de calcium, de sodium et de potassium, hydrazide lactique, etc. Ces derniers jouent le rôle d'intermédiaires pour donner des composés hétérocycliques comme les oxadiazoles, thiadiazoles, triazoles aminotriazoles, aminothiadiazole, etc.

A.I.7. Conclusion

Ce chapitre nous a permis d'étudier l'acide lactique qui représentera le produit de départ pour la synthèse des hétérocycles, d'où leurs importance parmi les composés chimiques, pharmaceutiques et biologiques actifs, et qui à leur tour joueront le rôle de la partie base des analogues de glycosides et nucléosides. Ces deux derniers seront bien détaillés dans le chapitre suivant.

Partie A. (Théorie)

Chapitre A. II.

***Les Nucléosides et les
Glycosides***

Chapitre A. II.

Les Nucléosides et les Glycosides

A.II.1. Introduction

Les glycosides et les nucléosides sont des molécules biologiques naturelles d'une importance capitale, car ils jouent un rôle essentiel dans de très nombreux processus biologiques. Leur modification peut être effectuée soit au niveau de toute la molécule ou seulement d'une partie pour la production d'analogues synthétiques.

A.II.2. Les Nucléosides

A.II.2.1. Les Nucléotides et les Nucléosides

A l'instar des protéines qui sont des polymères d'acides aminés, les acides nucléiques sont des polymères de briques élémentaires, appelées **nucléotides**, reliés entre eux pour former une longue chaîne. Chaque nucléotide est composé d'un nucléoside relié à un groupement phosphate, et chaque nucléoside est constitué d'un sucre aldopentose relié à une base aminée hétérocyclique par une liaison entre le carbone anomérique du sucre et l'azote de la base (**Figure A.II.1**) [25]

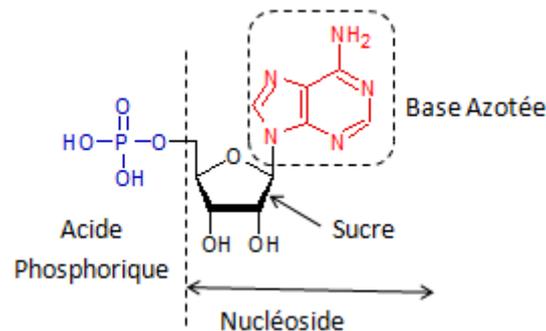


Figure A.II.1 - Structure d'un nucléotide (Adénosine).

A.II.2.1.1. Les Nucléosides

Le nucléoside est constitué d'un sucre (ribose dans l'ARN ou désoxyribose dans l'ADN) qui se lie à une base azotée par une liaison covalente (N-osidique) impliquant un des azotes de la base (N_1 des pyrimidines ou N_9 des purines) et le carbone 1' du furanose (sous forme hémiacétalique) en conformation β (carbone réducteur ou fonction semi-acétalique) [26].

A.II.2.1.2. Les Nucléotides

Le nucléotide résulte de la condensation d'un ose (pentose) avec une base nucléique (hétérocycle azoté) qu'on appelle **nucléoside** et l'estérification de la fonction alcool primaire (carbone 5') du sucre et une des trois fonctions acides du phosphate produit un **nucléotide** [26].

A.II.2.2. Classification des Nucléosides

On peut classifier les nucléosides selon leurs origines ou selon leurs structures chimiques.

A.II.2.2.1. Les nucléosides naturels

- **N-nucléosides** : ce sont des nucléosides ayant une obligation entre le carbone anomérique de la partie de sucre et l'azote de la partie basse.
- **C-nucléosides** : ce sont des nucléosides ayant une obligation entre le carbone anomérique et le carbone de la base.

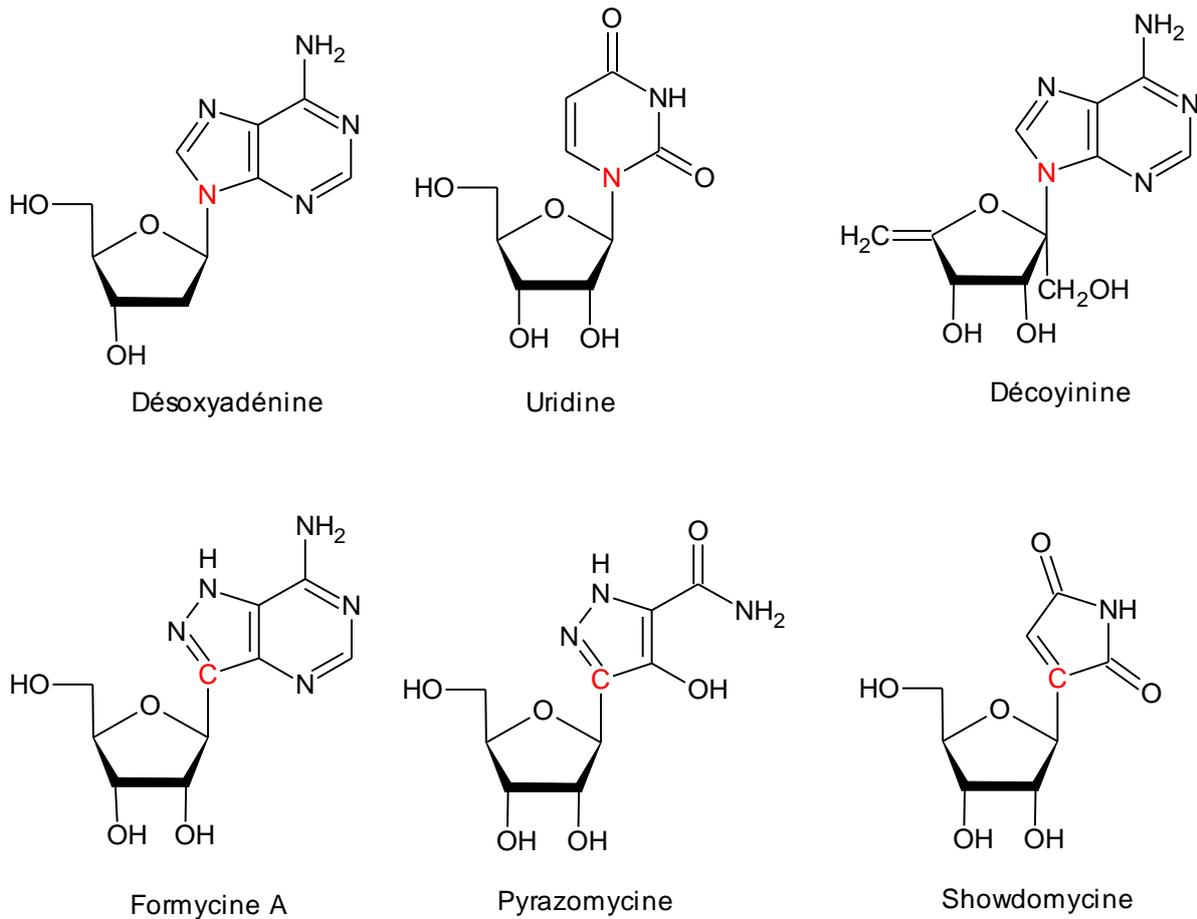


Figure A.II.2 - Exemples de N- et C-Nucléosides.

A.II.2.2.2. Les analogues des nucléosides

Les analogues de nucléosides sont des molécules de synthèse ayant une structure proche des nucléosides naturelles. Grâce à leurs rôles biologiques essentiels, ils ont joué un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies virales, comme les hépatites, les herpès ou le SIDA [27].

La recherche dans ce domaine a conduit à de nombreuses modifications portant sur :

La base (hétérocycle) et / ou le sucre (cyclique, acyclique, seco-acyclique) des nucléosides naturels (Figure A.II.3).

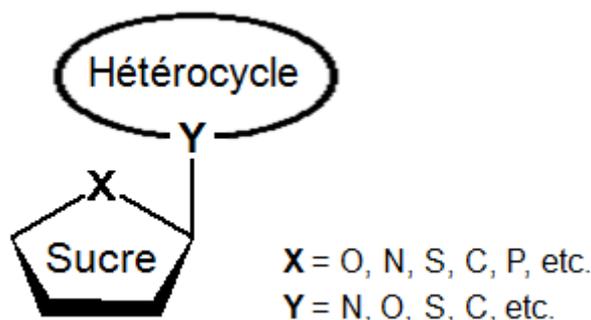


Figure A.II.3 - Sites de modifications d'un nucléoside.

a. Nucléosides cycliques

Ce type d'analogue de nucléoside ne comprend pas une modification sur le sucre, en terme de forme, mais des modifications sur les différents éléments du sucre et/ou l'hétérocycle sont possibles. Ce sont des analogues des nucléosides naturels comme les nucléosides à $X = O$ et $Y = N$ qui sont tous analogues d'adénosine d'où le sucre est modifié. Il existe aussi des analogues de nucléosides cycliques dont X est variable et/ ou avec modification de la base (Figure A.II.4) [28].

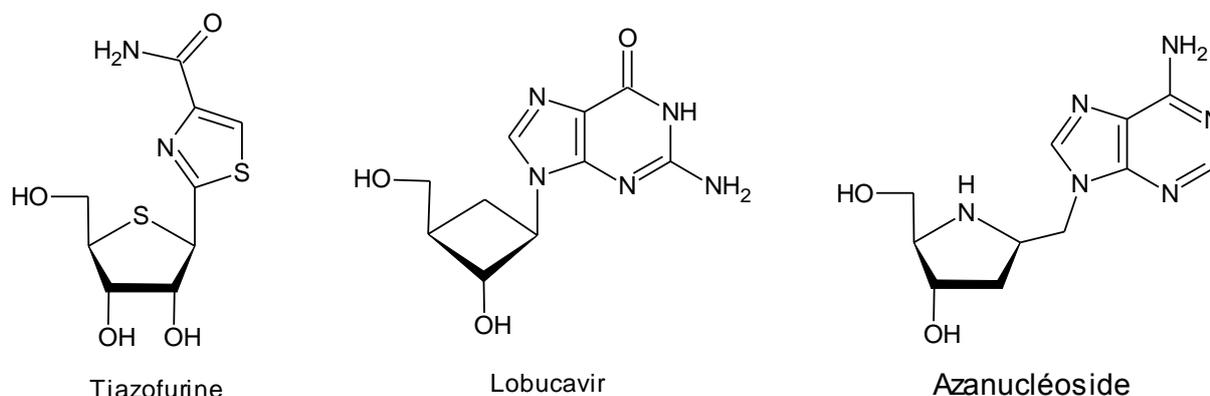


Figure A.II.4 - Exemple de nucléosides cyclique.

b. Nucléosides acycliques

Les nucléosides acycliques, d'autre part, diffèrent des nucléosides conventionnels car l'anneau du sucre est remplacé par une partie acyclique [29]. Deux exemples pour cette catégorie de nucléosides acycliques : 2-(D-erythro-glycérol-1-yl) pyrrole (A.2) et 1-phenyl-4-phenyl-3-(1-threo-trititol-1-yl) pyrazolin-5-one (A.3).

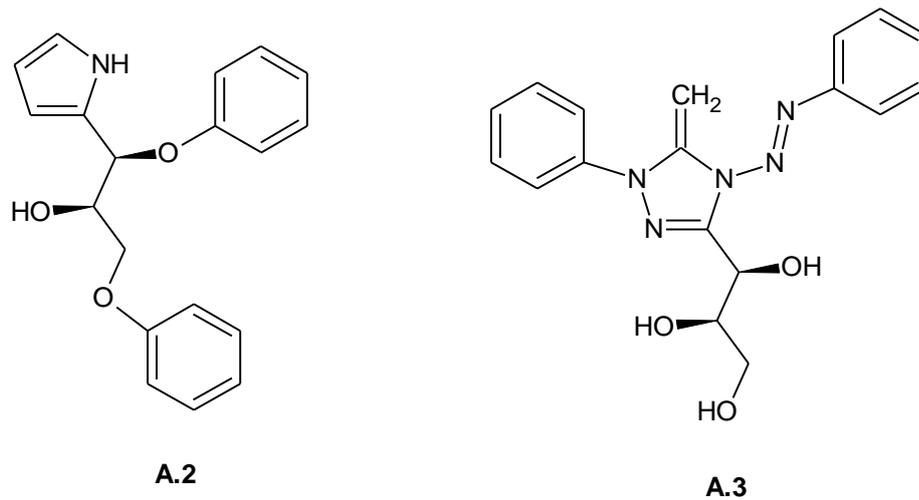
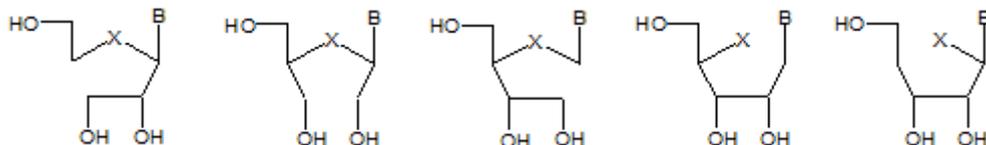


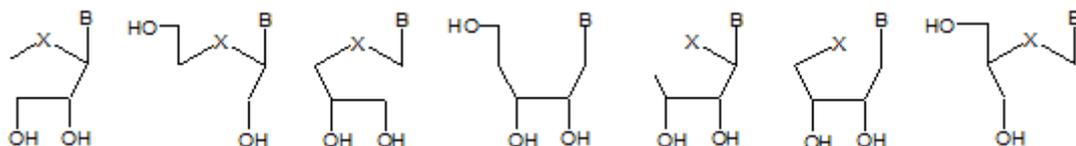
Figure A.II.5 - Exemple de nucléosides acycliques.

Parmi la classe des nucléosides acyclique, il existe la sous classe appelée seco-nucléosides. Ce sont des nucleosides acycliques, Ils diffèrent des nucléosides cycliques par l'absence de la structure d'anneaux du pentosyl. Pour distinguer cette classe est l'absence d'une ou plusieurs liaisons de la partie sucre (pentose) pour donner une chaîne ouverte (Figure A.II.6).

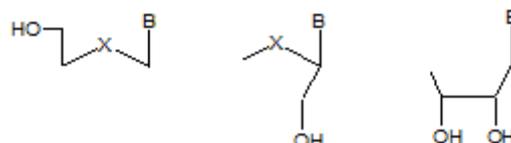
➔ Seco-nucléosides



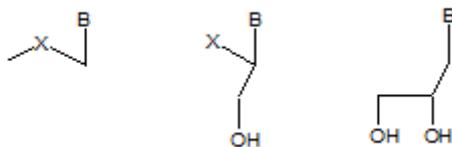
➔ Diseco-nucléosides



➔ Triseco-nucléosides



➔ **Tetraseco-nucléosides**



➔ **Pentaseco-nucléosides**

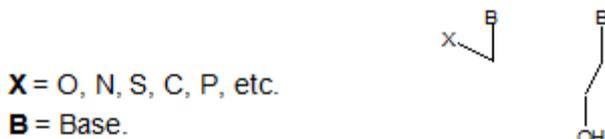


Figure A.II.6 - Classification des Seco-nucléosides.

Les seco-nucléosides ont montré une très importante efficacité clinique comme un agent antiviral, par exemple l'inhibition sélective de la réplique de VHS (Virus d'Herpes Simplex) par l'acyclovir qui est un analogue de la 2'-désoxyguanosine [30].

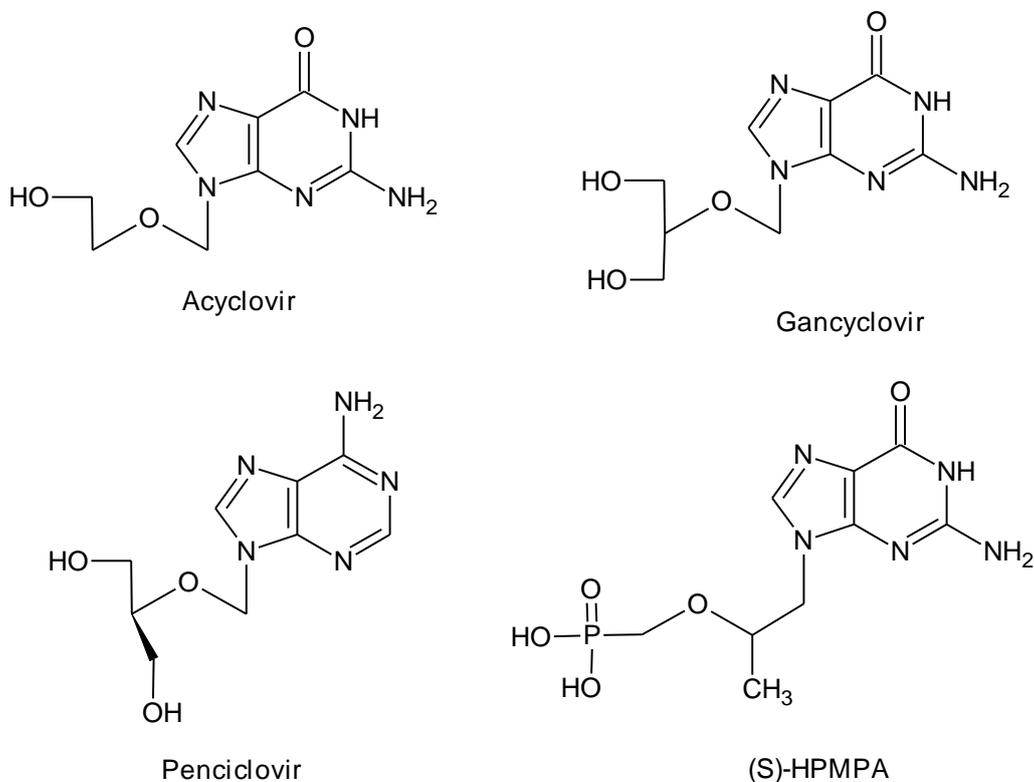


Figure A.II.7 - Exemple de seco-nucléosides.

A.II.3. Les Glycosides

A.II.3.1 Définition

Les hétérosides, ou glycoside, sont des molécules nées de la condensation d'un sucre (ose, alors qualifié de **glycone**) et d'une substance nonglucidiques (appelées **aglycone**).

Les glycosides jouent de nombreux rôles importants dans les organismes vivants. Beaucoup de plantes stockent des produits chimiques sous forme de glycosides inactifs. Ces produits peuvent être activés par des enzymes d'hydrolyses, ce qui provoque la rupture de la partie sucre, ce qui rend le produit chimique disponible pour être utiliser. Beaucoup de ces glycosides de plantes sont utilisées comme médicaments. Chez les animaux et les humains, les poisons sont souvent liés à des molécules de sucre dans le cadre de leur élimination de l'organisme. [31]

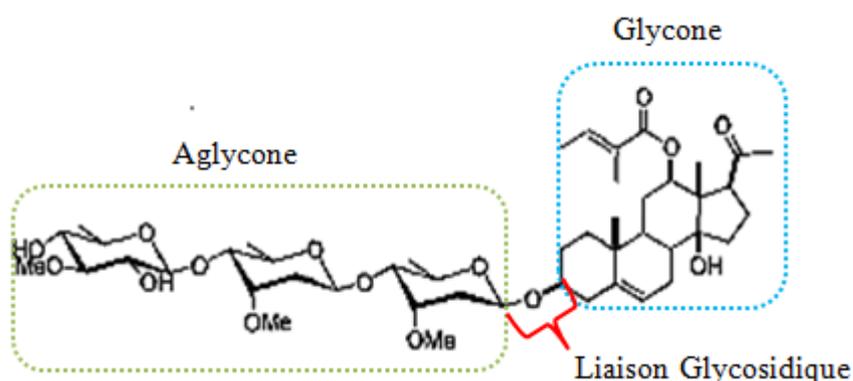


Figure A.II.8 - Structure d'un glycoside.

A.II.3.2. Classification des Glycosides

Les glycosides peuvent être classifié selon le type du sucre présent (glycone), selon la liaison entre la partie glycone et la partie aglycone (liaison glycosidique) ou selon la nature chimique de la partie aglycone.

A.II.3.2.1. Classification selon le glycone

- Si le groupe glycone du glycoside est un **glucose**, la molécule est appelée **glucoside**.
- Si le groupe glycone du glycoside est un **fructose**, la molécule est appelée **fructoside**.

- Si le groupe glycone du glycoside est un **pentose**, la molécule est appelée **pentoside**.
- Si le groupe glycone du glycoside est un **rhamnose**, la molécule est appelée **rhamnoside**.
- Si le groupe glycone du glycoside est un **acide glucuronique**, la molécule est appelée **glucuronide**, etc.

Dans le corps humain, les substances toxiques sont souvent liées à l'acide glucurinique pour augmenter leurs solubilités dans l'eau, et donc les glucuronides formés sont excrétés.

A.II.3.2.2. Classification selon la liaison glycosidique

Un glycoside est une molécule dans laquelle le sucre est lié par son carbone anomérique à la partie aglycone par une liaison glycosidique. Il existe quatre types de liaisons et elles peuvent être toutes rompues par hydrolyse : [32]

- Liaison de type C- définissant un *C-glycoside*.
- Liaison de type O- définissant un *O-glycoside*.
- Liaison de type S- définissant un *thioglycoside*.
- Liaison de type N- définissant un *glycosylamine*.

A. II.3.2.3. Classification selon l'aglycone

Les glycosides sont aussi classifiés selon la nature chimique de l'aglycone. C'est la classification la plus utilisée et considérée en biochimie et en pharmacologie.

➤ *Les C-glycosides*

- **Glycosides anthracéniques**

Ces glycosides contiennent des groupes aglycones qui sont des dérivés d'anthracènes. Ils ont un effet laxatif. Ils sont principalement retrouvés dans les plantes dicotylédones sauf la famille des Liliacées qui sont des monocotylédones. Ils sont présents dans le séné, la rhubarbe et les espèces de l'Aloès. Antron et anthranol sont des formes réduites d'anthraquinone [33].

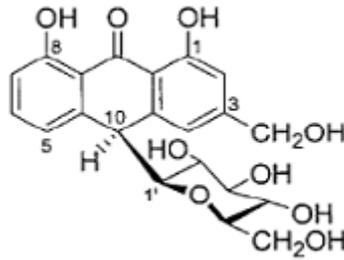


Figure A.II.9 - Structure chimique d'Aloïne A.

- **Glycosides Chromones**

Dans ce cas, l'aglycone est un benzo-gamma-pyrone [34].

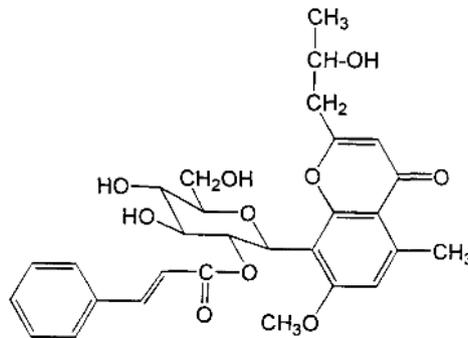


Figure A.II.10 - Structure chimique d'un glycoside chromone.

➔ **Les O-glycosides**

- **Glycosides Coumarines**

Dans ce type de glycosides, l'aglycone est la coumarine ou un de ces dérivés. Par exemple l'apterine est rapportée à dilater les artères coronaires ainsi que des canaux de calcium bloquent. Autres glycosides coumarine sont obtenus à partir de feuilles séchées de *Psoralea corylifolia* [35].

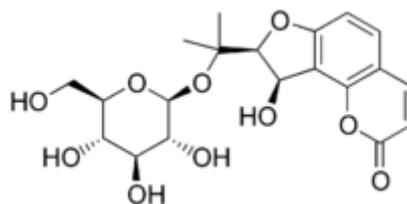


Figure A.II.11 - Structure chimique d'Apterine.

- **Glycosides Cyanogénétiques**

Dans ce cas, l'aglycone contient un groupe de cyanure. Toutes les plantes qui ont ces glycosides, se trouve stockées dans la vacuole, mais, si la plante est attaquée, ils se libèrent et s'activent par des enzymes dans le cytoplasme. Ces enzymes enlèvent la partie sucre de la molécule et libèrent le cyanure d'hydrogène toxique. Leur stockage sous formes inactives dans le cytoplasme les empêche d'endommager la plante dans des conditions normales. Les hétérosides cyanogénétiques sont fréquents chez de nombreuses plantes (fougères, Rosaceae, Fabaceae, gymnospermes, Poaceae, Araceae, Euphorbiaceae, Passifloraceae). Exemple d'Amygdaline retrouvée dans les amandes [36].

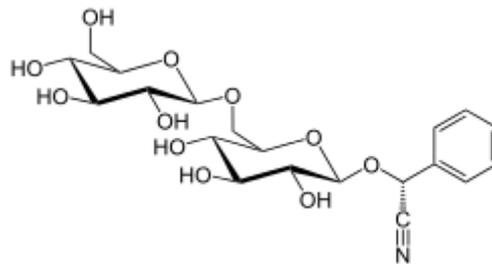


Figure A.II.12 - Structure chimique d'Amygdaline.

- **Glycosides flavonoïdes**

L'aglycone est un flavonoïde. Des exemples de ce grand groupe de glycosides comprennent :

- Hespéridine (aglycone: hespérétine, glycone: Rutinose)
- Naringine (aglycone: Naringenin, glycone: Rutinose)
- La rutine (aglycone: quercétine, glycone: Rutinose)
- Quercitrine (aglycone: quercétine, glycone: Rhamnose)

Parmi les effets importants de flavonoïdes sont leur effet antioxydant. Ils sont aussi connus pour diminuer la fragilité capillaire [37].

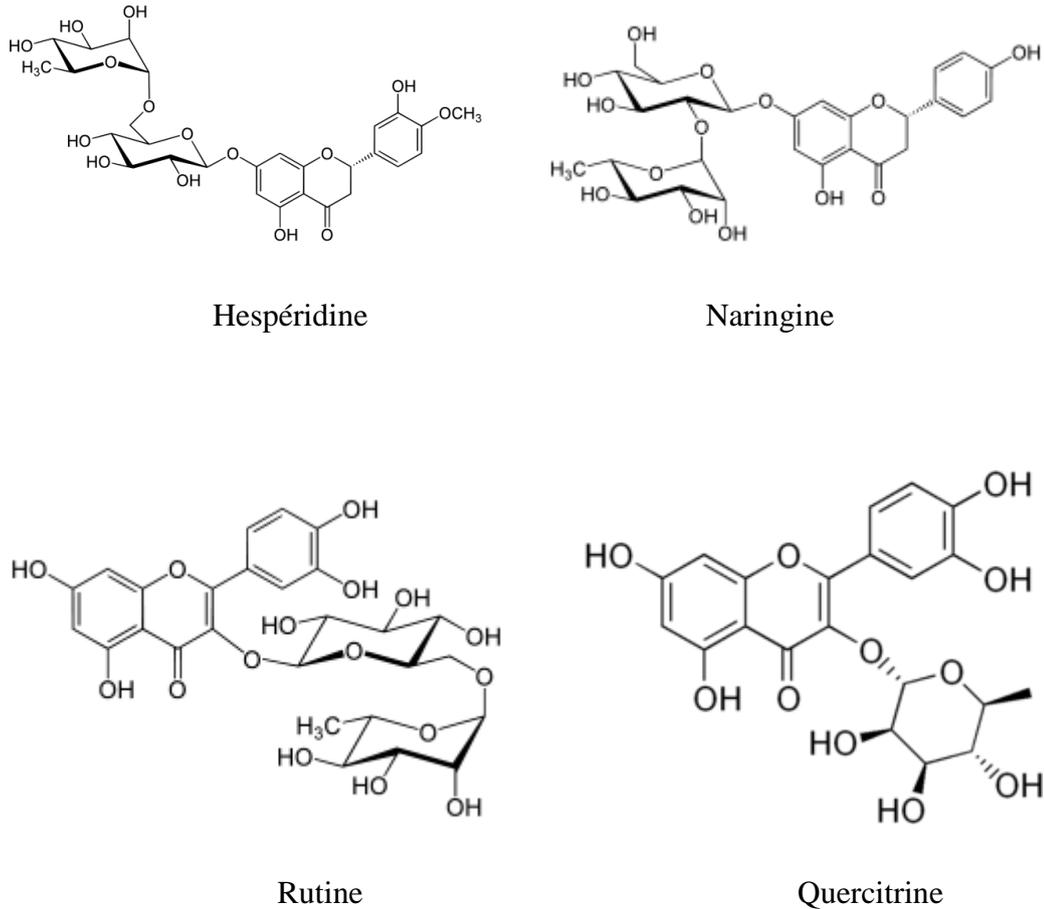


Figure A.II.13 - Structure chimique de quelques glycosides flavonoïdes.

- **Glycosides phénoliques**

Dans ce type, l'aglycone est une structure phénolique simple. Par exemple, l'arbutine qui se trouve dans *Arctostaphylos uva-ursi*. Il a un effet antiseptique urinaire [38].

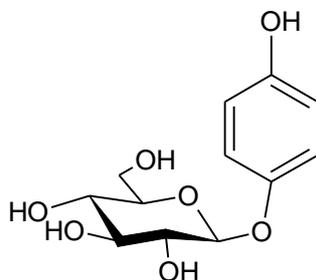


Figure A.II.14 - Structure chimique d'Arbutine.

- Les Saponines

Ces composés donnent une mousse permanente quand on les secoue avec de l'eau. Ils provoquent également une hémolyse des globules rouges. Les glycosides de saponine se trouvent dans la réglisse. Leurs valeurs médicinales est due à leurs effets, corticoïde et anti-inflammatoires [39].

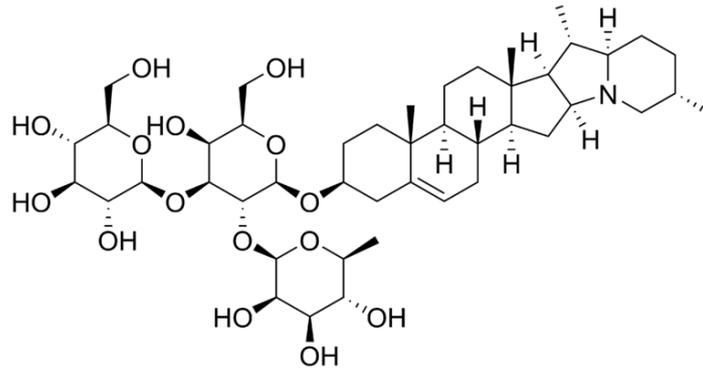


Figure A.II.15 - Structure chimique de la Solanine.

- Glycosides stéroïdiens ou glycosides cardiotoniques

La partie aglycone est un noyau stéroïdien. Ces glycosides sont trouvés dans les genres de plantes *Digitalis*, *Scilla*, et *Strophanthus*. Ils sont utilisés dans le traitement des maladies cardiaques, par exemple, l'insuffisance cardiaque congestive et l'arythmie. Leurs actions sur le cœur augmentent la contraction du muscle cardiaque, en ralentissant le rythme cardiaque et en diminuant la résistance artérielle [40].

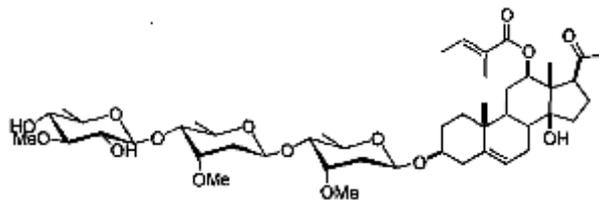


Figure A.II.16 - Structure chimique d'un glycoside cardiotonique.

- **Glycosides Alcooliques**

Un exemple d'un glycoside alcoolique c'est la salicyline, qui se trouve dans le genre *Salix*. La salicine est convertie dans le corps en acide salicylique, qui est étroitement liée à l'aspirine et elle a des effets analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire [41].

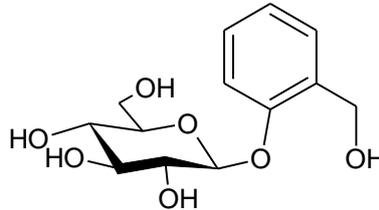


Figure A.II.17 - Structure chimique d'un glycoside alcoolique.

- **Les Stévioides**

Ces glycosides sucrés sont trouvés dans la plante *Stevia rebaudiana*. Les deux glycosides primaires, le stéviocide et le rébaudioside A, sont utilisés comme édulcorants naturels dans de nombreux pays. La partie aglycone de ce type de glycoside est le stéviol. Le glucose ou les combinaisons rhamnose-glucose sont liés aux extrémités de l'aglycone pour former les différents composés [42][43].

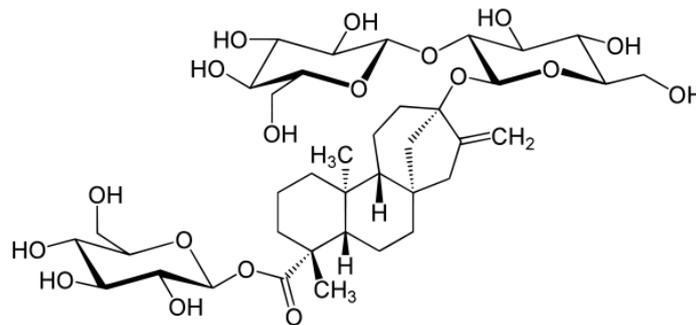


Figure A.II.18 - Structure chimique d'un stéviocide.

➔ *Les S-glycosides*

• **Thioglycosides**

Comme son nom l'indique, ces composés contiennent du soufre. Par exemples, sinigrine trouvé dans la moutarde noire, et sinalbine dans la moutarde blanche [44].

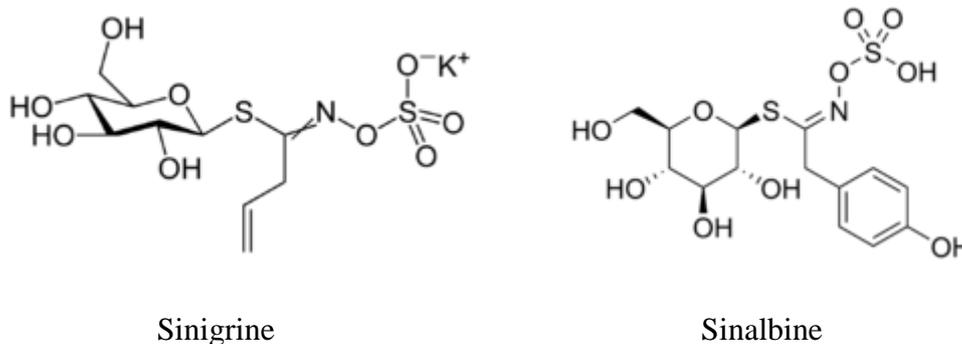


Figure A.II.19 - Les thioglycosides.

➔ *Les N-glycosides*

Cette classe de glycosides est caractérisée par la présence d'une liaison glycosidique -N- entre le glycone et l'aglycone. Exemple de 5-pentyl-2-(D-amino arabinoside)-1,3,4-oxadiazole (A.4) et 5-pentyl-2-(Daminoglycoside)-1,3,4-thiadiazole (A.5) obtenus par l'association de 1,3,4-oxadiazole et de 1,3,4-thiadiazole (partie aglycone), synthétisés à partir de l'acide n-hexanoïque, respectivement avec l'arabinose (partie glycone) [45].

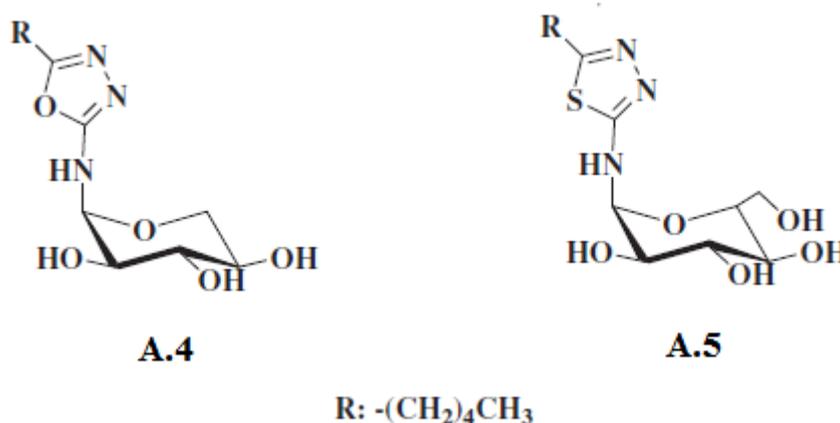


Figure A.II.20 – Exemple de N-Glycoside.

A.II.4. Conclusion

Des recherches récentes s'intéressent aux glycosamines ou N-glucosides vu leurs importantes activités Antimicrobiennes, et donc ce travail se basera sur la synthèse de ce type de glycoside en vu d'obtenir de nouveaux analogues synthétiques ayant une structure semblable au penciclovir.

Partie B.
(Résultats et Discussion)

Chapitre B. I.
Synthèse Organique

Chapitre B. I.

Synthèses Organiques

B.I.1. Introduction

L'objectif de notre travail est basé sur la synthèse d'analogues du seco-acycloazolyl glycoside. Et pour y atteindre, ce travail a été partagé en trois phases :

- La première phase consiste à la protection de deux groupements -OH du glycérol à fin d'obtenir un sucre protégé.
- La deuxième phase consiste à la synthèse des hétérocycles à cinq chaînons à partir de l'acide lactique à savoir oxadiazoles, aminotriazole et aminothiadiazoles selon le schéma réactionnel global (**Schéma B.I.1**).
- Et la troisième phase représente le greffage des hétérocycles avec le sucre protégé.

L'analyse des spectres infrarouge et RMN des produits synthétisés a été comparée et confirmée [46][47].

B.1.2. Synthèse de 2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol / 2-phenyl-1,3-dioxolan-4YI – méthanol (B.3)

La réaction du glycérol (**B.1**) avec le benzaldéhyde (**B.2**) dans le chloroforme comme solvant et en présence de l'acide para toluène sulfonique (ATPS), et après que ce mélange a été porté à reflux et sous agitation magnétique pendant 6 heures, la CCM (Toluène / Ethanol 2:1) a démontré un rapport frontal égal à 0.78. Cette réaction conduit à la formation du sucre protégé sous forme d'un liquide jaunâtre avec un rendement de 31.5%.

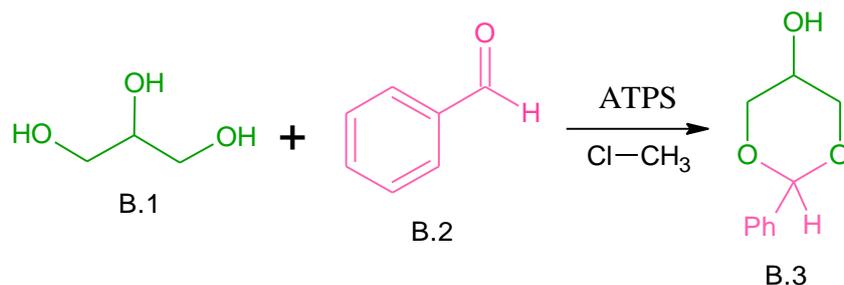


Schéma B.I.2 - Synthèse de 2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol.

Le spectre infrarouge du produit (**B.3**) présente une bande large centrée à 3398.07 cm^{-1} révélant le groupement -OH et celle située à 2879.24 cm^{-1} indique le groupe -CH aromatique. Les vibrations du groupement C=C aromatique apparaissent à 1597 cm^{-1} et celle de l'éther (C-O-C) apparaissent en 1070 cm^{-1} (Annexe 1).

B.1.3. Synthèse de 2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl 4-methylbenzenesulfonate (B.4)

La synthèse du composé (**B.4**) a été effectuée par la réaction du mélange du produit (**B.3**) avec le tosyl chloride en présence de pyridine, le mélange est porté sous agitation magnétique à température ambiante, pendant 12 heures. Le produit obtenu est sous forme de cristaux blancs ayant un point de fusion à température ambiante, avec un rendement de 60%.

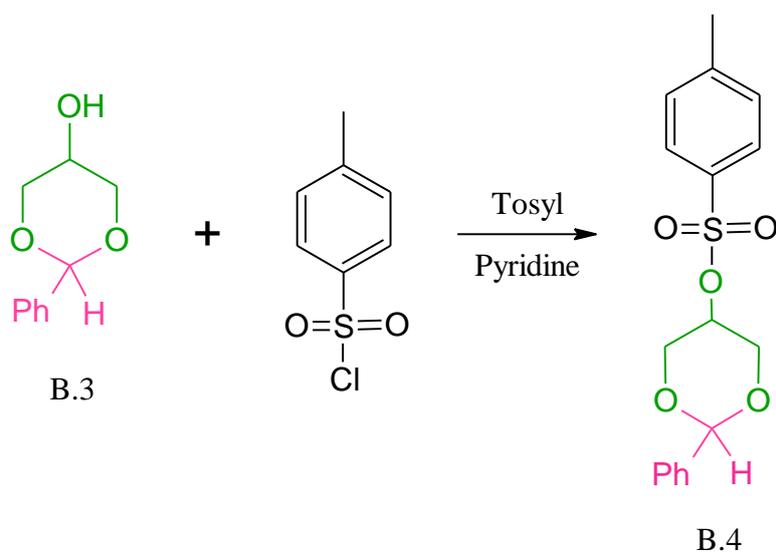


Schéma B.I.3 : Synthèse de 2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl 4-methylbenzenesulfonate.

Le spectre infrarouge du produit (**B.4**) montre l'absence de la bande qui caractérise le groupement -OH et l'apparition de deux bandes intenses à 1171cm^{-1} et à 1373cm^{-1} relatives au $\text{O}=\text{S}=\text{O}$. (Annexe 2).

B.I.4. Synthèse du 2-Hydroxypropanoate d'éthyle (lactate d'éthyle) (B.5)

L'estérification de l'acide lactique (**A1**) avec l'éthanol absolu en présence de l'acide sulfurique concentré pendant 7 heures de reflux à haute température (110°C) nous a permis l'obtention du lactate d'éthyle (**B.5**) avec un rendement de 62%. L'ester obtenu est sous forme de liquide huileux jaunâtre, soluble dans les alcools, ayant un point d'ébullition de 154°C (schéma B.1.4).

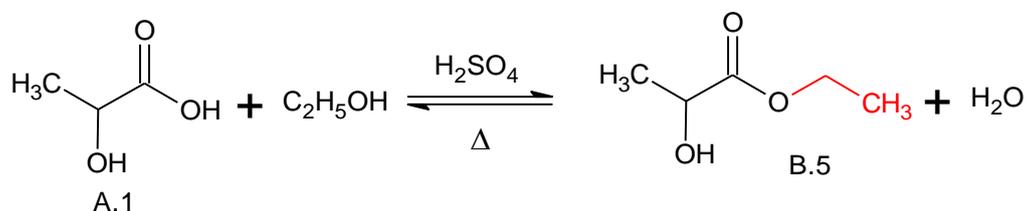


Schéma B.I.4 Synthèse du 2-Hydroxypropanoate d'éthyle (lactate d'éthyle) (**B.5**)

Cette réaction a été contrôlée par la chromatographie sur couche mince (CCM) qui a indiqué l'apparition de la tâche de l'ester après 30 min de la réaction avec un rapport frontal $R_{fB.1} = 0.89$ dans l'éluant (Toluène / Ethanol 2:1).

Le spectre infrarouge du lactate d'éthyle (**B.5**) indique la diminution de la bande dans le domaine 3477 cm^{-1} caractérisant l'élongation du -OH du groupement carboxylique, l'intensité de la bande aigue est concentrée à 1741 cm^{-1} qui caractérise le groupement carbonyle C=O de l'ester, ainsi que l'intensité du pique C-O-C à 1132 cm^{-1} (**Annexe 4**).

B.I.5. Synthèse du 2-hydroxypropanehydrazide (hydrazide lactique) (**B.6**)

L'hydrazide lactique (**B.6**) a été obtenu à un rendement de 91% à partir du lactate d'éthyle (**B.5**) et l'hydrazine hydratée à 50-60%. Le suivi de la synthèse a été suivi par CCM (Toluène / Ethanol 2:1) qui a révélé une tâche ayant un rapport frontal $R_{fB.2} = 0.34$ et disparition totale du lactate d'éthyle après 5 heures sous reflux à 130°C . Le produit final obtenu est sous forme de sirop incolore d'une densité de 1.2, soluble dans l'eau et les alcools.

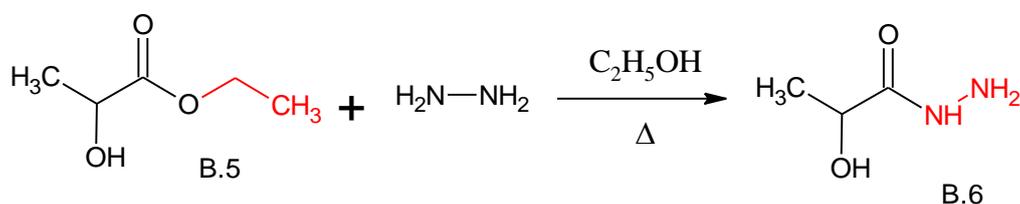


Schéma B.I.5. Synthèse du 2-hydroxypropanehydrazide (hydrazide lactique).

Le spectre infrarouge indique une bande large à 3443 cm^{-1} attribuée au groupement (-OH, NH, NH₂). Le groupement carbonyle C=O apparaît à 1682 cm^{-1} (**Annexe 5**).

B.I.6. Synthèse du 5-(1-hydroxyéthyle)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione (**B.7**)

La synthèse du 5-(1-hydroxyéthyle)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione (**B.7**) a été réalisée à partir de l'hydrazide lactique (**B.6**) après un reflux de 30 heures à 130°C pour avoir un rendement de 75 %. Après traitement, le produit est sous forme d'un gel marron visqueux ayant une odeur de vinaigre, la CCM (Toluène / Ethanol 2:1) a démontré un rapport frontal égal à 0.29.

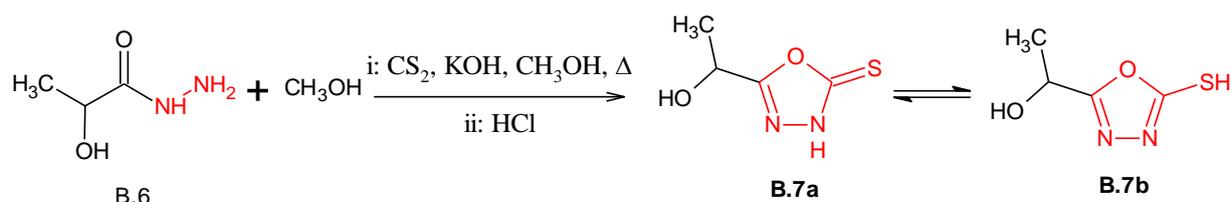


Schéma B.I.6. Synthèse du 5-(1-hydroxyéthyle)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione (B.7)

Le spectre infrarouge présente une bande large dans les domaines 3405 cm^{-1} du groupement -NH , la vibration d'élongation de la liaison C=N est assignée avec la bande située en 1626 cm^{-1} et démontre aussi les deux bandes en 1289 cm^{-1} et en 1059 cm^{-1} qui caractérisent la liaison C-O-C (**Annexe 6**).

Le composé 5-(1-hydroxyéthyle)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione (**B.7**) est un dérivé de 1,2,3-oxadiazole, son groupement mercapto de l'hétérocycle est capable d'établir un équilibre entre deux formes tautomères, une forme thione (**B.7a**) et une forme thiole (**B.7b**) et cette dernière est confirmée par l'apparition du groupement -SH dans la région 2750 cm^{-1} .

Le RMN ^1H du produit **B.7** met en évidence les signaux correspondants aux protons présents dans cette molécule : un singulet en 1.50 ppm correspondant au CH_3 , un autre singulet en 2.00 ppm pour le OH , un multiplet en 4.07 pour le CH et un doublet en 1.65 ppm pour le NH . (**Annexe 7**)

Ce RMN ^1H confirme que la structure de ce produit est celle désignée par **B.7.a** vu l'absence du signal attribué au proton du groupement -SH .

B.I.7. Synthèse de 4-amino-5-(1-hydroxyéthyle)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (B.8)

Par réaction du sel de potassium obtenu suite à la réaction de l'hydrazide lactique (B.6) avec l'hydrazine hydraté 50-60% dans le méthanol à reflux pendant 7heures, le produit est obtenu avec un rendement de 37% sous forme de poudre jaunes. La synthèse a été suivie par CCM (Toluène /Ethanol 2:1) où le $R_{fB9} = 0,61$ avec un point de fusion de $T_f : 122^\circ\text{C}$

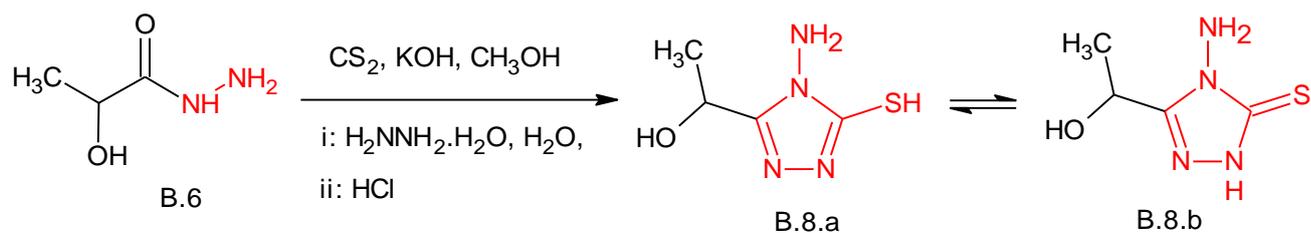


Schéma B.I.7. Synthèse de 3-(1-hydroxyéthyl)-4-amino-1,2,4-triazole-5-thiol (B.8)

Le spectre infrarouge présente une bande dans le domaine 3324.68 cm^{-1} assignée à l'élongation du groupement (NH, NH₂), à 2701.49 cm^{-1} attribuée à la vibration de la liaison S-H et à 1270 cm^{-1} correspondant à C=S ce qui explique qu'il y a un équilibre entre deux formes tautomères, une forme thiole (**B.8.a**) et une forme thione (**B.8.b**). Une bande à 1623.77 cm^{-1} caractéristique au groupement C=N (**Annexe 8**).

Le RMN ¹H du produit **B.8** met en évidence les signaux correspondants aux protons présents dans cette molécule : un singulet situé en 1.57ppm pour le CH₃ et un autre en 2.63ppm pour le OH, un multiplet en 3.15ppm pour le CH, un singulet en 8.60ppm pour le NH et en fin un singulet en 5.00ppm pour le NH₂ (**Annexe 9**).

Ce RMN ¹H confirme que la structure de ce produit est celle désignée par **B.8.b** vu l'absence du signal attribué au proton du groupement -SH.

B.I.8. Synthèse du thiosemicarbazide lactate (B.9)

Le composé 2-hydroxypropanethiosemicarbazide (**B9**) est préparé à partir de l'hydrazide lactique (**B.6**) et le thiocyanate d'ammonium NH₄SCN après un reflux de 30 heures. Le produit (**B9**) a abouti avec un rendement de 70.21% sous forme de pâte beige ayant une odeur caractéristique, de R_{fB10} = 0,66 et une température de fusion égale à 80°C. (**Schéma B.1.8**)

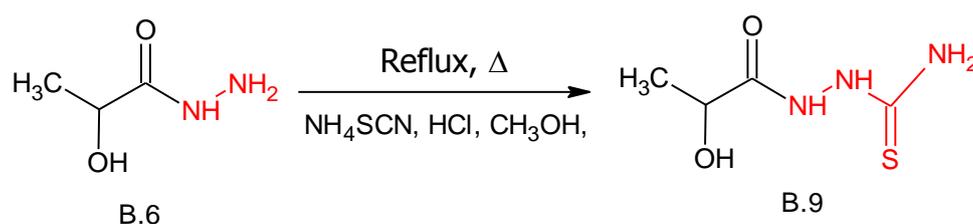


Schéma B.I.8. Synthèse du thiosemicarbazide lactate (B.9).

Le spectre infrarouge du 2-hydroxypropanethiosemicarbazide (**B9**) présente une bande vers 3410 cm^{-1} attribuée au groupement (NH, NH_2). Le groupement carbonyle C=O présente une bande aigüe à 1684.52 cm^{-1} et 1405.85 cm^{-1} pour le groupement C=S (**Annexe 10**).

B.I.9. Synthèse de 1-(5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-yl) éthanol (**B.10**)

Le 1-(5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-yl) éthanol (**B.12**) est obtenu à partir du 2-hydroxypropanethiosemicarbazide (**B.10**) et du H_2SO_4 concentré après un reflux de 5 heures sous agitation magnétique, le mélange est neutralisé avec de l'ammoniaque (NH_4OH), filtré et lavé avec l'eau. Le composé obtenu (**B.10**) est sous forme de poudre marron foncé avec un rendement de 9% et une température de fusion de 156°C . (**Schéma B.1.9**)

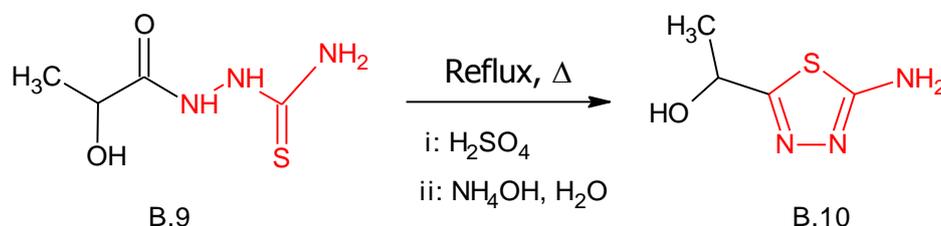


Schéma B.I.9. Synthèse de 1-(5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-yl) éthanol (**B.10**).

Le spectre infrarouge présente une bande dans le domaine 3394.79 cm^{-1} assignée à l'élongation du groupement (NH_2) et à 1622.80 cm^{-1} attribuées au groupement C=N et 1513.85 cm^{-1} pour C-N. Une bande à 1044.26 cm^{-1} assignée à l'élongation du groupement (C-S). (**Annexe 11**).

Le RMN ^1H du produit **B.8** met en évidence les signaux correspondants aux protons présents dans cette molécule : un singulet situé en 2.49ppm pour le CH_3 et un autre en 6.32ppm pour le OH, un multiplet en 3.06ppm pour le CH et en fin un doublet en 7.04ppm pour le NH_2 (**Annexe 12**).

B.I.10. Synthèse de 1-{5-[(phenyl-1,3-dioxan-5-yl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazol-2-yl}éthanol (**B.11**)

Cette réaction consiste à mélanger le composé **B.4** dans le DMF, DEA et le produit **B.7**. Après traitement et purification, la pâte marron de nature visqueuse nommée **B.11** a permis

d'obtenir le spectre infrarouge qui ne confirme pas sa structure, d'où l'existence d'un pic intense correspondant au groupement O=S=O en 1388cm^{-1} . Une bande très large dans le domaine 3402cm^{-1} caractérisant l'élongation du -OH (**Annexe 13**).

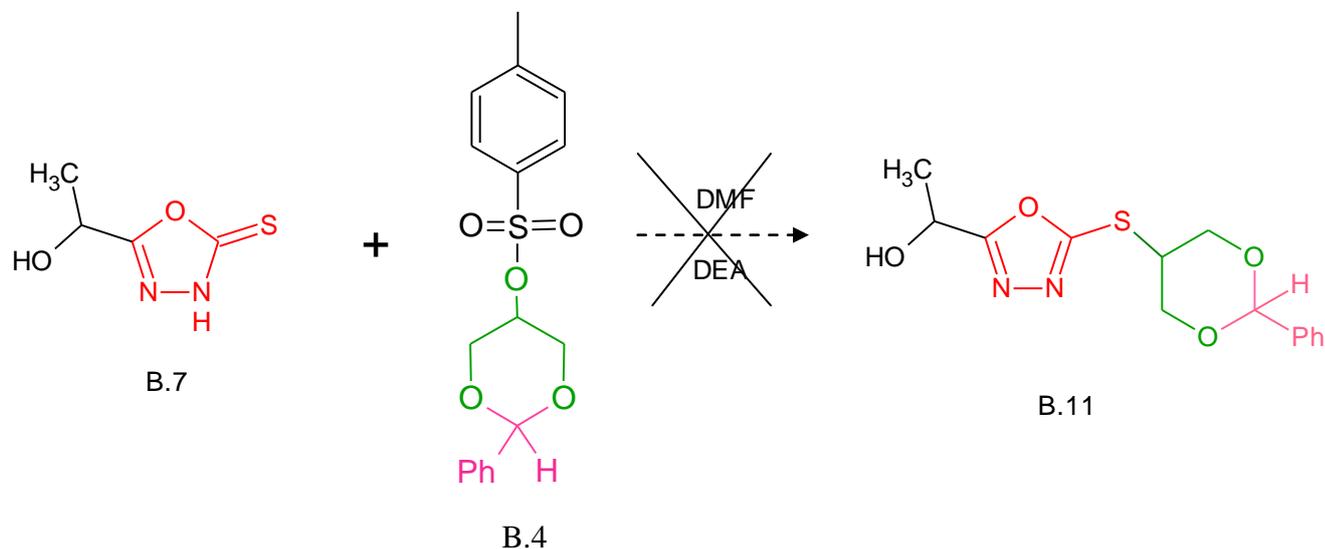


Schéma B.I.10 - Synthèse de 1-{5-[(phenyl-1,3-dioxan-5-yl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazol-2-yl}ethanol.

B.I.11. Synthèse de 4-[(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl)amino]-5-{1-[(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl)oxy]ethyl}-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (B.12)

Suite au mélange du produit **B.8**, **B.4** avec le DMF et le DEA, et après traitement et purification, la pâte visqueuse d'une couleur marron foncé nommée **B.12** a permis d'obtenir un spectre infrarouge et un spectre RMN qui confirme le greffage du sucre **B.4** avec l'hétérocycle **B.8** (**Schéma B.I.11**).

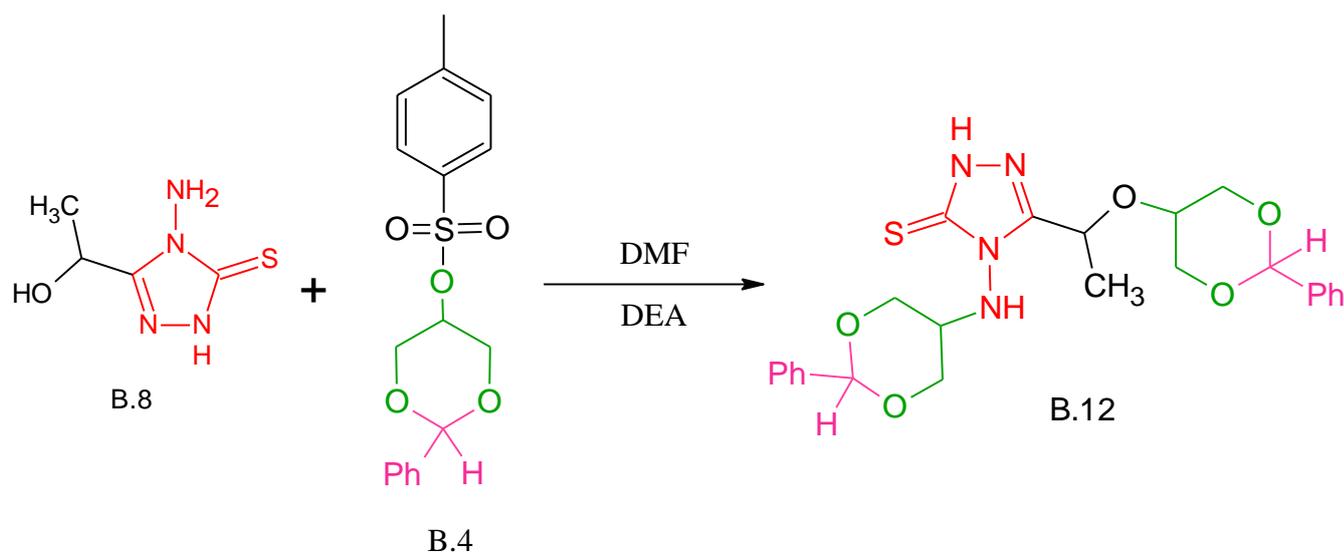


Schéma B.I.11 - Synthèse de 4-[(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl)amino]-5-{1-[(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl)oxy]ethyl}-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (B.12).

Il est bien visible dans le spectre infrarouge l'absence des bandes -OH et -NH_2 , un pic intense caractérisant la fonction éther (C-O-C) en 1151cm^{-1} , les deux pics en 1449cm^{-1} et en 1595cm^{-1} pour le C=C aromatique du benzène et en fin l'élongation en 1199cm^{-1} pour la liaison glycosidique C-N (**Annexe 14**).

Le RMN ^1H de ce produit exprimé en ppm met en évidence les signaux correspondants aux protons présents dans cette molécule : NH du cycle hétérocyclique en 7.85ppm et le NH de la liaison glycosidique en 1.26ppm, le CH_3 en 1.11, et les différents CH existants dans la molécule (5.41, 5.55, 4.14, 3.64, 3.20, 2.40, 7.45, 7.28, 7.29, 7.674, 7.679, 7.70) (**Annexe 15**).

L'analyse du spectre RMN ^{13}C de ce composé confirme sa structure (**Annexe 16**).

B.I.12. Conclusion

L'objectif de ce travail est de synthétiser des analogues du seco-acycloazolyl glycoside. La comparaison de la molécule (**B.12**) obtenue suite au greffage du sucre avec l'hétérocycle, mais après la déprotection de ce premier, la structure du composé (**B.13**) a démontré une compatibilité avec celle très connue du penciclovir (**Figure A.II.7**) (Page 28).

Partie B.
(Résultats et Discussion)
Chapitre B. II.
Activité Antibactérienne

Chapitre B.II.

Activité Antibactérienne

B.II.1. Introduction

Afin de compléter ce travail, un test antibactérien est nécessaire. Les produits déjà synthétisés et caractérisés seront testés contre une série de souches bactériennes pathogènes et/ou d'altération à Gram positif et à Gram négatif, pour déterminer leurs propriétés biologiques

B.II.2. Evaluation de l'effet antibactérien

Chaque espèce bactérienne a été ensemencée dans une boîte pétri contenant du M.H. Après disposition des disques imbibés par les produits synthétisés ainsi que les disques d'antibiotiques de références et après incubation à 37°C pendant 18h, nous avons obtenu les résultats représentés dans le tableau suivant (**Tableau B.II.1**) suite à la mesure des zones d'inhibitions en **mm** :

Tableau B.II.1

Tableau récapitulatif de l'effet antibactérien contre les produits de synthèse.

(Les zones d'inhibition sont données en **mm**)

Bactéries	Gram	Réf.		Produits Synthétisés								
		GEN	AMP	A.1	B.4	B.5	B.6	B.7	B.8	B.9	B.10	B.12
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	27	13	/	/	/	/	11	08	/	12	22
<i>Bacillus sp.</i>	+	29	25	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	24	30	/	/	/	/	10	/	/	/	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	30	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Escherichia coli</i>	-	29	08	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Shigella sonnei</i>	-	20	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Salmonella sp.</i>	-	22	10	/	/	/	/	/	/	/	/	/

/ : Produit inactif



Réf.



Hétérocycles



Glycoside

B.II.3. Mise en évidence des effets antibactériens

Après incubation des boîtes pétri à 37°C pendant 18h, il a été remarqué que le produit de départ, l'acide lactique (A.1) et les produits de synthèses intermédiaires (B.5, B.6 et B.9) n'ont aucun effet inhibiteur contre les sept souches bactériennes utilisées. Ceci peut être expliqué que ces produits sont inactifs ou bien c'est dû probablement à la faible concentration de la solution mère (10mg/ml).

Le produit B.4 qui représente le sucre de l'analogue de glycoside n'a pas d'effet inhibiteur car les sucres sont habituellement des aliments, nécessaire pour les microorganismes afin d'accomplir leurs activités vitales, et non pas des agents inhibiteur.

B.II.3.1. Effet des produits testés sur les bactéries à Gram positif

➤ *Staphylococcus aureus*

A partir des résultats montrés dans la figure ci-dessous, il a été observé que les composés hétérocycliques (B.7), (B.8), (B.10) et l'analogue de glycoside (B.12) possèdent une activité antibactérienne assez importante contre le *Staphylococcus aureus*. Ce dernier est une bactérie sensible à la gentamycine (GEN) et peu sensible à l'ampicilline (AMP).

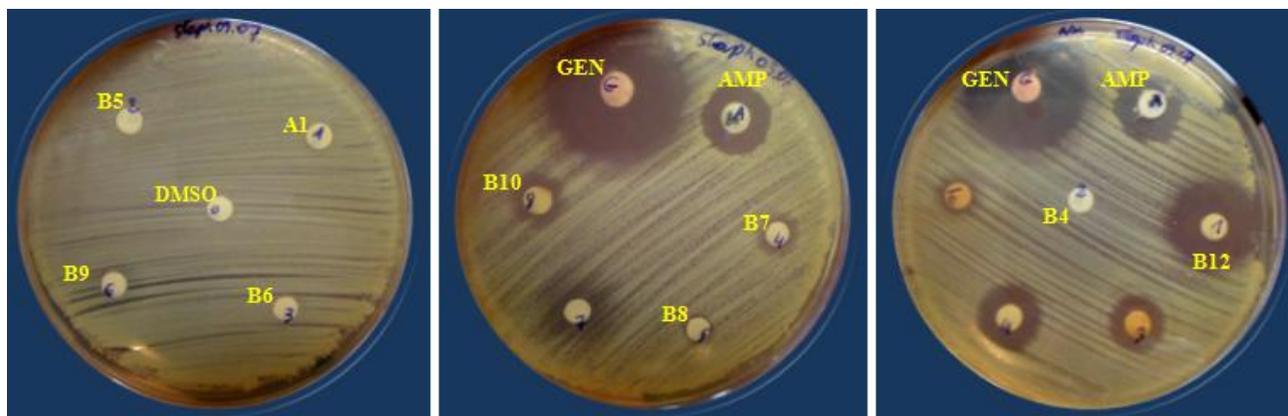
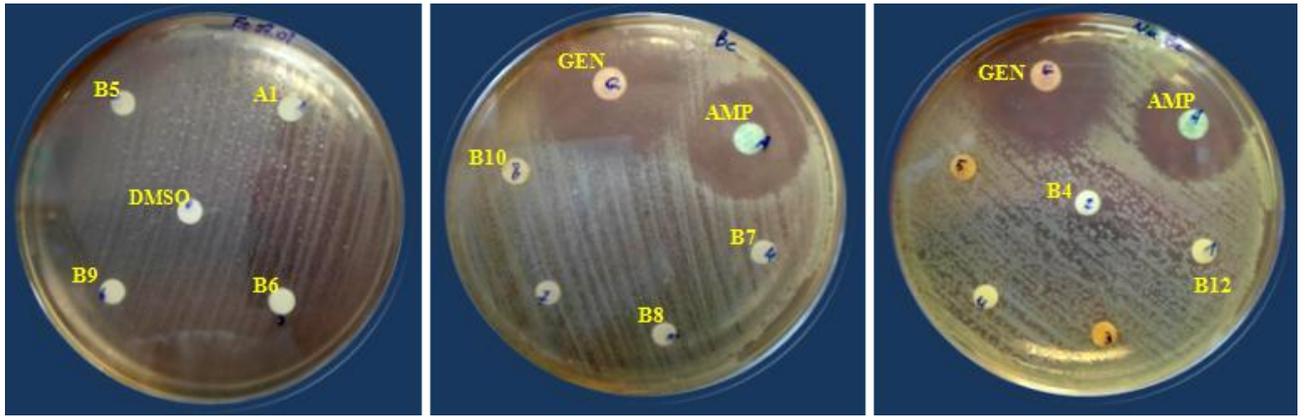


Figure B.II.1 - *Staphylococcus aureus*

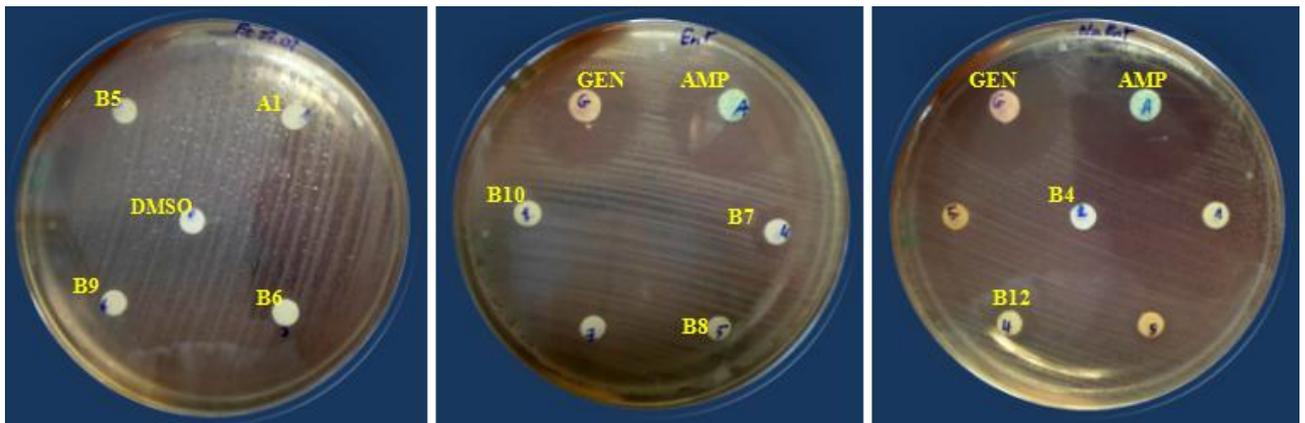
➤ *Bacillus sp.*

En plus des produits intermédiaires, la bactérie *Bacillus sp.* a montré une assez remarquable résistance contre les produits hétérocyclique (B.7), (B.8), (B.10), ainsi que contre l'analogue de glycoside (B.12). Cette bactérie est hautement sensible contre les deux antibiotiques de références utilisés.

Figure B.II.2 - *Bacillus sp.*

➤ *Enterococcus faecalis*

La souche indicatrice *Enterococcus faecalis* a pu résister aux hétérocycles testés sauf au **B.7** et à sont glycoside **B.12**. Selon sont antibiogramme, on note que cette bactérie est très sensible aux deux antibiotiques de références

Figure B.II.3 - *Enterococcus faecalis*

B.II.3.2. Effet des produits testés sur les germes à Gram négatif

Suite aux tests antibactériens des produits de synthèse, il a été observé que tous les germes à Gram négatif sont résistants à nos produits. A partir des résultats figurés dans les figures on note que :

- *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* et *Pseudomonas aeruginosa* sont résistantes à l'ampicilline (AMP) et fortement sensible à la gentamycine (GEN).
- *Salmonella sp.* est sensible à l'AMP et moyennement résistante à la GEN.

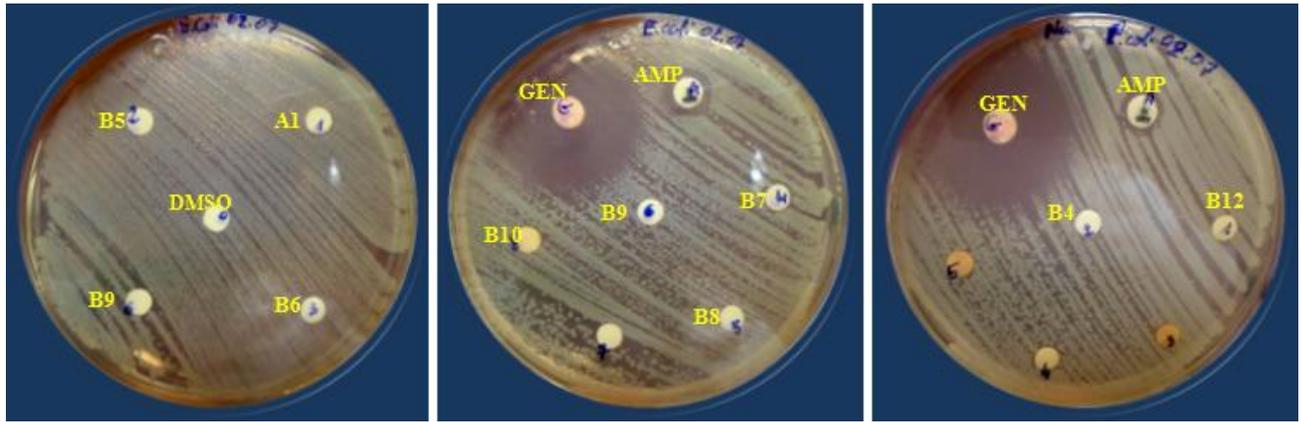


Figure B.II.4 - *Escherichia coli*

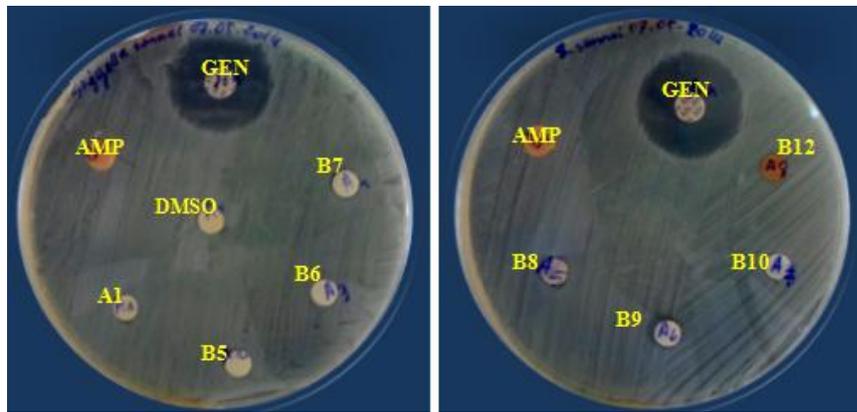


Figure B.II.5 - *Shigella sonnei*

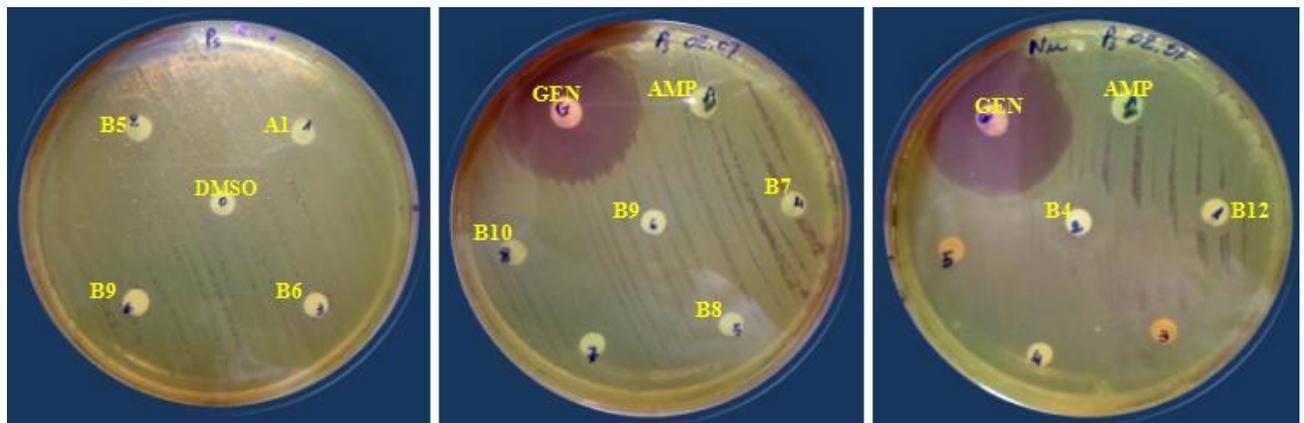
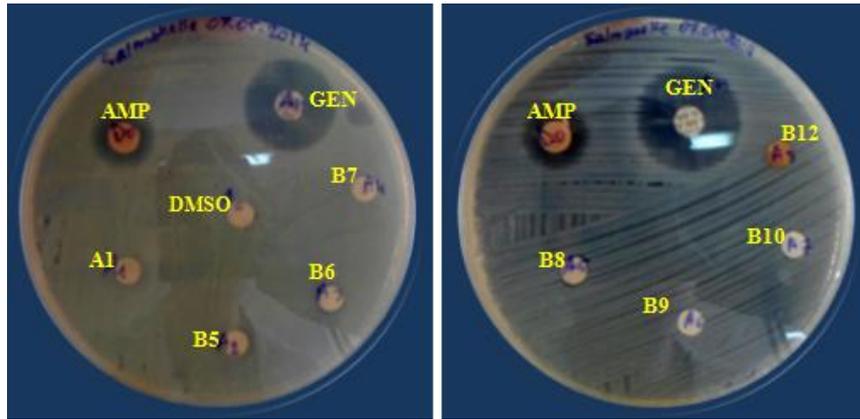


Figure B.II.6 - *Pseudomonas aeruginosa*

Figure B.II.7 - *Salmonella* sp.

B.II.4. Détermination de la CMI

Les inhibitions des concentrations minimales ont été déterminées en milieu solide pour les substances actives avec différentes concentrations en ordre décroissant. Les résultats sont regroupés dans le tableau B.II.2 et les figures qui en suivent (Figure B.II.8 et B.II.9), sachant que les concentrations marquées en rouge représentent les CMI des produits actifs.

Tableau B.II.2

CMI des produits de synthèse contre *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*

Bactéries	Produits Actifs	Les Dilutions							
		S.M.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
<i>Enterococcus faecalis</i>	B.7	-	-	-	-	+	+	+	+
	B.12	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	B.7	-	-	-	-	+	+	+	+
	B.8	-	-	+	+	+	+	+	+
	B.10	-	-	-	+	+	+	+	+
	B.12	-	-	-	-	-	+	+	+

+ : Croissance Bactérienne

- : Pas de Croissance Bactérienne

 CMI des Produits



Figure B.II.8 - CMI des produits de synthèse contre *Enterococcus faecalis*

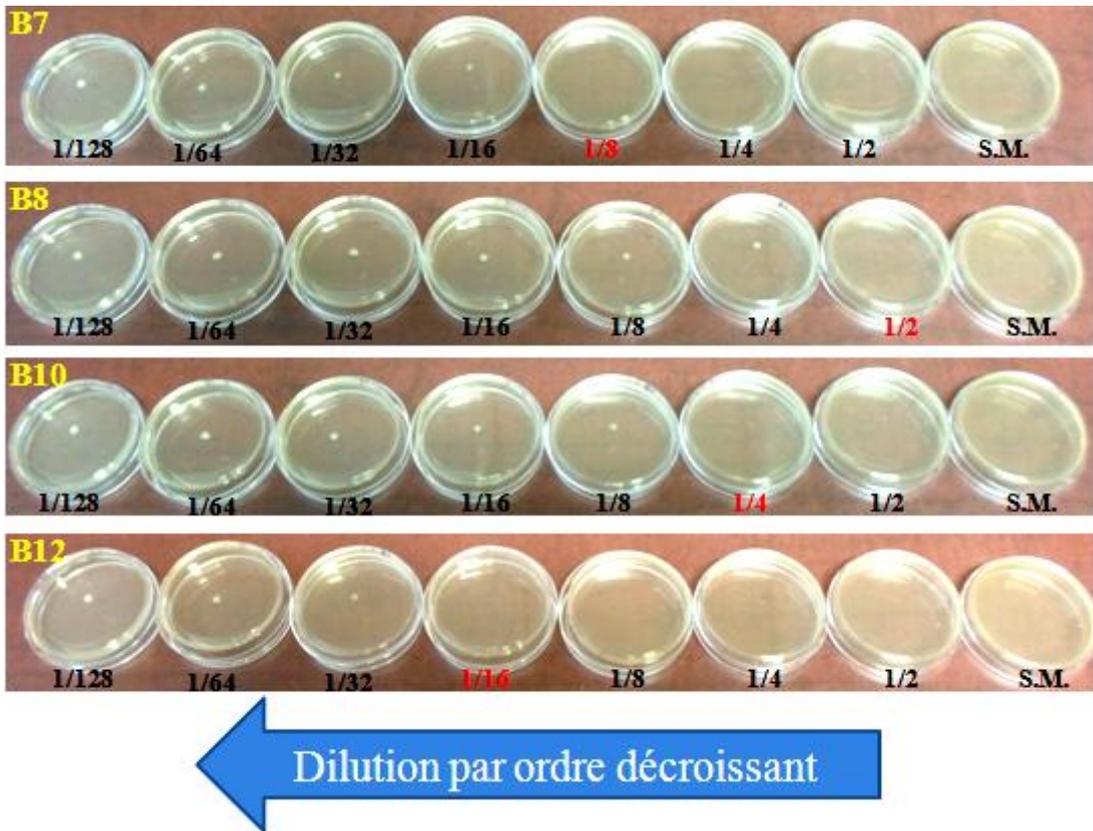


Figure B.II.9 - CMI des produits de synthèse contre *Staphylococcus aureus*

Partie C. (Expérimentale)

Généralités

Généralités

C.a. Techniques et appareillages utilisés

- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM sont effectuées sur des couches minces en gel de silice sur des plaques en verre préparées au niveau de notre Laboratoire de Synthèse Organique Physico-Chimie, Biomoléculaire et Environnement. Département de Chimie Organique Industrielle. Faculté de Chimie. Université des Sciences et de la Technologie d'Oran-Mohamed BOUDIAF. Après élution dans le solvant approprié, les plaques sont révélées par l'iode.

La distance parcourue par le composé est calculée à partir du niveau de déposition jusqu'au centre de la tache, tandis que la distance parcourue par l'éluant est calculée à partir du niveau de déposition de l'échantillon jusqu'au front de l'éluant, marqué à la fin de l'élution. Le R_f est un nombre sans unités qui varie entre 0 et 1.

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le composé}}{\text{distance parcourue par l'éluant}}$$

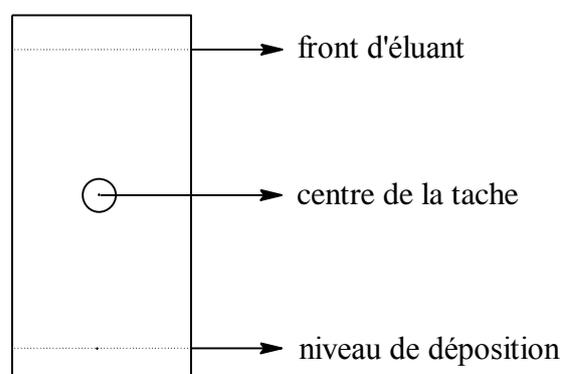


Figure C.1 - Calcul du rapport frontal R_f .

- **Température de fusion**

Les points de fusion sont mesurés dans des tubes capillaires à l'aide d'un appareil électro-thermal ($T_{\max} = 400^{\circ}\text{C}$) de Type GALLENKAMP et sont donnés en degré Celsius ($^{\circ}\text{C}$).

- **Titration pH-métrique**

Les pH sont mesurés avec du papier pH.

- **Une balance électronique**

Qui permet d'effectuer des pesées d'une précision de 10^{-4}g .

- **Une plaque chauffante avec agitateur magnétique (Type Assistant TMA) :**

Cette plaque sert de source de chaleur pour chauffer divers récipients et leur contenu.

Elle permet également d'assurer une bonne homogénéisation de la solution à l'agitation magnétique.

- **Spectroscopie Infrarouge IR**

Les spectres infrarouges ont été enregistrés sous forme de pastille KBr dans un spectromètre JASCO FT-IR entre 400 et 4000 cm^{-1} . Et aussi en utilisant le spectromètre Infrarouge à transformé de Fourier Alpha Bruker équipé d'une ATR Diamant (Laboratoire des Polymères du Département de Chimie de l'Université d'Es-Senia-Oran).

- **Résonance Magnétique Nucléaire RMN**

Les spectres de la résonance magnétique nucléaire (RMN ^1H et RMN ^{13}C) au niveau du Laboratoire des Polymères du Département de Chimie de l'Université d'Es-Senia-Oran.

- **Bec benzène**

Il est utilisé dans l'activité antimicrobienne en vue d'assurer une zone stérile de 20-30cm pour éviter les contaminations avec d'autres germes (au niveau du laboratoire du Service Bactériologie, Laboratoire Central, Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran).

- **Etuve**

Cette étuve ou incubateur permet de favoriser la température nécessaire pour la croissance et la multiplication des bactéries réglée à 37°C (favoriser les conditions de croissance des bactéries indicatrices) (au niveau du laboratoire du Service Bactériologie, Laboratoire Central, Hôpital Universitaire Militaire Régional d'Oran).

- **McFarland mettre**

Cet appareil utilisé dans les laboratoires de microbiologie. Il est utilisé pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes de sorte que le nombre de bactéries est à une gamme (concentration) donnée pour standardiser l'analyse microbienne (laboratoire du Service Bactériologie, Laboratoire Central, Hôpital Universitaire Militaire Régional d'Oran)..

- **Vortex®**

C'est un appareil utilisé en biologie moléculaire et aussi dans les laboratoires de microbiologie pour mélanger les solutions en tube (laboratoire du Service Bactériologie, Laboratoire Central, Hôpital Universitaire Militaire Régional d'Oran).

C.b. liste des produits chimiques et solvants utilisés**Tableau C1**

Les produits chimiques et solvants utilisés

Les Produits (pureté %)	Formules chimiques	MM (g/mole)	T _{éb} °C	T _f °C	d	Références
Acide Lactique	C ₃ H ₆ O ₃	90	-	-	1.21	Organics
Ethanol (99%)	C ₂ H ₅ OH	46,07	78,37	-114	0,78	Prolabo
Méthanol (99%)	CH ₃ OH	32,04	64,7	-97.6	0,79	Organics
Chloroforme (99,6%)	CHCl ₃	119,38	61,2	-63,5	1,48	Prolabo

Dichlorométhane (99,5%)	CH ₂ Cl ₂	84,93	39.6	-96,7	1,33	Merck
Sulfate de Magnésium Anhydre	MgSO ₄	120,37	-	1124	2,66	Panreac
Acide Chlorhydrique (36%)	HCl	36,46	48	-30	1,18	Prolabo
Acide Sulfurique (98%)	H ₂ SO ₄	98,07	337	3	1,84	Organics
Bicarbonate de Sodium	NaHCO ₃	84	-	270	2,16	Organics
Hydrazine Hydraté (50-60%)	H ₂ N-NH ₂ , H ₂ O	50,06	-	-	1,03	Prolabo
Hydroxyde de Potassium	KOH	56,11	-	380	-	Prolabo
Acétate d'éthyle	CH ₃ COOC ₂ H ₅	88,11	77	-83.06	0,89	Prolabo
Disulfure de Carbone (99,9%)	CS ₂	76,14	46	-111	1,26	Prolabo
Thiocyanate d'ammonium	NH ₄ SCN	76,12	-	149.6	1,300	Sigma- Aldrich
Ammoniac 34%	NH ₄ OH	17	38	-58	0.88	Prolabo
Ether Diéthylique	C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅	74,12	34	-116	0,715	Sigma- Aldrich
Diméthyle Sulfoxyde DMSO (99%)	(CH ₃) ₂ SO	78,13	189	19	18,4	Prolabo
Gel de silice	SiO ₂	60	2230	1650	-	Prolabo

ATPS : Acide paratoluènesulfonique	$C_7H_8O_3S$	172.2	185	106	-	Sigma-Aldrich
Glycérol	$HOH_2C.CHOH.CH_2OH$	92.09	290	18.02	1.26	Sigma-Aldrich
Benzaldéhyde	C_7H_6O	106.12	179	-26	1.04	Sigma-Aldrich
Diéthylamine DEA	$C_2H_5.NH.C_2H_5$	73.14	55.5	-50	0.7	Prolabo
Diméthylformamide DMF	C_3H_7NO	73.09	153	-61	0.94	Prolabo
Anhydride acétique	$CH_3.CO.O.CO.CH_3$	102.09	139	-73	1.08	Prolabo
Pyridine	C_5H_5N	79	115.35	-41.15	0.98	Organics

C.c. Caractéristiques de l'acide lactique

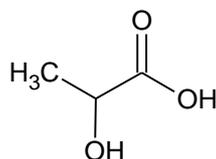


Figure C.2 – Structure Chimique de l'acide lactique.

Nom IUPAC : Acide 2-hydroxypropanoïque.

Nom Commercial : Acide Lactique.

Etat physique : Liquide.

Aspect : Sirop incolore [48]

Odeur : Inodore [48]

Formule brute : $C_3H_6O_3$

Masse Molaire (MM) : 90.08 g.mol⁻¹

Densité : 1.21

Température de Fusion : 17°C [49]

Température d’Ebullition : 122°C / 15mmHg [50]

Point d’Eclair : 110 °C (DL) [48]

Masse Volumique : 1,2485 g·cm⁻³ [11]

Indice de réfraction : 1.413-1.429 [51]

pKa : 3.86 (20°C)

R_f : 0.71 (Toluène : Ethanol / 2:1).

IR (Kbr, cm⁻¹) : 3477 cm⁻¹ (-OH); 1748cm⁻¹ (C=O); 2988cm⁻¹ (-CH₃) (**Annexe 5**)

Partie C. (Expérimentale)

Chapitre C. I.

Synthèse Organique

Chapitre C.I

Synthèses Organique

C.I.1. Synthèse du 2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol (B.3)

Le glycérol (9 g, 0.098 mole) (**B.1**) est dissous dans le chloroforme (15ml), une solution de benzaldéhyde (7g, 0.066 mole) (**B.2**) dissoute dans le chloroforme (10 ml) est additionnée à la solution précédente en présence de (1,5g, 0.0087 mole) d'acide para toluène sulfonique. Le mélange est porté à reflux pendant 6 heures sous agitation magnétique à température 80°C.

Après refroidissement de la solution à une température ambiante on sépare la phase organique dissoute dans la phase aqueuse par extraction avec le dichlorométhane. Après lavage avec une solution aqueuse de NaHCO₃, puis séchage avec le sulfate de magnésium anhydre, le produit est filtré pour donner le produit nommé (**B.3**) après évaporation du solvant.

Caractéristique du produit

- Liquide Jaune.
- Rendement du produit : 31.5%
- Masse Molaire 180g/mole.
- Masse du produit obtenu : 5.56 g
- Rapport frontal R_f : 0,78 (Toluène/Ethanol : 2/1).
- IR (FT-IR, cm⁻¹): 3398 cm⁻¹ (-OH), 1070 cm⁻¹ (C-O-C), 1455-1597 cm⁻¹ (C=C).

C.I.2 Synthèse de 2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl 4-methylbenzenesulfonate (B.4)

Ajouter le para-toluenesulfonyl chloride (3.5g, 0.018 mole) au 2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol (**B.3**) (4 g, 0.022 mole), après avoir ajouter la pyridine (5gouttes), laisser sous agitation magnétique à température ambiante pendant 12 heures. Effectuer une extraction liquide-liquide avec le dichlorométhane après plusieurs lavages à l'eau pour éliminer la pyridine. Sécher la phase organique avec le sulfate de magnésium anhydre et filtrer. Evaporer le solvant et obtenir le produit nommé (**B.4**).

Caractéristique du produit

- Cristaux Blancs.
- Rendement du produit : 60%
- Masse Molaire : 334g/mole.
- Masse du produit obtenu : 4.41g
- Rapport frontal R_f : 0.83 (Toluène /Ethanol : 2/1)
- IR (FT-IR, cm^{-1}): 1171-1373 cm^{-1} (O=S=O), 1080 cm^{-1} (C-O-C), 3064 cm^{-1} (-CH₃), 1454-1595 cm^{-1} (C=C).

C.I.3. Synthèse du 2-Hydroxypropanoate d'éthyle (lactate d'éthyle) (B.5)

L'acide lactique (**A.1**) (45g, 0.50 mole) est dissoute dans l'éthanol absolu (90 ml, 1.52 mole) et en présence de l'acide sulfurique H₂SO₄ (2mL). Le mélange réactionnel est chauffé à 110°C (bain d'huile) aux reflux pendant 7 heures, et après refroidissement à température ambiante :

- Effectuer l'extraction liquide-liquide. Pour cela mettre dans une ampoule à décanter le mélange réactionnel, ajouter 50mL de dichlorométhane et 50mL d'eau distillée glacée afin d'obtenir deux phases bien distinctes (une phase aqueuse et une phase organique). Répéter l'extraction deux à trois fois.
- Neutraliser la phase organique obtenue après extraction par une solution de bicarbonate de sodium (NaHCO₃) à 10% jusqu'à atteindre un pH égal à 7.
- Effectuer plusieurs lavages à l'eau de la phase organique neutralisée pour éliminer les sels.
- Ajouter le sulfate de magnésium (MgSO₄) anhydre pour éliminer les traces d'eaux restantes
- Ensuite, filtrer pour éliminer le MgSO₄ et évaporer le dichlorométhane pour obtenir un liquide nommé lactate d'éthyle (**B.5**).

Caractéristiques du produit

- Liquide jaunâtre, huileux, d'une odeur caractéristique ;
- Masse molaire (MM) : 118g/mole ;
- Masse du produit obtenu : 36.62g;
- Rendement : 62%;

- Rapport frontal (R_f) : 0.89 (Toluène : Ethanol / 2 : 1) ;
- IR (KBr, cm^{-1}): 3445 cm^{-1} (-OH); 1741 cm^{-1} (C=O); 1132 cm^{-1} (C-O-C).

C.I.4. Synthèse du 2-hydroxypropanehydrazide (hydrazide lactique) (B.6)

Le lactate d'éthyle (B.5) (1g, 0.008 mole) est dissout dans 5ml d'éthanol, 1g d'hydrazine hydratée (50 - 60%) est graduellement additionné avec agitation. Le mélange réactionnel est chauffé à 130°C (bain d'huile) sous reflux pendant 10 heures.

- Après évaporation du solvant, on obtient un produit nommé hydrazide lactique (B.6).

Caractéristiques du produit

- Sirop incolore, d'une odeur caractéristique ;
- Masse molaire (MM) : 104g/mole ;
- Masse du produit obtenu : 0.80g;
- Rendement 90.90%
- Rapport frontal (R_f) : 0.34 (Toluène : Ethanol / 2 : 1) ;
- IR (KBr, cm^{-1}) : 3443 cm^{-1} (-OH, -NH, -NH₂); 1682 cm^{-1} (C=O).

C.I.5. Synthèse du 5-(1-hydroxyéthyle)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione (B.7)

Une solution d'hydroxyde de potassium formée de KOH (0.4g) et de méthanol (10 ml) est graduellement additionnée à l'hydrazide lactique (B.6) (0.4g, 0.0038mole) qui est à son tour dissout dans 10ml de méthanol sous agitation, ensuite le disulfure du carbone CS₂ (10 ml) est ajouté goutte à goutte au mélange. Le mélange réactionnel est chauffé à 130°C (bain d'huile) sous reflux pendant 30 heures.

- Après refroidissement, le mélange est acidifié avec l'acide chlorhydrique (HCl) (30 %) jusqu'à un pH égal à 5. Ensuite, filtration du précipité formé et lavage à l'acétate d'éthyle.
- Après évaporation du solvant, on obtient un produit nommé (B.7).

Caractéristiques du produit

- Gel marron, d'une odeur caractéristique ;

- Masse molaire (MM) : 146g/mole ;
- Masse du produit obtenu : 0.42g ;
- Rendement : 75%
- Rapport frontal (R_f) : 0.29 (Toluène : Ethanol / 2:1) ;
- IR (KBr, cm^{-1}) : 3429 cm^{-1} (-NH); 1629 cm^{-1} (C=N); 1290 cm^{-1} , 1059 cm^{-1} (C-O-C), 1280 cm^{-1} (C=S).
- RMN ^1H (ppm) : 1.50 ppm (s) (CH_3); 4.07 ppm (m) (CH); 2.00 ppm (s) (OH); 1.65 ppm (m) (NH).

C.I.6. Synthèse de 4-amino-5-(1-hydroxyéthyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (B.8)

Une solution d'hydroxyde de potassium formée de KOH (0.6g) et de méthanol (10 mL) est graduellement additionnée à l'hydrazide lactique (**B.6**) (0.5g, 0.0048mole) qui est à son tour dissous dans 10ml de méthanol sous l'agitation, ensuite le disulfure du carbone CS_2 (10 mL) est ajouté goutte à goutte au mélange.

- Le mélange réactionnel est soumis sous agitation magnétique à température ambiante pendant 24 heures, puis l'ajout de l'éther diéthylique avec agitation pendant 2 heures permet l'obtention du sel de potassium qui est utilisé dans l'étape suivante.
- L'hydrazine hydraté (50-60%) est graduellement ajouté au sel de potassium qui a été dissous dans 10 ml d'eau sous agitation, le mélange est chauffé à reflux au bain marie pendant 7 heures.
- Le mélange réactionnel est refroidi, en suite acidifié avec l'acide chlorhydrique (HCl) (30 %) jusqu'à un pH égal à 1.
- Evaporation de l'eau, lavage au méthanol puis à l'acétate d'éthyle.
- Obtention d'un produit nommé (**B.8**).

Caractéristiques du produit

- Poudre jaune
- Masse molaire (MM) : 160g/mole ;
- Masse du produit obtenu : 0.69g ;
- Rendement : 89% ;

- Point de fusion : 122°C ;
- Rapport frontal (R_f) : 0.63 (Toluène : Ethanol / 2:1) ;
- IR (KBr, cm^{-1}) : 3324.68 cm^{-1} (NH, NH_2) ; 2701.49 cm^{-1} (-SH) ; 1623.77 cm^{-1} (C=N), 1270 cm^{-1} (C=S).
- RMN ^1H (ppm) : 1.57ppm (s) (CH_3); 3.15ppm (m) (CH); 2.63ppm (s) (OH); 8.60ppm (s) (NH); 5.00ppm (s) (NH_2).

C.I.7. Synthèse du thiosemicarbazide lactate (B.9)

Une solution de thiocyanate d'ammonium formé de NH_4SCN (0.29g, 3.9mmole) et de méthanol (5ml) est additionnée goutte à goutte et avec agitation à l'hydrazide lactique (B.6) (0.30g, 2.9mmole) qui a été dissous dans 5 ml de méthanol, en présence de 1ml d'acide chlorhydrique (HCl). Le mélange (de couleur rose) est chauffé à reflux au bain marie pendant 30 heures.

- Evaporation de l'excès du solvant.
- Lavage au méthanol.
- Filtration des sels formés, puis réévaporation du méthanol
- Obtention d'un produit nommé thiosemicarbazide lactate (B.9).

Caractéristiques du produit

- Pate de couleur beige, d'une odeur caractéristique ;
- Masse molaire (MM) : 163g/mole ;
- Masse du produit obtenu : 0.33g ;
- Rendement : 70.21% ;
- Rapport frontal (R_f) : 0.46 (Toluène : Ethanol / 2 : 1) ;
- IR (KBr, cm^{-1}) : 3410 cm^{-1} (NH, NH_2) ; 1684.52 cm^{-1} (C=O) ; 1405.85 cm^{-1} (C=S).

C.I.8. Synthèse de 1-(5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-yl) éthanol (B.10)

L'acide sulfurique (H_2SO_4) 3ml est additionné goutte à goutte au thiosemicarbazide lactate (B.9) (0.25g, 0.0017moles). Après un reflux de 5 heures et sous agitation magnétique,

le mélange est neutralisé avec de l'ammoniaque (NH₄OH). Ensuite l'ajout d'eau glacée permet la formation du solide qui, après filtration et lavage avec l'eau, le produit obtenu est le 1-(5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-yl) éthanol (**B.10**).

Caractéristiques du produit

- Poudre marron foncé ;
- Masse molaire (MM) : 145g/mole;
- Masse du produit obtenu : 0.02g;
- Rendement : 9%
- Rapport frontal (R_f) : 0.56 (Toluène : Ethanol / 2:1) ;
- Point de fusion : 156°C
- IR (KBr, cm⁻¹) : 3394.79cm⁻¹ (-NH₂) ; 1622.80 cm⁻¹ (C=N) ; 1513.85 cm⁻¹ (C-N) ; 1044.26 cm⁻¹ (C-S).
- RMN ¹H (ppm) : 2.49ppm (s) (CH₃); 3.06ppm (m) (CH); 6.32ppm (s) (OH); 7.04ppm (m) (NH₂).

C.I.9. Synthèse du 1-{5-[(phenyl-1,3-dioxan-5-yl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazol-2-yl}ethanol (**B.11**)

Le composé **B.7** (0.1g, 0.68mmole) est dissout dans un mélange de 2ml de diméthylformamide (DMF), puis l'ajout du sucre protégé (**B.4**) avec 2 gouttes de DEA. Le mélange réactionnel est porté à température ambiante avec agitation magnétique pendant 6 heures.

Après neutralisation avec l'eau jusqu'à un pH égal à 7, effectuer une extraction liquide-liquide avec le dichlorométhane. Suite à la distillation du solvant on obtient le produit nommé **B.11**.

C.I.10. Synthèse de 4-[(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl)amino]-5-{1-[(2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl)oxy]ethyl}-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (**B.12**)

Le composé **B.8** (0.1g, 0.59mmole) est dissout dans un mélange de 2ml de diméthylformamide (DMF), puis l'ajout du sucre protégé (**B.4**) avec 2 gouttes de DEA. Le mélange réactionnel est porté à température ambiante avec agitation magnétique pendant 6 heures.

Après neutralisation avec l'eau jusqu'à un pH égal à 7, effectuer une extraction liquide-liquide avec le dichlorométhane. Suite à la distillation du solvant on obtient le produit nommé **B.12**.

Caractéristiques du produit

- Pâte visqueuse marron foncé ;
- Masse molaire (MM) : 484.5g/mole;
- Masse du produit obtenu : 0.04g;
- Rapport frontal (R_f) : 0.75 (Toluène : Ethanol / 2:1) ;
- IR (FT-IR, cm^{-1}) : 1449 cm^{-1} - 1595 cm^{-1} (C=C); 1088 cm^{-1} -1151 cm^{-1} (C-O); 1272 cm^{-1} (C=S); 1625 cm^{-1} (C=N); 1199 cm^{-1} (C-N).
- RMN ^1H (ppm) : NH (7.85, 1.26); CH_3 (1.11); CH (5.41, 5.55, 4.14, 3.64, 3.20, 2.40, 7.45, 7.28, 7.29, 7.674, 7.679, 7.70).
- RMN ^{13}C (ppm) : 162; 142; 72; 21; 29; 42; 101; 137; 125; 129; 127; 128.79; 128.56; 131; 134.

Partie C. (Expérimentale)

Chapitre C. II.

Activité Antibactérienne

Chapitre C. II.

Activité Antibactérienne

C.II.1. Introduction

Le but de cette activité est de mettre en évidence la sensibilité ou la résistance des produits synthétisés contre des bactéries pathogènes et comparer leur efficacité avec des antibiotiques spécifiques pour chaque type de bactéries.

C.II.2. Les micro-organismes et les antibiotiques de références utilisés

Les micro-organismes ou les souches indicatrices utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne, sont des souches bactériennes pathogènes et/ou d'altérations à Gram positif et à Gram négatif (**Tableau C.II.1**).

Les antibiotiques utilisés comme référence sont la Gentamycine (**GEN**) et l'Ampicilline (**AMP**).

Tableau C.II.1

Les souches bactériennes pathogènes et/ou d'altérations utilisées.

	Noms	Source
Bactéries à Gram Positif	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Hôpital HMRUO
	<i>Bacillus sp.</i>	Institut Pasteur d'Oran
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Institut Pasteur d'Oran
Bactéries à Gram Négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Hôpital HMRUO
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Hôpital HMRUO
	<i>Shigella sonnei</i>	Institut Pasteur d'Oran
	<i>Salmonella sp.</i>	Institut Pasteur d'Oran

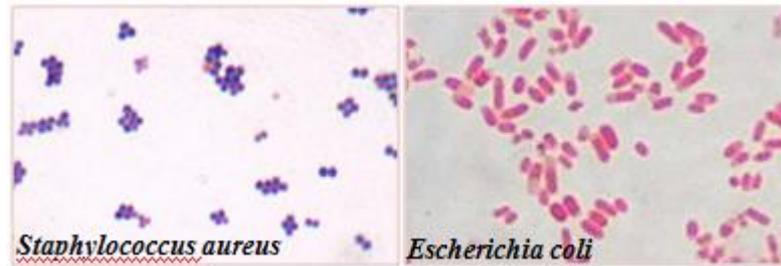


Figure C.II.1 - Distinction entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif (vue sous microscope optique après coloration de Gram).



Figure C.II.2 – Colonies bactériennes (Vue Macroscopique).

C.II.3. Mise en évidence de l'effet antibactérien

C.II.3.1. Principe

Le principe de cette mise en évidence est de procéder à un antibiogramme. Il existe plusieurs méthodes pour l'effectuer. Parmi d'entre elles, la méthode des disques [52]. Et donc cet examen consiste à disposer dans une boîte à pétri contenant une gélose Muller Hinton (M.H.) et inoculée par une souche bactérienne, des disques de papier imprégnés des produits synthétisés (à tester) à une concentration déterminée.

Après incubation, il est possible de voir la croissance bactérienne ainsi que des halos ou des zones d'inhibition de la croissance, au tour de chaque disque.

Plus la zone d'inhibition est grande, plus grande est la sensibilité de la souche bactérienne vis-à-vis du produit testé.

C.II.3.2. Mode opératoire

Pour effectuer cet examen, les étapes suivantes ont été suivies (**Schéma C.II.1**) :

- Les produits testés sont le produit du départ, l'acide lactique (**A.1**), ainsi que les produits synthétisés (**B.4, B.5, B.6, B.7, B.8, B.9, B.10, B.12**) sont dissous dans du DMSO pour préparer des solutions mère d'une concentration de 10 mg/ml.
- Les disques en papier, d'un diamètre de 5mm, déjà stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 min, sont imprégnés dans les solutions préparées jusqu'à la saturation.
- Ensemencer à l'aide d'un écouvillon et à partir d'une solution contenant une suspension bactérienne à 0.5 Mc Farland, à partir d'une souche bactérienne jeune de 24h, sur une boîte pétri contenant une gélose M.H.
- Placer les disques imprégnés des produits à tester et ceux des références soigneusement sur la gélose MH déjà ensemencée par les bactéries indicatrices.
- Incuber à 37°C pendant 24h.

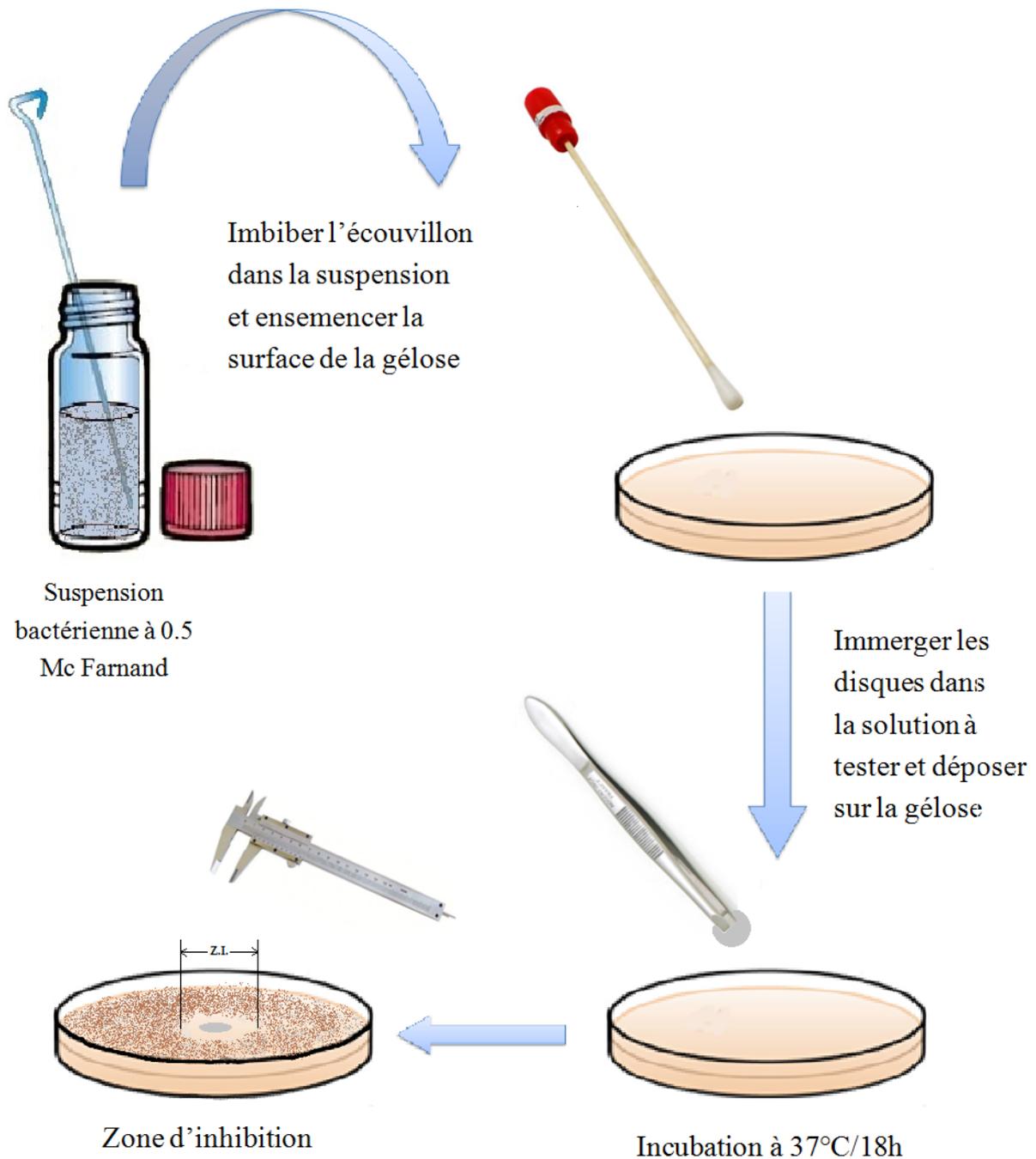


Schéma C.II.1 - Mise en évidence de l'effet antibactérien.

La lecture des résultats se fait par la mesure des dimensions des zones d'inhibitions (zones claires) autour des disques et représentée en millimètre à l'aide d'un pied à coulisse (Figure C.II.3).

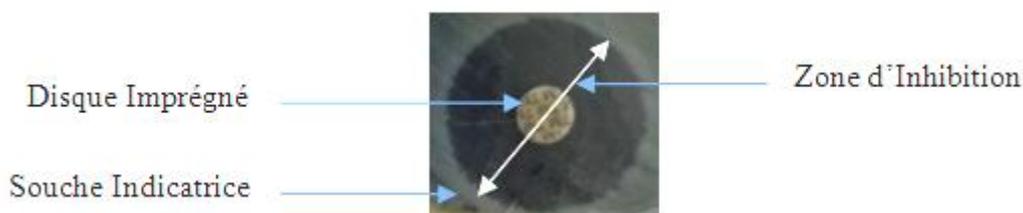


Figure C.II.3 - Représentation schématique des zones d'inhibitions.

- Les zones d'inhibition sont définies comme suit :

- + Le produit est actif pour un diamètre supérieur à 15 mm.
- + Le produit est modérément actif pour un diamètre compris entre 8 et 15 mm.
- + Le produit est inactif pour un diamètre inférieur à 8mm.

C.II.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) représente la concentration minimale d'antibiotique permettant d'inhiber (bactériostase) totalement la multiplication bactérienne, après 18 à 24 heures de contact à 37 °C. Pour déterminer cette CMI, il existe deux méthodes : détermination de la CMI sur milieu liquide et sur milieu solide [53][54][55][56].

C.II.4.1. Détermination de la CMI en milieu liquide

- Préparer pour chaque souche indicatrice une suspension bactérienne à 0.5 Mc Farland dans de l'eau distillée.
- Repiquer 0.5ml de la suspension bactérienne à étudier dans 10ml de milieu de culture MH liquide et mettre au bain marie à 37°C pendant 3 - 5 heures.
- Inoculer dans chaque tube à hémolyse 1.8ml de la préparation de chaque bactérie.
- Ajouter dans le tube témoin 0.2ml d'eau distillée (T₁), dans un autre tube 0.2ml de DMSO (T₂) et 0.2ml de chaque dilution du produit à tester dans des tubes bien identifiés, en allant de la solution mère (10mg/ml) à la plus faible concentration.
- Agiter les tubes fortement au Vertex[®].
- Incuber les tubes à 37°C pendant 18h.
- Lecture de la CMI : se fait en identifiant le tube contenant une concentration déterminée pour laquelle il n'y a pas une culture visible (trouble).

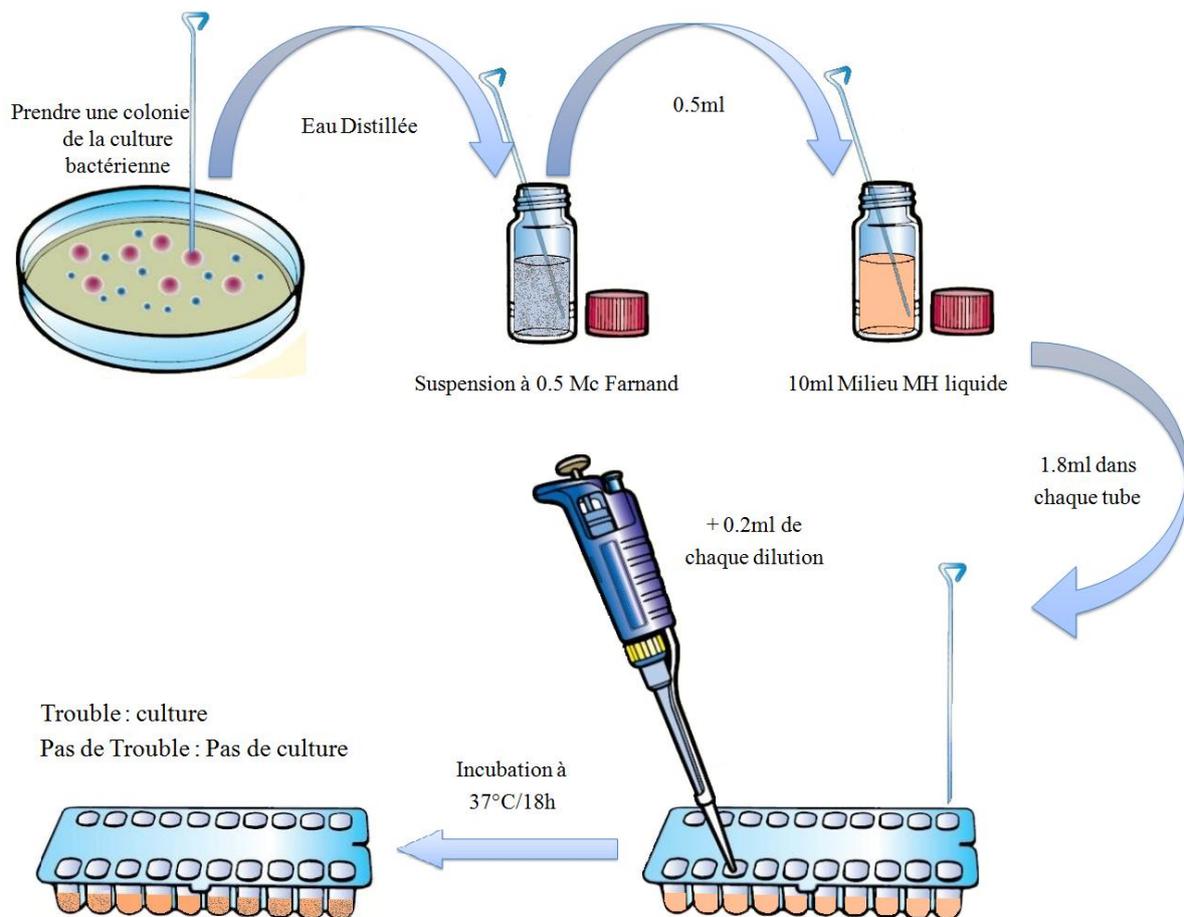


Schéma C.II.2 - Détermination de la CMI en milieu liquide.

C.II.4.2. détermination de la CMI en milieu solide

- Mettre 2ml d'eau distillée dans une boîte pétri, 2ml de DMSO dans une autre boîte et 2ml de chaque dilution du produit à tester dans des boîtes bien identifiées, en allant de la solution mère (10mg/ml) à la plus faible concentration.
- Ajouter 18ml de milieu M.H. gélosé. Bien mélanger et laisser solidifier à température ambiante.
- Sécher les boîtes 30min. à l'étuve à 37°C.
- Préparer une suspension de la bactérie à étudier à 0.5 Mc Farland dans de l'eau distillée.
- Ensemencer à l'aide d'un écouvillon ou d'une anse en touche [57] les géloses dans chaque boîte.
- Incuber les boîtes à 37°C pendant 18h.

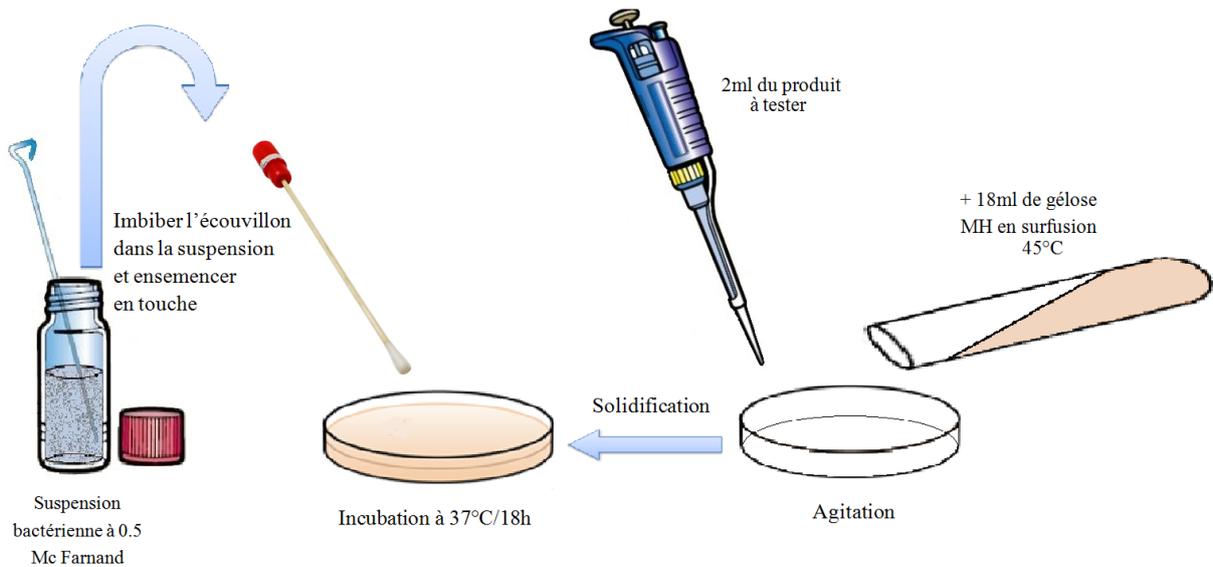


Schéma C.II.3 - Détermination de la CMI en milieu solide.

La lecture de la CMI se fait en identifiant la boîte à gélose contenant une concentration déterminée pour laquelle il n'y a pas une culture visible (colonies) comme montré sur la figure suivante (**figure C.II.3**).

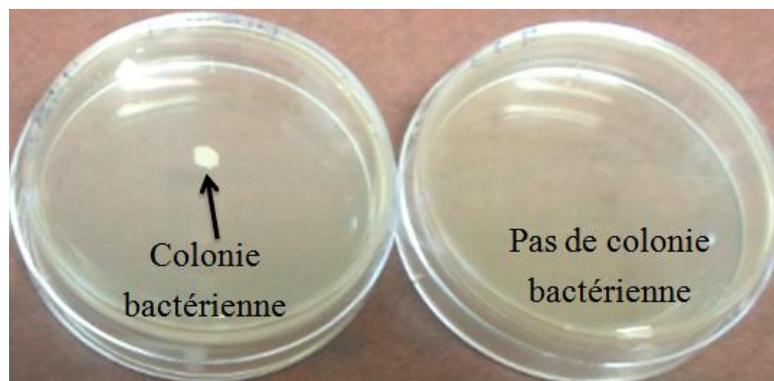


Figure C.II.4 – Lecture des résultats de la CMI en milieu solide.

Pour la détermination de la CMI de nos produits de synthèse (**A.1, B.4, B.5, B.6, B.7, B.8, B.9, B.10, B.12**), nous avons utilisé la méthode de détermination de la CMI en milieu solide.

C.II.5. Conclusion

La méthode qui a été utilisée pour la détermination de la CMI des produits actifs et celle en milieu solide.

Conclusion

Générale

Conclusion Générale

Ce mémoire avait pour objectif de synthétiser de nouveaux produits. Le déroulement de cette étude a été envisagé selon deux axes. Dans un premier temps, nous nous sommes basés sur la synthèse des dérivés hétérocycliques azotés à cinq chaînons à partir de l'acide lactique ensuite les greffer sur un sucre déjà protégé afin d'obtenir un analogue de glycoside ; et dans le second, sur l'activité biologique de ces composés vis-à-vis de quelques souches bactériennes.

Pour aboutir à ces molécules, nous sommes passés par la synthèse des produits intermédiaires à savoir : 2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol (**B.3**), le sucre protégé : 2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl 4-methylbenzenesulfonate (**B.4**). Le **2-Hydroxypropanoate d'éthyle** (lactate d'éthyle) (**B.5**), 2-hydroxypropanehydrazide (hydrazide lactique) (**B.6**), thiosemicarbazide lactate (**B.9**), ainsi que les hétérocycles 5-(1-hydroxyéthyle)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione (**B.7**), 4-amino-5-(1-hydroxyéthyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (**B.8**), 1-(5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-yl) éthanol (**B.10**) et enfin le composé ciblé : le (**B.12**).

Le greffage du 5-(1-hydroxyéthyle)-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thione (**B.7**) avec le 2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl 4-methylbenzenesulfonate (**B.4**) n'était pas impossible.

Les composés organiques synthétisés ont été identifiés par les méthodes physico-chimiques (point de fusion, CCM, IR et RMN).

Après avoir testé tous les composés chimiques nouvellement synthétisés pour leurs activités antibactériennes avec le produit de départ contre sept exemplaires de souches bactériennes pathogènes et/ou d'altération : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.* et *Shigella sonnei* :

- Tous les composés testés, notant le produit du départ, ne possèdent aucune activité antibactérienne contre les bactéries à Gram négatif.
- La souche bactérienne *Staphylococcus aureus* à Gram positif a montré un assez important pouvoir antibactérien inhibiteur contre les composés hétérocycliques (**B.7**) (**B.8**) et (**B.10**) et aussi contre l'analogue de glycoside (**B.12**).

- ➔ La souche *Enterococcus faecalis* s'est montrée sensible contre seulement un hétérocycle (**B.7**) et sont analogue de glycoside (**B.12**).

Ce travail constitue une approche dans la conception de composés dérivés de l'acide lactique pouvant servir comme alternative aux antibiotiques si on prend en considération la résistance des bactéries contre ces derniers, mais ça sera applicable après la détermination de la CMB et l'évaluation de la toxicité de ces molécules synthétisées afin de confirmer leurs usages en pharmacologie pour qu'ils aient une éventuelle utilisation thérapeutique.

Il serait beaucoup plus intéressant d'obtenir la molécule seco-acyclique par déprotection de la partie sucre, d'obtenir d'autres analogues seco-acyclique analogue de glycosides en synthétisant d'autres hétérocycles à cinq chaînons comme thiazoles, triazole, etc. et de les greffer sur notre même sucre.

De plus de tester la toxicité des produits déjà synthétisés, il nous intéresserait de tester leur effets antifongique, antitumoral et antiviral.

Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

- [1] Génin, G. (1940). *Le Lait : L'Utilisation de l'Acide Lactique*. Vol. 20, N°191-192. p. 29 - 32.
- [2] Dawson, R. M. C. (1959). *Data for Biochemical Research*, Oxford, Clarendon Press.
- [3] Stephen, M. R. (2006). "Why does lactic acid build up in muscles? And why does it cause soreness?" Department of Kinesiology at the University of Maryland. *Scientific American*.
- [4] Génin, G. (1960). *Le Lait : L'acide Lactique et ses Applications*. Vol. 40, N°27-37. p. 27 - 37.
- [5] Johnson, A. W. (2003). *Invitation à la Chimie Organique*. De Boeck. Amazon. France. p. 633.
- [6] Maryadele, J. O'N.; Smith, A.; Heckelman; P. E. Budavari, S. (2001). *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 13th edition*, United States. p. 2564. (ISBN 978-0-911910-13-1)
- [7] Badet, C. ; Thebaud, N.B. (2008). "Ecology of Lactobacilli in the Oral Cavity: A Review of Literature". *The Open Microbiology Journal* 2: 38–48.
- [8] Nascimento, M.M.; Gordan, V.V.; Garvan, C.W.; Browngardt, C.M.; Burne, R.A. (2009). "Correlations of Oral Bacterial Arginine and Urea Catabolism with Caries Experience". *Oral Microbiology and Immunology* 24 (2): 89–95.
- [9] Aas, J.A.; Griffen, A.L.; Dardis, S.R.; Lee, A.M.; Olsen, I.; Dewhirst, F.E.; Leys, E.J.; Paster, B.J. (2008). "Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults". *Journal of Clinical Microbiology* 46 (4): 1407–17.
- [10] Caufield, P.W.; Li, Y.; Dasanayake, A.; Saxena, D. (2007). "Diversity of Lactobacilli in the Oral Cavities of Young Women with Dental Caries". *Caries Res.* 41 (1): 2–8.

- [11] Speight, J. G.; Norbert A. L. (2005). *Lange's Handbook of Chemistry*, New York, McGraw-Hill. 16^e éd., 1623 p. (ISBN 978-0-07-143220-7, LCCN 84643191), p. 2.289
- [12] Robergs, R.A.; Ghiasvand, F.; Parker, D. (2004). "Biochemistry of Exercise-Induced Metabolic Acidosis". *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287 (3): R502–R516.
- [13] Chene, C. (2002). *Les Acides Organiques*. Adrianor. France.
- [14] Larsson, C. S.; Andersson, S. O.; Johansson, J. E. and Wolk, A. (2008). "Cultured Milk, Yoghurt, and Dairy Intake in Relation to Bladder Cancer Risk in a Prospective Study of Swedish Women and Men". *The American Journal of Clinical Nutrition.* 88: 1083-7.
- [15] Auger, C. R. (1995). t. 140, p. 938.
- [16] Génin, G. (1941). *Le Lait : Préparation et Propriétés des Esters Lactiques*. Vol. 21, N°361-367.p. 361.
- [17] Hatakeda, K.; Sato, O.; Kanakubo, M.; Ikushima, Y.; Torii, Kazuo. (2004). "Method of Introducing Amino Group and Method of Synthesizing Amino Acid Compound". US2004/162434 A1. P. 6-9.
- [18] Villalobos, J.; Velasquez, J. E.; Godlewski, J. E. ; Collias, D. I. (2013). "Catalysts Conversion Of Hydroxypropionic Acid Or Its Derivatives To Acrylic Acid Or Its Derivatives". *The Procter and Gamble Company*. Br. US2013/0274512A1.
- [19] Schereiner, A. (1879). t. 197, p. 12.
- [20] Burns, J. and Burns, R. (1935). *Journ. Ohem, Soc.*, p; 400.
- [21] Andou, Y. Nishida, H.; Shirai, Y.; Watanabe, K. (2013). "A Simple Synthetic Route for the Preparation of Tetramethylglycolide from Lactic Acid". *Chemistry Letters*. vol. 42, # 2 p. 159 – 161.
- [22] Chae, H.; Kim, S. H.; Seo, J.; Han, D. S. (2013). "Method of Preparing Lactide from

Lactate". US2013/267716 A1.

- [23] Concepcion, P.; Corma, A. and Primo, A. (2011). "Synergy Between the Metal Nanoparticles and the Support for the Hydrogenation of Functionalized Carboxylic Acids to Diols on Ru/TiO₂". *Chem. Commun.* vol. 47, # 12 p. 3613 – 3615. DOI: 10.1039/C0CC05206J.
- [24] Wislicenus, A. (1863). t. 125, p. 58.
- [25] McMurry, J. et Simanek, E. (2007). *Chimie organique : Les grands principes, Cours et exercices corrigés*. 2^{éd.} Dunod. p. 251.
- [26] Housset, C. et Raisonnier, P. A. (2007). *Biologie Moléculaire : Objectif au Cours de Biochimie PCEM1*. Faculté de Médecine - Pierre et Marie Curie. Université Paris-VI. p. 457.
- [27] Yang, H. and Zhang, Z. Y. (1987). *Acta Sinica Chim.*, 45 (9), 916.
- [28] Hoeksema, H.; G. Slomp and Van Tamelen, E.-E. (1964). *Tetrahedron Lett.* 1795.
- [29] (a) Ko, O. H.; Hong, J. H. (2002). *Tetrahedron Lett.* 43, 6399; (b) Kim, J. W.; Choi, B. G.; Hong, J. H. (2004). *Bull. Korean Chem. Soc.* 25, 1812.
- [30] Wilhelmus, K.R. (2010). "Antiviral Treatment and other Therapeutic Interventions for Herpes Simplex Virus Epithelial Keratitis". *Cochrane. Database. Syst. Rev.* 12: CD002898. Doi:10.1002/14651858.CD002898.pub4. PMID 21154352
- [31] Brito-Arias, M. (2007). *Synthesis and Characterization of Glycosides*. Springer. ISBN 978-0-387-26251-2.
- [32] IUPAC. (1997). *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford. XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006) created by Nic, M.; Jirat, J. et Kosata, B.; updates compiled by Jenkins, A. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.
- [33] Collin, G.; Höke, H.; Talbiersky, J. (2006). *Anthracene. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

- [34] Howell, J. B.; Altounyan, R. E. (1967). A Double-Blind Trial of Disodium Cromoglycate in the Treatment of Allergic Bronchial Asthma. *Lancet*, 2, 539–542
- [35] Farinola, N.; Piller, N. (2005). "Pharmacogenomics: Its Role in Re-establishing Coumarin as Treatment for Lymphedema". *Lymphatic Research and Biology* 3 (2): 81–86.
- [36] Robiquet et Boutron-Charlard. (1830). "Nouvelles Expériences sur les Amandes Amères et sur l'Huile Volatile qu'elles Fournissent". *Annales de Chimie et de Physique* 44: 352–382.
- [37] Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4^e éd., revue et augmentée*, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales. 1288 p.(ISBN 978-2-7430-1188-8)
- [38] Pop, C.; Vlase, L. and Tamas, M. (2009). "Natural Resources Containing Arbutin. Determination of Arbutin in the Leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. Acclimated in Romania". *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 37 (1): 129–132.
- [39] Sun, H. X.; Xie, Y.; Ye, Y. P. (2009). "Advances in Saponin-Based Adjuvants". *Vaccine* 27 (12): 1787–1796.
- [40] Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H. Jr.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R.; Russell, D.W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; Van Meer, G.; Van Nieuwenhze, M. S.; White, S. H.; Witztum, J. L.; Dennis E. A. (2005). A Comprehensive Classification System for Lipids, *J. Lipid Res.*, vol. 46(5):839-861
- [41] Daniells, S. (2007). "Symrise Explores Cheaper Alternatives in Bitter-Maskers". www.foodnavigator.com
- [42] Scientific Committee for Food. (2008). "Opinion on Stevioside as a sweetener". *Reports of the Scientific Committee for Food*, ec.europa.eu, Commission Européenne. p. 1-7
- [43] FAO & JECFA. (2008). Steviol glycosides. INS 960. Monographs 5.
- [44] Lankau, R. (2008). A Chemical Trait Creates a Genetic Trade-off Between Intra- and

- Interspecific Competitive Ability. *Eco.* 89(5): 1181-1187.
- [45] Taieb Brahimi, F.; Belkadi, M. and Adil Othman, A. (2013). "Synthesis of nonionic surfactants with azole ring bearing N-glycosides and their antibacterial activity". *Arabian Journal of Chemistry*. p. 1-9.
- [46] Colthup, N. B. (1950). "Spectra-Structure Correlations in the Infra-Red Region". *Journal of the Optical Society of America*. Vol. 40. N°6. p. 397-400.
- [47] Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V. and Nudelman, A. (1997). "NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities". *J. Org. Chem.* Vol. 62, N°. 21, p. 7513-7513.
- [48] Programme International sur la Sécurité des Substances Chimiques. (2009). *Acide Lactique*. fiche de sécurité.
- [49] *Tokyo Chemical Industry Ltd et CAS*. (2010). Registry Number: 50-21-5.
- [50] *Food and Agriculture Organization of the United Nations et CAS*. (2010). Registry Number : 50-21-5.
- [51] *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. (2006).
- [52] Bhunia, A. K.; Johnson, M. C.; Ray, B. (1988). "Purification, Characterization and Antimicrobial Spectrum of a Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici*". *J. of Applied Bacteriology*. 65. 261-268.
- [53] Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2006. <http://www.sfm.asso.fr>
- [54] Ericson, H. M. and Sherris, J. C. (1971). Antibiotic Sensitivity Testing. Report of an International Collaborative Study. *Act. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Suppl.* 217: 1-90.
- [55] Steers, S.; Foltz, E. L.; Graves, B. S.; Riden, J. (1959). An Inocula Replicating Apparatus for Routine Testing of Bacterial Susceptibility to Antibiotics. *Antibiot. Chemother. (Basel)* 9:307-311.

- [56] Document Edité avec la Collaboration de l'OMS. (2011). Standardisation de l'Antibiogramme à l'Echelle Nationale (Médecine Humaine et Vétérinaire). 6éd. OMS.
- [57] Fleming H. P., Etchells J. L.; Costilow R. N. (1975). "Microbiological Inhibition of Isolate of *Pediococcus* from Cucumber Brine". *Appl. Environ. Microbiol.* 30. 1040-1042.

